



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

RÁDAMIS BARBOSA CASTOR

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
UM SOLO CONTAMINADO POR ÓLEO VEGETAL RESIDUAL**

JOÃO PESSOA

2019

RÁDAMIS BARBOSA CASTOR

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
UM SOLO CONTAMINADO POR ÓLEO VEGETAL RESIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia
pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Krystyna Gorlach
Lira.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina
Barbosa de Sousa.

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C354a Castor, Rádamis Barbosa.

Atividade enzimática e antimicrobiana de bactérias isoladas de um solo contaminado por óleo vegetal residual / Rádamis Barbosa Castor. - João Pessoa, 2019. 60 f. : il.

Orientação: Krystyna Lira.

Coorientação: Adna Sousa.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Enzimas extracelulares. 4. Substâncias antimicrobianas. I. Lira, Krystyna. II. Sousa, Adna. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia

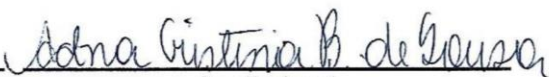


ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dois dias do mês de maio de 2019, às 13:00h, em sessão pública no Auditório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Krystyna Gorlach Lira (DBIM/CCEN/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa, orientadora (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior (DBIM/CCEN/UFPB), o discente Rádamis Barbosa Castor, matrícula 11325124, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Atividade Enzimática e Antimicrobiana de Bactérias Isoladas de um Solo Contaminado por Óleo Vegetal Residual”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Krystyna Gorlach Lira, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 02 de maio de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida e todo o amor que um filho poderia receber.

“Pensar é um ato, sentir é um fato.”

Clarisse Lispector

RESUMO

As bactérias do solo são conhecidas como produtores de muitas substâncias biologicamente ativas e representam uma rica fonte de enzimas e compostos antimicrobianos. Enzimas hidrolíticas são as principais catalisadoras de processos industriais e àquelas de origem microbiana possuem uma série de benefícios. Em virtude da crescente demanda deste mercado, a procura de novos microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas apresenta um elevado potencial biotecnológico. Os antibióticos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas, porém, seu uso indiscriminado tem levado a um aumento dos casos de patógenos resistentes à antibióticos, o que justifica a busca por novas fontes de substâncias antimicrobianas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de enzimas extracelulares e substâncias antimicrobianas de vinte isolados de bactérias provenientes de um solo contaminado por óleo vegetal residual. Para isto, utilizou-se meios sólidos contendo gelatina, carboximetilcelulose, amido e óleo vegetal residual para verificação da produção de proteases, celulases, amilases e lipases, respectivamente, pelos isolados. Constatou-se que 85% deles apresentou produção de enzimas extracelulares, com destaque para as atividades lipolítica, proteolítica e celulolítica. Os isolados pertencentes ao biotipo de bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos foram mais ativos na produção de todas as enzimas analisadas, com destaque para o isolado O27. Para avaliação da capacidade de produção de metabólitos antimicrobianos, os isolados foram submetidos aos ensaios de atividade antagonista utilizando o método de cultura pareada e o teste de suscetibilidade antimicrobiana frente às linhagens de referência de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Dois isolados (O36 e O41), pertencentes ao biotipo de bactérias Gram-negativas, apresentaram resultados positivos no ensaio de atividade antagonista frente a todas as linhagens de referência testadas. A atividade antimicrobiana de O36 e O41, avaliada no teste de suscetibilidade antimicrobiana, mostrou inibição de *C. albicans*. Os resultados obtidos indicam que alguns isolados de bactérias analisados apresentam potencial de exploração para produção de enzimas extracelulares e substâncias com ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Bactérias. Enzimas extracelulares. Substâncias antimicrobianas.

ENZYMATIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BACTERIA ISOLATED FROM A SOIL CONTAMINATED BY RESIDUAL VEGETABLE OIL

ABSTRACT

Soil bacteria are known to produce many biologically active substances and represent a rich source of enzymes and antimicrobial compounds. Hydrolytic enzymes are the main catalysts of industrial processes and those of microbial origin have a number of benefits. Due to the growing demand in this market, the search for new microorganisms producing hydrolytic enzymes has a high biotechnological potential. Antibiotics have revolutionized the treatment of infectious diseases, but their indiscriminate use has led to an increase in cases of antibiotic-resistant pathogens, which justifies the search for new sources of antimicrobial substances. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production capacity of extracellular enzymes and antimicrobial substances by twenty isolates of bacteria from a soil contaminated with residual vegetable oil. For this, solid media containing gelatin, carboxymethylcellulose, starch and residual vegetable oil were used to verify the production of proteases, cellulases, amylases and lipases, respectively, by the isolates. It was observed that 85% of the isolates presented extracellular enzymes production, with emphasis on the production of lipases, proteases and cellulases. The isolates belonging to the biotype of Gram-positive endospore-forming were more active in the production of all enzymes analyzed, with emphasis on O27 isolate. For the evaluation of the production capacity of antimicrobial metabolites, the isolates were subjected to the antagonistic activity tests using the paired culture method and antimicrobial susceptibility test against the standard strains of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Two isolates (O36 and O41), belonging to the biotype of gram-negative, presented positive results in the test of antagonistic activity against *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* and *C. albicans*. The antimicrobial activity of the same isolates evaluated in the antimicrobial susceptibility test showed inhibition of *C. albicans*. The results indicate that some isolates of bacteria analyzed have a potential for the production of extracellular enzymes and antimicrobial substances.

Keywords: Bacteria. Extracellular Enzymes. Antimicrobial Substances.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de aceleração enzimática de uma reação química pela diminuição da energia de ativação.....	17
Figura 2 – Mecanismo de ação de uma protease.....	19
Figura 3 – Estrutura química da molécula de celulose.....	20
Figura 4 – Representação esquemática da hidrólise de cadeias de celulose pela ação de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases.....	21
Figura 5 – Estrutura química dos componentes do amido: amilose e amilopectina.....	22
Figura 6 – Mecanismo de ação de uma lipase não-específica.....	24
Figura 7 – Propriedades bioativas dos metabólitos secundários microbianos.....	26
Figura 8 – Linha do tempo da descoberta dos principais antibióticos e quimioterápicos.....	28
Figura 9 – Disposição dos microrganismos em meio Mueller Hinton ágar no ensaio de atividade antagonista por cultura pareada.....	36
Figura 10 – Porcentagem (%) de isolados bacterianos que apresentaram atividade enzimática.....	41
Figura 11 – Visualização da atividade lipolítica de bactérias frente à irradiação das placas com luz ultravioleta (350 nm).....	42
Figura 12 – Atividade proteolítica dos isolados bacterianos.....	42
Figura 13 – Atividade celulolítica dos isolados bacterianos.....	43
Figura 14 – Atividade amilolítica dos isolados bacterianos.....	44

Figura 15 – Atividade proteolítica dos isolados O16, O18, O27 e O30.....	45
Figura 16 – Atividade celulolítica dos isolados O27, O30, O37, O47, O54, O55 e O59.....	46
Figura 17 - Atividade amilolítica dos isolados O27 e O65.....	46
Figura 18 – Atividade antimicrobiana dos isolados O36 e O41 no teste de atividade antagonista (inibição de crescimento das linhagens de referência).....	49
Figura 19 – Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana de <i>C. albicans</i> frente ao sobrenadante dos isolados O36 e O41.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização morfológica dos isolados de bactérias testados.....	38
Tabela 2 – Atividade proteolítica, celulolítica, amilolítica e lipolítica de bactérias.....	39
Tabela 3 – Zonas de inibição (mm) promovidas pelos isolados O36 e O41 no teste de atividade antagonista.....	47
Tabela 4 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) das linhagens de referência no ensaio de suscetibilidade antimicrobiana.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS.....	16
2.1.1	Proteases.....	18
2.2.2	Celulases.....	19
2.2.3	Amilases.....	21
2.2.4	Lipases.....	23
2.2	SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS.....	25
2.2.1	Resistência aos Antibióticos.....	27
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MICRORGANISMOS.....	34
4.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS.....	34

4.2.1 Atividade Proteolítica.....	34
4.2.2 Atividade Celulolítica.....	35
4.2.3 Atividade Amilolítica.....	35
4.2.4 Atividade Lipolítica.....	35
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS.....	35
4.3.1 Ensaio de Atividade Antagonista.....	36
4.3.2 Ensaio de Suscetibilidade Antimicrobiana (Antibiograma).....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES POR ISOLADOS BACTERIANOS.....	38
5.2 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	47
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O solo enquanto habitat é o ambiente mais complexo da Terra e estima-se conter um terço de toda a vida do planeta. É definido como a totalidade de seres vivos que o habitam (plantas, animais e microrganismos) e seu ambiente abiótico (rochas e minerais, água e ar). Sua complexidade se manifesta na existência de uma grande variedade de nichos ecológicos com propriedades particulares, permitindo que comunidades microbianas distintas possam se desenvolver. Um grama de solo pode conter quilômetros de hifas fúngicas e mais de 10^9 células de bactérias e arqueias, além de protozoários e vírus em menor proporção, corroborando o fato de que a pedosfera mantém uma rica biodiversidade de microrganismos.

Estes são considerados os principais agentes decompositores da matéria orgânica do solo, participando da ciclagem de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo, visto que, secretam enzimas extracelulares capazes de converter biopolímeros complexos do meio em nutrientes assimiláveis para manutenção do seu metabolismo e crescimento celular. Uma explicação para isso reside no fato de que a seleção natural favoreceu a síntese e secreção de enzimas extracelulares, em virtude de seu baixo custo de produção para a célula (1-5% do C e N assimilados) associado aos benefícios adquiridos – nutrientes minerais e orgânicos de baixo peso molecular, mostrando-se um mecanismo valioso à sobrevivência dos microrganismos que habitam o solo.

Enzimas extracelulares são amplamente utilizadas como catalisadores de processos industriais como aqueles envolvidos na produção de alimentos, bebidas, detergentes, tecidos, papel e biocombustíveis, devido a sua alta especificidade pelos substratos, rápida velocidade de reação e pelo fato de serem ecologicamente sustentáveis, diminuindo o uso de eletricidade e compostos químicos nocivos a seres humanos e ao meio ambiente, ao passo que não geram resíduos tóxicos. Cerca de 90% das enzimas utilizadas na indústria são microbianas, o que justifica a importância da realização de pesquisas voltadas ao isolamento de microrganismos, entre eles bactérias, para avaliação da produção de enzimas extracelulares de grande apelo industrial, tais como proteases, celulasas, amilases e lipases.

A distribuição dos microrganismos do solo é estritamente determinada por interações bióticas e abióticas, afetando a habilidade fisiológica de cada organismo de sobreviver e se reproduzir. Os recursos do meio, componentes físicos *capturados* pelos microrganismos (nutrientes e território, por exemplo), são limitados e uma vez *consumidos*, reduzem sua disponibilidade para outros indivíduos com necessidades semelhantes, gerando um fenômeno

conhecido como competição. Por esse motivo, muitos microrganismos produzem metabólitos secundários, que uma vez secretados no ambiente, lhes garantam vantagens competitivas em relação a outros organismos dentro de um mesmo nicho ecológico. Antibióticos são metabólitos secundários produzidos por uma ampla variedade de bactérias e fungos que desempenham um importante papel ecológico nas interações com outros organismos. Aventa-se que a habilidade para matar ou inibir o crescimento de organismos competidores tenha favorecido a seleção de microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas frente àqueles suscetíveis às mesmas. Essa hipótese pode ser corroborada pela existência de bactérias no solo altamente resistentes à antibióticos.

Desde sua descoberta em meados do século XX, os antibióticos de origem microbiana têm revolucionado o tratamento de doenças infecciosas pela redução das taxas de mortalidade, contribuindo para um aumento expressivo da expectativa de vida de milhões de pessoas. Entretanto, o uso crescente desses fármacos, associado a um aumento do número de internações e procedimentos cirúrgicos, ausência de programas de saneamento básico em países emergentes e uso descontrolado na agropecuária, por exemplo, têm levado a uma diminuição de sua eficácia, mediante o surgimento de patógenos humanos resistentes a um espectro cada vez maior de antibióticos. À vista disso, múltiplas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de descobrir novas substâncias antimicrobianas, a partir de fontes naturais, como àquelas produzidas por bactérias isoladas do solo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS

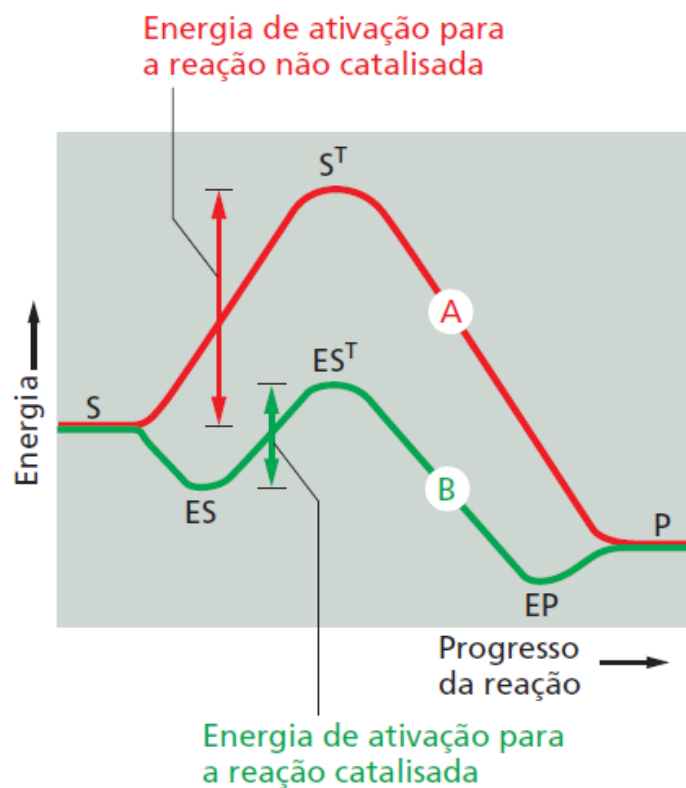
Muitas reações na natureza não procedem espontaneamente à taxas compatíveis com a vida. Algumas ocorrem muito rapidamente, liberando energia que não pode ser captada para processos celulares, enquanto outras se dão muito lentamente e à temperaturas elevadas. Estas últimas decorrem da existência de ligações químicas entre as moléculas, sendo necessária uma entrada inicial de energia, chamada energia de ativação, para que as reações possam acontecer espontaneamente. À vista disso, catalizadores são substâncias que promovem uma reação pela diminuição da energia de ativação requerida sem que sejam alterados no processo. Nos sistemas biológicos, as enzimas são proteínas especializadas que atuam como catalizadores de um amplo espectro de reações catabólicas e anabólicas à taxas biologicamente favoráveis (PLANTE et al., 2015).

As enzimas iniciam a catálise de uma reação química pela ligação temporária e específica dos substratos ao seu sítio catalítico, mantendo-os em uma conformação adequada que favoreça a ocorrência da reação. Isso acontece porque as moléculas do substrato passam por uma série de estados intermediários de geometria e distribuição eletrônica, chamados estados de transição, no interior do sítio catalítico antes de formarem os produtos finais da reação. As enzimas possuem uma maior afinidade pelos estados de transição do que pelas conformações estáveis do substrato, o que diminui drasticamente a energia de ativação e aumenta a probabilidade de que uma reação aconteça (Figura 1). Colisões energéticas aleatórias entre enzimas, substratos e moléculas ao redor fornecem a energia adicional para que um reagente seja convertido em produto (ALBERTS et al., 2017).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas são divididas em seis classes de acordo com as reações que catalisam: oxirredutases (EC 1), transferases (EC 2), hidrolases (EC 3), liases (EC 4), isomerases (EC 5) e ligases (EC6). A nomenclatura de cada enzima também se baseia no aspecto funcional, uma vez que, enzimas com diferentes estruturas, porém a mesma atividade catalítica, recebam o mesmo número 'EC' (Enzyme Commission). Enzimas extracelulares, como observado anteriormente, são produzidas por uma ampla variedade de microrganismos que habitam o solo. Pertencentes às classes das hidrolases e oxirredutases (PLANTE et al., 2015), elas garantem a sobrevivência dos

microrganismos e desempenham papéis ecológicos vitais. Hidrolases catalisam reações de clivagem pela adição de água às ligações covalentes específicas, como C-O, C-N, O-P e C-C (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019) e são consideradas as enzimas de maior importância industrial (BANERJEE; RAY, 2017; LIU; KOKARE, 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Figura 1 – Modelo de aceleração enzimática de uma reação química pela diminuição da energia de ativação.



Fonte: Alberts et al. (2017).

Notas:

⁽¹⁾ S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; S^T e ES^T = estado de transição; EP = complexo enzima-produto; P = produto.

Segundo Li et al (2012), 75% das enzimas utilizadas na indústria são hidrolíticas. Deste total, aproximadamente 64% das enzimas são produzidas por fungos, 26% por bactérias, 6% por animais e 4% por plantas (KAUR; GIL, 2019). A preferência por enzimas hidrolíticas microbianas decorre de uma série de vantagens. Primeiramente elas são mais ativas e estáveis que suas análogas animais e vegetais, podendo ser produzidas em grande quantidade e em larga

escala, dependendo do microrganismo escolhido. Segundo, são secretadas extracelularmente, o que facilita o processo de purificação. Terceiro, apresentam elevada especificidade pelos substratos, sejam eles orgânicos ou sintéticos. Quarto, possuem baixo custo de produção, não apresentam toxicidade, podem ser reutilizadas e são ecologicamente sustentáveis. Por último, microrganismos dispõem de facilidade no manejo, multiplicam-se rapidamente sob condições controladas e são suscetíveis à manipulação genética, além de serem naturalmente uma rica fonte de enzimas hidrolíticas (LIU; KOKARE, 2017; LADICS; SEWALT, 2018; KAUR; GIL, 2019; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019; SINGH; KUMAR, 2019).

Segundo previsão do relatório “Industrial Enzymes – A Global Market Overview” (2018) publicado pela empresa Research and Markets, o mercado mundial de enzimas deve movimentar 5,6 bilhões de dólares em 2018 e cerca de 7,7 bilhões até 2024. Ademais, foi apontado que a indústria de alimentos e bebidas foi o setor que mais utilizou enzimas no ano de 2017, movimentando 1,4 bilhões de dólares, seguido pela indústria de biocombustíveis (969,3 milhões) e detergentes (754,4 milhões). Proteases, celulasas, amilases e lipases estão entre as enzimas hidrolíticas mais utilizadas pela indústria (GUERRAND, 2018; LIU; KOKARE, 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019) e a busca por novos microrganismos produtores dessas enzimas apresenta elevado potencial biotecnológico.

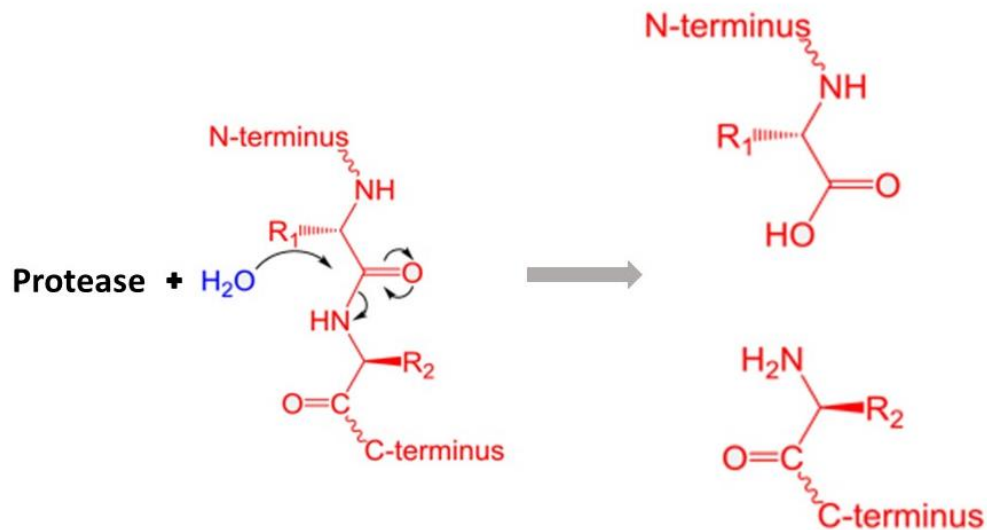
2.1.1 Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas pela quebra de suas ligações peptídicas (Figura 2). São classificadas quanto ao mecanismo de ação em endopeptidases (EC 3.4.21 – 3.4.24, 3.4.99) e exopeptidases (EC 3.4.11 – 3.4.19). Endopeptidases clivam ligações peptídicas de aminoácidos localizados no interior das cadeias polipeptídicas, enquanto exopeptidases possuem afinidade pelas regiões amino-terminal e carboxil-terminal de aminoácidos localizados nas extremidades de tais cadeias. Podem ainda ser agrupadas em seis famílias diferentes - proteases de serina, proteases de treonina, proteases de cisteína, proteases de ácido aspártico, metaloproteases e proteases de ácido glutâmico, como também, de acordo com a faixa de pH em que atuam – ácidas, neutras e alcalinas (MCDONALD, 1985; CONTESINI et al., 2017; SHARMA et al., 2017; AGUILAR; SATO, 2018; CHEW et al., 2019; GURUMALLESH et al., 2019).

Proteases contribuem com aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas hidrolíticas, sendo aplicadas em sua maioria na indústria de detergentes (KUMARI et al., 2015; PAUL et al., 2016). Algumas bactérias do gênero *Bacillus* secretam uma grande quantidade de

proteases alcalinas (mais de 20 g/L), sendo as maiores produtoras destas enzimas em nível comercial (HARWOOD; CRANENBURGH, 2008; PANT et al., 2015; CONTESINI et al., 2017;). Algumas de suas aplicações envolvem a formulação de detergentes para remoção de manchas proteicas em roupas, facilitando o processo de lavagem, sem no entanto danificar o tecido e a remoção de pelos em carcaças de couro de animais, melhorando a resistência e qualidade do produto, além de permitir o reaproveitamento dos pelos para confecção de fibras sintéticas, aminoácidos para a indústria farmacêutica e de cosméticos, biogás e biofertilizantes, o que não é possível quando se utiliza sulfeto de sódio, considerado um poluente ambiental. Também são muito utilizadas na indústria de alimentos para o amaciamento de carnes, hidrólise do glúten para formulação de alimentos e bebidas, bem como produção e maturação de queijos. Na indústria farmacêutica, proteases são empregadas na produção de peptídeos bioativos com ação antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e antitumoral, além de serem usadas no tratamento de deficiências enzimáticas (PALIWAL et., 1994; DANQUAH; AGYEI, 2012; BANERJEE; RAY, 2017; CONTESINI et al., 2017; GURUMALLESH et al., 2019).

Figura 2 – Mecanismo de ação de uma protease.



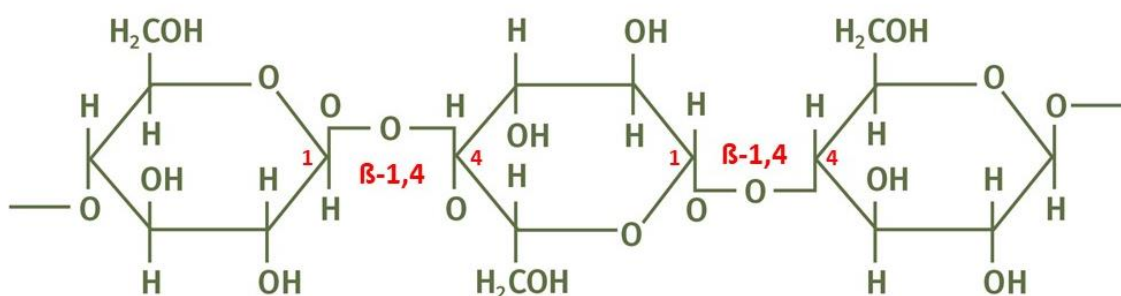
Fonte: Adaptado de Shafee (2013).

2.1.2 Celulases

Celulose é o biopolímero mais abundante na superfície da Terra, sendo um dos produtos formados na fotossíntese (ZHANG et al., 2006; RASTOGI et al., 2010). Apesar de ser

produzida por algumas bactérias, ela é encontrada majoritariamente na parede celular de plantas associada à hemicelulose e lignina, e contribui com 35-50% do peso seco vegetal (MOHITE; PATIL, 2016; BEHERA et., 2017). É formada pela união de moléculas de glicose através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 3), criando cadeias com 15.000 - 25.000 unidades de glicose, cada. Estas, se alinham paralelamente umas às outras, por meio de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, formando uma estrutura paracristalina, com regiões amorfas e cristalinas alternadas (NOTLEY et al., 2004; SUKUMARAN et al., 2005; JUTURU, WU, 2014; MOHITE; PATIL, 2016).

Figura 3 – Estrutura química da molécula de celulose.



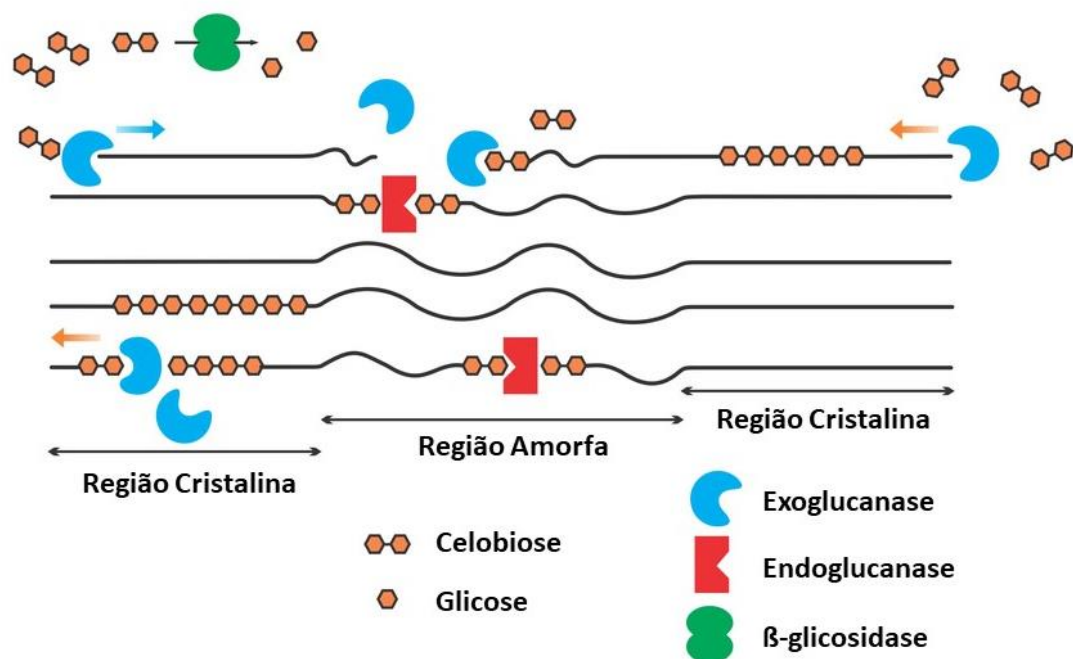
Fonte: Adaptado de <https://www.cellulforce.com/en/products/cellulose-nanocrystals>.

Em virtude de sua complexidade, a hidrólise completa da celulose é feita por meio da ação conjunta de três classes de enzimas, nomeadas de acordo com seu mecanismo de ação e região do substrato que catalisam: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases [glicanohidrolases (EC 3.2.1.74) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.91)] e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (MOHITE; PATIL, 2016; SHARMA; YAZDANI, 2016). Endoglucanases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas das regiões amorfas da molécula de celulose, enquanto exoglucanases possuem afinidade pelas ligações glicosídicas das regiões cristalinas, clivando-as. A ação conjunta dessas duas enzimas leva à formação de moléculas de celobiose, que quebradas pelas β -glicosidases, liberam glicose, como esquematizado na Figura 4 (ZHANG et al., 2006; MOHITE; PATIL, 2016).

Celulases são produzidas por uma ampla variedade de microrganismos, com destaque para fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* e bactérias dos gêneros

Cellulomonas, *Thermobifida* e *Clostridium* (KUHAD et al., 2011; MOHITE; PATIL, 2016). Celulases apresentam elevado potencial biotecnológico para uso em uma série de processos industriais. Na indústria de alimentos, celulases podem ser utilizadas para extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, reduzindo a viscosidade e aumentando a estabilidade dos mesmos. Na indústria têxtil, celulases são comumente empregadas no tratamento da lã e amaciamento do algodão, além da fabricação de jeans com aparência desbotada ou envelhecida. Nas biorrefinarias, enzimas celulolíticas são usadas na conversão de biomassa celulósica, como a de resíduos agroindustriais, em açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol. Além disso, celulases são amplamente utilizadas na fabricação de papel, detergentes e ração animal (JUTURU; WU, 2014; MOHITE; PATIL, 2016; BEHERA et., 2017; LIU; KOKARE, 2017).

Figura 4 – Representação esquemática da hidrólise de cadeias de celulose pela ação de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas.



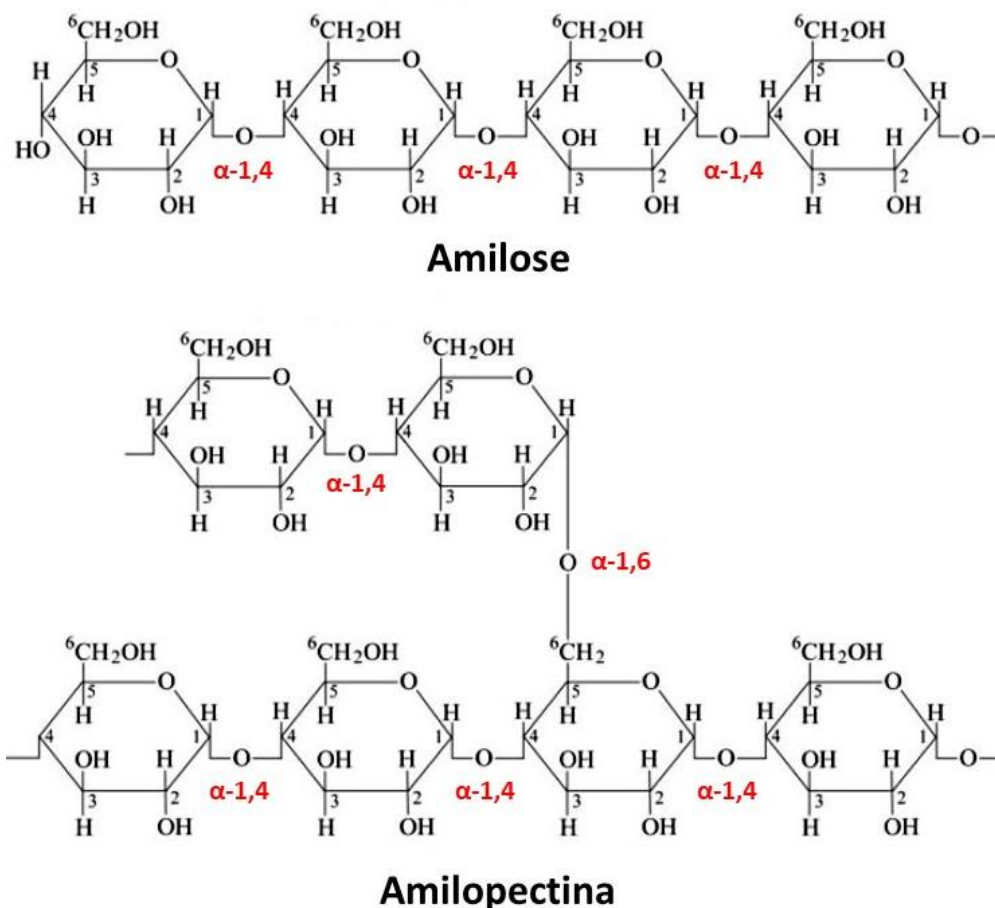
Fonte: Adaptado de Akhtar et al. (2016).

2.1.3 Amilases

Amido é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. Produzido pelas plantas, é armazenado em frutas, sementes, rizomas e tubérculos na forma de

grânulos semicristalinos compostos por dois tipos de molécula: amilose e amilopectina (Figura 5). Amilose é um polímero linear, insolúvel em água, formado por 100-10.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e compõe cerca de 20-27% do amido. Amilopectina é um polímero ramificado, solúvel em água, formado por cadeias lineares de 10-60 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,4, ligadas à cadeias de 15-45 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,6 e compõe aproximadamente 75-85% do amido (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018).

Figura 5 – Estrutura química dos componentes do amido: amilose e amilopectina.



Fonte: Adaptado de Ghanbarzadeh e Almasi (2013).

As enzimas que catalisam a hidrólise do amido são chamadas de amilases e são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em α -amilases (EC 3.2.1.1), β -amilases

(EC 3.2.1.2) e glicoamilases (EC 3.2.1.3). Podem também ser classificadas, quanto à região do substrato que catalisam, em endoamilases e exoamilases. As α -amilases clivam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 de forma aleatória no interior das moléculas de amido, sendo, portanto, endoamilases. As β -amilases também hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo α -1,4, mas o fazem nas extremidades das moléculas de amido, sendo, deste modo, exoamilases. Por fim, as glicoamilases são as únicas enzimas capazes de quebrar ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e α -1,6 e também são do tipo exoamilases (ABD-ELHALEM et al., 2015; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018).

Amilases são produzidas por uma grande variedade de organismos, vista a importância nutritiva do amido, (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Dentre os microrganismos produtores, bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são os mais importantes (ABD-ELHALEM et al., 2015; GOPINATH et al., 2017; LIU; KOKARE, 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). Amilases representam 15-25% do mercado mundial de enzimas hidrolíticas (MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019), apresentando inúmeras aplicações industriais, como seu uso na formulação de detergentes em associação com outras hidrolases, aumentando sua capacidade de remover manchas. Na indústria têxtil, o amido é usado para proteção dos fios durante o processamento dos tecidos, sendo posteriormente removido com auxílio de enzimas amilolíticas. O amido também é utilizado para revestimento do papel nas indústrias de papel e celulose, melhorando sua qualidade e capacidade de apagamento. Para isso, α -amilases são empregadas na diminuição de sua viscosidade antes de vir a revesti-lo. Por fim, a indústria de alimentos e bebidas emprega α -amilases e glicoamilases para produção de glicose, frutose e oligossacarídeos, utilizados na grande maioria dos alimentos e bebidas industrializados, seja para adoçar ou estimular processos de fermentação (VAN DER MAAREL et al., 2002; GUPTA et al., 2003; KUDDUS; ROOHI, 2010; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; CONTESINI et al., 2017; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018).

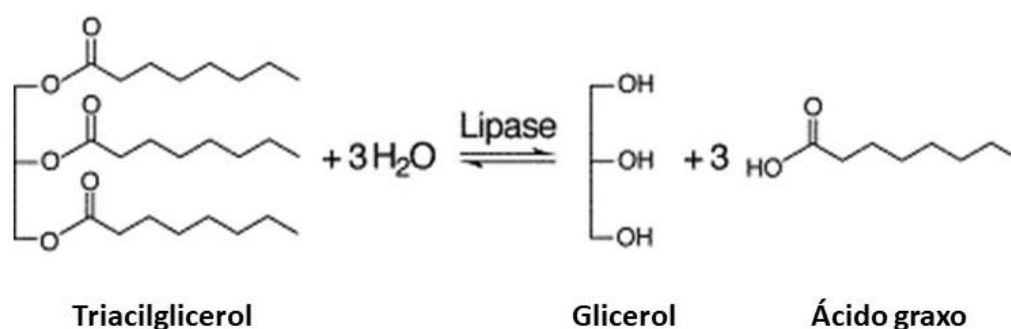
2.1.4 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster de triacilgliceróis em meio aquoso (interface óleo-água) liberando moléculas de diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol (BORRELLI; TRONO, 2015; FERRAZ et al., 2018; JAVED et al., 2018). Também são capazes de catalisar reações inversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), aminólise e lactonização, em condições de pouca água (PAQUES; MACEDO, 2006; HASAN et al., 2009;

BORRELLI; TRONO, 2015). Diferenciam-se das esterases, por hidrolisarem ésteres de triacilgliceróis de cadeia longa (com mais de dez átomos de carbono), e, portanto, insolúveis em água, enquanto que as primeiras catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia curta, solúveis em meio aquoso (CARVALHO, 2012; FERRAZ et al., 2018).

A atividade enzimática das lipases depende de três fatores principais: posição do ácido graxo no *esqueleto* de glicerol, comprimento da cadeia do ácido graxo e presença de insaturações. Desta forma, lipases apresentam regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (JAEGER; EGGERT, 2002; BORRELLI; TRONO, 2015; FERRAZ et al., 2018). À vista disso, elas podem ser classificadas em três grupos: lipases não-específicas, lipases 1,3-específicas e lipases ácido graxo-específicas. Lipases não-específicas catalisam a hidrólise completa de triacilgliceróis, podendo formar monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Figura 6). Lipases 1,3-específicas possuem especificidade pelos ésteres localizados nas posições 1 e 3 de triacilgliceróis, gerando produtos de reação diferentes daqueles formados pelas lipases não-específicas. Por fim, lipases ácido graxo-específicas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis que possuam insaturações do tipo *cis* entre os átomos de C-9 e C-10 das cadeias de ácidos graxos (BORRELLI; TRONO, 2015; FERRAZ et al., 2018; JAVED et al., 2018).

Figura 6 – Mecanismo de ação de uma lipase não-específica.



Fonte: Adaptado de Jaeger e Reetz (1998).

Lipases são as enzimas hidrolíticas mais utilizadas industrialmente depois de proteases e amilases, ocupando a terceira colocação em vendas no mercado mundial de enzimas (ÜLKER

et al., 2011; CARVALHO et al., 2017). Fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor* e bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* são os principais produtores de lipases comerciais (GUPTA; GUPTA, RATHI, 2004; TREICHEL et al., 2010). A indústria de detergentes é o setor que mais emprega enzimas lipolíticas, consumindo aproximadamente 1000 toneladas de lipases todos os anos (PARRA et al., 2015). Isso decorre de sua capacidade de hidrolisar moléculas de gordura, favorecendo a solubilização das mesmas em água, e desta forma, facilitar o processo de limpeza. Na indústria de alimentos, são utilizadas para obtenção de álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, a partir da hidrólise de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos, conferindo aroma e sabor característicos. São também utilizadas para hidrólise da gordura do leite e aceleração do processo de maturação de queijos (MESSIAS et al., 2011; GURUNG et al., 2013). Outras aplicações envolvem a produção de cosméticos, síntese de medicamentos, tratamento do couro e produção de biodiesel (LIU; KOKARE, 2017; JAVED et al., 2018).

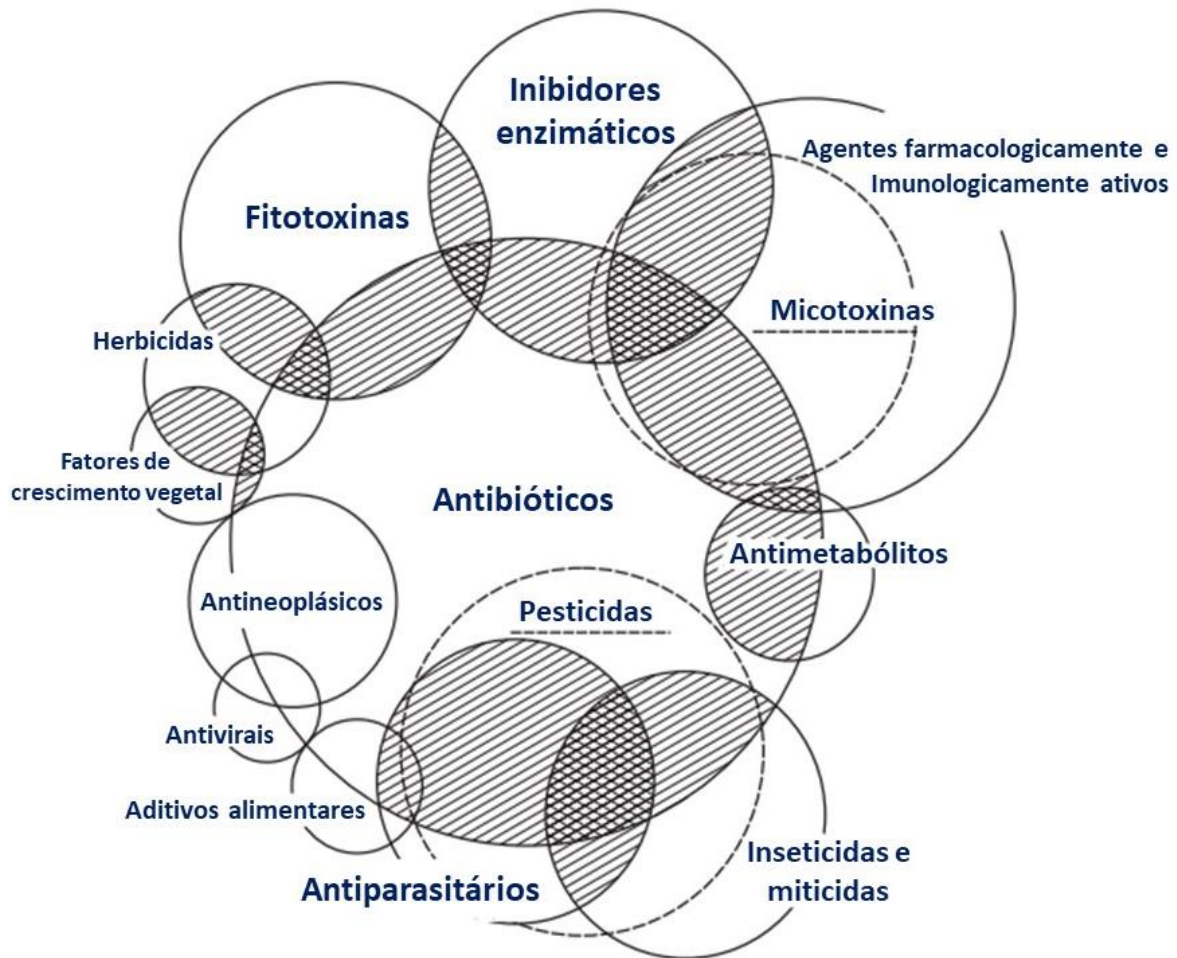
2.2 SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR MICROORGANISMOS

O solo é um ambiente altamente complexo e heterogêneo, permitindo a existência de uma grande diversidade de microrganismos. Estes, para se adaptar às frequentes mudanças impostas pelo meio (variação na disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e umidade), desenvolveram mecanismos de resposta, como a produção de metabólitos secundários, que apesar de não estarem diretamente envolvidos nos processos de crescimento e reprodução celular, desempenham importantes papéis de defesa, regulação e comunicação (TYC et al., 2017). Deste modo, sinalização intra e extracelular, modulação da replicação e transcrição do material genético, transferência gênica, transporte e solubilização de metais são algumas de suas funções (DEMAIN; FANG, 2001; BÉRDY, 2012).

Ademais, metabólitos secundários microbianos podem apresentar atividades químicas e fisiológicas diversas, como resultado de suas interações com outros microrganismos, plantas e animais. Assim, eles podem desempenhar diversos papéis nas aplicações biotecnológicas e terapêuticas atuando como antibióticos, fatores de crescimento vegetal, herbicidas, fitotoxinas, hormônios, feromônios, inseticidas, antiparasitários, moluscicidas, inibidores enzimáticos, neurotransmissores, imunossupressores/imunoestimulantes, antiinflamatórios, antioxidantes, hipocolesterolêmicos e agentes antineoplásicos (BÉRDY, 2005, 2012; DEMAIN; SANCHEZ, 2009). À vista disso, o isolamento de microrganismos do solo para realização de ensaios de

bioatividade é uma importante área de pesquisa, em virtude da multiplicidade de funções que essas substâncias podem desempenhar (Figura 7).

Figura 7 – Propriedades bioativas dos metabólitos secundários microbianos.



Fonte: Adaptado de Bérdy (2012).

Notas:

(¹) Alguns metabólitos exibem três ou mais atividades biológicas, o que explica as sobreposições.

(²) Neste artigo, antibióticos incluem antifúngicos e antiprotozoários.

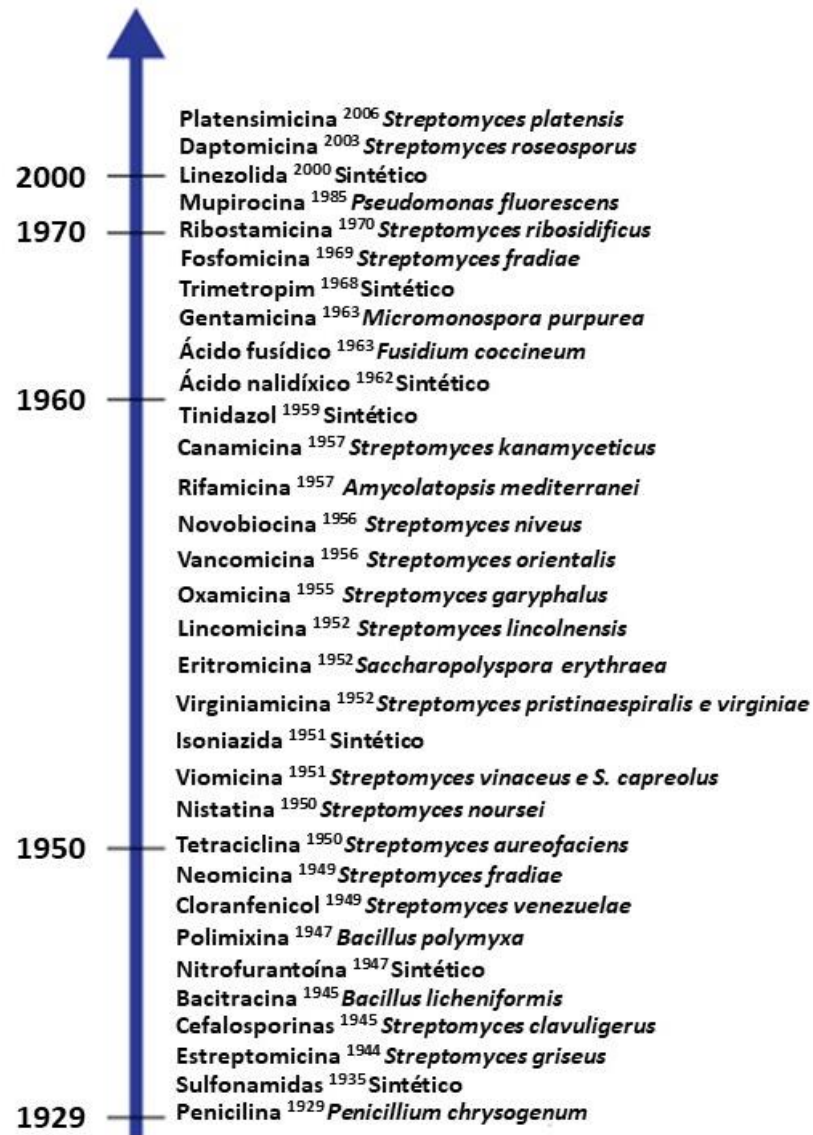
Como exemplo, a utilização de antibióticos no combate a infecções microbianas, associada às melhorias das condições sanitárias, de moradia e alimentação e juntamente com o advento de programas de vacinação em massa, diminuiram expressivamente a taxa de mortalidade de doenças infecciosas letais, disseminadas no passado (PROCÓPIO et al., 2012). Microrganismos produzem substâncias antimicrobianas com o objetivo de eliminar ou inibir o crescimento de outros microrganismos competidores. Sua produção é o resultado direto de

interações bióticas específicas, uma vez que, bactérias do solo, por exemplo, conseguem distinguir microrganismos competidores, de modo a secretar substâncias antimicrobianas específicas para os mesmos (KINKEL et al., 2013; TYC et al., 2017). Ademais, em concentrações subinibitórias, esses metabólitos podem atuar como moléculas-sinal para as bactérias produtoras, modulando sua expressão gênica, induzindo motilidade e estimulando a esporulação e a produção de biofilme (TYC et al., 2017).

O termo antibiótico foi cunhado pelo microbiologista Selman Waksman, em 1942, para descrever qualquer substância produzida por microrganismos que cause morte ou inibição do crescimento de outros. No entanto, sua definição excluía os quimioterápicos (antimicrobianos sintéticos) e os compostos naturais não-microbianos (ZIMDAHL, 2015; MOHR, 2016). Atualmente, alguns autores definem antibióticos como substâncias químicas sintéticas ou naturais (produzidas por microrganismos e plantas) que causam morte ou controlam o crescimento de bactérias e outros microrganismos, tais como, fungos e protozoários (ZIMDAHL, 2015; CHANDRA; KUMAR, 2017). Estes últimos, no entanto, necessitam de antimicrobianos específicos, uma vez que diferem estruturalmente e metabolicamente das bactérias (MADIGAN et al., 2016).

A penicilina foi o primeiro antibiótico seguro para administração humana a ser descoberto, tendo sua produção em massa iniciada no ano de 1939, graças às contribuições de Alexander Fleming, Howard Florey e Ernest Chain, que em 1945, dividiram o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta da penicilina e de sua eficácia clínica, sendo a primeira droga eficaz contra as bactérias Gram-positivas, como aquelas causadoras da sífilis e gonorreia (ZIMDAHL, 2015; MOHR, 2016). Muitas outras substâncias antimicrobianas foram descobertas desde então, principalmente entre as décadas de 1940 – 1970, quando as principais classes de antibióticos foram estabelecidas (CHANDRA; KUMAR, 2017), como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Linha do tempo da descoberta dos principais antibióticos e quimioterápicos.



Fonte: Adaptado de Procópio et al. (2012).

Segundo Watve et al. (2001), 80% dos antibióticos disponíveis no mercado são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, corroborando os dados apresentados na Figura 8. Um antibiótico ideal não deve interferir no funcionamento normal de uma célula hospedeira, mas induzir a morte do microrganismo-alvo pela alteração do seu metabolismo, seja inibindo uma enzima, ácido nucleico, polissacarídeo ou qualquer outro metabólito crítico para sua sobrevivência (SHALLES, 2010). Baseado neste princípio, antibióticos podem ser

divididos em quatro grupos, de acordo com seu mecanismo de ação (KOHANSKI; DWYER; COLLINS 2010; PROCÓPIO et al., 2012):

I. Inibidores da replicação e transcrição celular: antibióticos que se ligam a componentes importantes dos processos de replicação e transcrição do material genético bacteriano, impedindo sua ocorrência e resultando em morte celular. A ciprofloxacina, por exemplo, liga-se à enzima topoisomerase logo após a clivagem do DNA, impedindo o religamento das fitas, enquanto a rifamicina bloqueia o canal formado pelo complexo DNA–RNA polimerase, impedindo a inicialização da transcrição;

II. Inibidores da síntese proteica: a tradução do mRNA envolve a participação dos ribossomos, compostos pelas subunidades 50S e 30S, que são alvos da maioria dos antibióticos deste grupo. Antibióticos como eritromicina e azitromicina bloqueiam a subunidade 50S impedindo a formação da cadeia polipeptídica, enquanto gentamicina e tetraciclina bloqueiam a subunidade 30S, impedindo a ligação do tRNA;

III. Inibidores da síntese da parede celular: as paredes celulares de bactérias apresentam uma camada rígida chamada peptídeoglicano. É formado pelos açúcares N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, que por sua vez, unem-se a alguns aminoácidos por meio de ligações peptídicas cruzadas. Antibióticos como penicilina, vancomicina e daptomicina impedem a biossíntese do peptídeoglicano pela inibição da formação das ligações peptídicas cruzadas, levando à lise celular;

IV. Perturbadores da permeabilidade da membrana plasmática: a membrana plasmática é uma barreira semipermeável responsável pela troca de íons, água e nutrientes entre os ambientes intra e extracelular. É formada majoritariamente por fosfolípidos e proteínas. Antibióticos como polimixina, tirocidina e valinomicina promovem a ruptura da membrana plasmática por se intercalarem entre os fosfolípidos, formando poros, por meio dos quais ocorre a troca indesejada de íons e metabólitos microbianos.

2.2.1 Resistência aos Antibióticos

Doenças infecciosas continuam sendo umas das maiores causas de mortalidade ao redor do mundo e estima-se que 17 milhões de pessoas morram anualmente, principalmente crianças e idosos (CHANDRA; KUMAR, 2017), fazendo com que os antimicrobianos estejam entre os fármacos mais utilizados na medicina humana (CDC, 2013). Entre os anos 2000-2010, o consumo mundial de antibióticos cresceu 35%, partindo de aproximadamente 52 bilhões de unidades (pílulas, cápsulas ou ampolas) para 70 bilhões de unidades. Brasil, Rússia, Índia,

China e África do Sul (BRICS) contribuíram com 75% desse crescimento. Ademais, Índia, China e Estados Unidos foram, respectivamente, os maiores consumidores de antibióticos no mundo em 2010 (VAN BOECKEL et al., 2015).

Segundo levantamento realizado na Índia, 20% do consumo total de antibióticos se deu em hospitais e clínicas, enquanto 80% ocorreu na comunidade, seja prescrito por profissionais de saúde, seja comprado sem receita médica. Estima-se ainda que mais da metade desse consumo não seja apropriado (KOTWANI; HOLLOWAY, 2011). De modo similar, considera-se que a prescrição de 50% dos antimicrobianos utilizados nos Estados Unidos seja desnecessária (CDC, 2013). Além de seu uso na medicina humana, antibióticos também são amplamente empregados na pecuária, uma vez que, auxiliam no crescimento dos rebanhos por motivos ainda desconhecidos (ARUN et al., 2017). Segundo Van Boeckel et al. (2015), 63 mil toneladas de antibióticos foram usadas em 2010 para manutenção da produtividade da atividade pecuarista, o que corresponde a mais de 60% da produção mundial de antimicrobianos por ano, que é de 100 mil toneladas (BBOSA et al., 2014). Para se ter uma ideia, 80% da produção anual de antibióticos nos Estados Unidos é consumida pela pecuária (VAN BOECKEL et al., 2015).

À vista disso, o uso excessivo e descontrolado desses fármacos na medicina humana e principalmente na pecuária, tem levado ao surgimento de microrganismos patogênicos resistentes a um amplo espectro de antimicrobianos comerciais, sendo considerado um grave problema de saúde pública (LAXMINARAYAN et al., 2013; HOLMES et al., 2016). Estima-se que a cada ano, bactérias resistentes a antibióticos provoquem mais de dois milhões de casos de infecção nos Estados Unidos, levando mais de 23 mil pessoas à morte (CDC, 2017), enquanto que na Europa, anualmente, o número de casos chega a 670 mil, com aproximadamente 33 mil mortos (CASSINI et al., 2019). O fenômeno da resistência aos antibióticos varia de acordo com o país e continente analisados, em virtude das fronteiras geográficas de algumas doenças, padrões de consumo dos antimicrobianos e qualidade do acesso aos mesmos (O'NEIL, 2014). Segundo relatório publicado pela OMS (2018), os microrganismos resistentes de maior preocupação mundial são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella spp.*

Microrganismos resistentes à substâncias antimicrobianas existem desde muito antes da produção em massa de fármacos antimicrobianos. A maioria dos antibióticos disponíveis no mercado como penicilina, eritromicina e tetraciclina são produtos do metabolismo secundário microbiano com a função de causar morte ou inibir o crescimento de outros microrganismos em uma luta pela sobrevivência (SHALLES, 2010). Como reflexo, eles desenvolveram mecanismos de defesa que vão desde a produção de enzimas capazes de neutralizar antibióticos

até a modificação de alvos farmacológicos (mutação) para que não sejam reconhecidos pelas drogas, bem como bombas que promovem o efluxo das mesmas para fora da célula, entre outros (HASNAIN et al., 2017).

Apesar disso, uma série de evidências apontam que a principal causa de resistência de patógenos aos fármacos antimicrobianos seja resultado de sua má utilização pelas atividades humanas. Como exemplo, a análise de uma coleção de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* isoladas entre 1917 e 1954, constatou que 24% dos isolados eram pertencentes ao gênero *Proteus* e todos possuíam plasmídeos conjugativos e deste total, 2% eram resistentes à tetraciclina. Os demais isolados da coleção, pertenciam aos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* e *Klebsiella* e não apresentaram resistência a essa droga. (DATTA; HUGHES, 1983 apud HAINAN et al., 2017). Entretanto, durante a década de 1950, linhagens de *E. coli* e *Shigella* resistentes à tetraciclina começaram a ser descritas (AKASAKI et al., 1963 apud HAINAN et al., 2017). Esse resultado sugere que genes de resistência a antibióticos presentes no ambiente são um reflexo direto do aumento no consumo de antibióticos pela população nos últimos 60 anos (HAINAN et al., 2017).

Em 1989, hospitais americanos vivenciaram um surto de bactérias do gênero *Enterococcus* resistentes à vancomicina, um dos antibióticos mais utilizados na época. Descobriu-se que a resistência foi originada de rebanhos europeus alimentados com baixas concentrações de avoparcina, um análogo da vancomicina, para promover o crescimento. Análises moleculares constataram que os genes de resistência à vancomicina encontradas nas linhagens de *Enterococcus* que infectaram as pessoas eram idênticos àqueles encontrados em microrganismos que habitavam áreas de rebanhos alimentados com avoparcina, tendo seu uso proibido na Europa em 1997 (SHALLES, 2010). Hoje, é bem estabelecido que animais, alimentos de origem animal e vegetais cultivados em solos enriquecidos com esterco animal podem transmitir microrganismos resistentes a antibióticos para seres humanos (VAN BOECKEL et al., 2015; ARUN et al., 2017).

Em virtude dos fatos mencionados, pode-se observar que a evolução e propagação de patógenos bacterianos resistentes à antibióticos é uma crescente ameaça à saúde pública global. Assim sendo, pesquisas voltadas para a prospecção de microrganismos capazes de produzir novos compostos antimicrobianos são essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. Além da aplicação de compostos naturais, existem várias abordagens químicas e de biologia molecular para o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas, na base de moléculas naturais que possam ser usadas como protótipos para novos antibióticos (GUIMARÃES et al., 2010). O solo, apesar de recentes pesquisas de prospecção de produtores de substâncias

bioativas dos ambientes extremos, representa ainda uma fonte promissora de bactérias produtoras de novos antibióticos (GUIMARÃES et al., 2010; HOVER et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas extracelulares e substâncias antimicrobianas por bactérias isoladas de um solo utilizado para o descarte experimental de óleo vegetal residual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a produção de proteases, celulasas, amilases e lipases pelos isolados bacterianos através da degradação de gelatina, carboximetilcelulose, amido e óleo vegetal residual, respectivamente;

b) Analisar atividade antagonista *in vitro* dos isolados bacterianos frente linhagens de referência de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;

c) Avaliar a sensibilidade de *E. coli*, *B.cereus*, *S. aureus* e *C. albicans* frente às substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados no teste de antibiograma.

d) Selecionar os isolados mais promissores para produção de enzimas e substâncias antimicrobianas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Analisou-se vinte isolados bacterianos provenientes de um solo utilizado para descarte de óleo vegetal residual no município de João Pessoa (PB), mantidos sob estoque em meio ágar nutriente semissólido (Nutrient Agar, Kasvi) e pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS

Os isolados foram testados quanto à produção das enzimas protease, celulase, amilase e lipase utilizando os meios de cultura sólidos contendo os respectivos substratos para cada enzima: gelatina, carboximetilcelulose (CMC), amido e óleo de cozinha residual. Os experimentos foram realizados em triplicata e os isolados foram previamente incubados, para crescimento, em meio sólido ágar nutriente por 48h a 30°C. Ao final dos testes, os halos de degradação dos substratos foram medidos em mm e os resultados expressos em média aritmética.

4.2.1 Atividade Proteolítica

Para detecção de proteases, foi usado o meio descrito por Smibert e Krieg (1994) contendo 20,0 g/L de gelatina; 0,1 g/L de NaCl; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,19 g/L de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; um traço de $FeSO_4$ e 15 g/L de ágar bacteriológico (Kasvi); pH 7,0. Os isolados foram incubados por 48h a 30°C e em seguida, foi adicionada uma alíquota da solução de Frazier (12,0 g de $HgCl_2$; 16 ml de HCl concentrado e 80 ml de água destilada). Esta, desnatura as proteínas da gelatina, que precipitam, dando ao meio uma coloração esbranquiçada e revelando os halos resultantes de sua hidrólise.

4.2.2 Atividade Celulolítica

A produção de celulases foi verificada através do meio desenvolvido por Teather e Wood (1982) contendo 1,0 g/L de CMC; 0,5 g/L de NaNO_3 ; 1,0 g/L de K_2HPO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L de extrato de levedura (Kasvi) e 15,0 g/L de ágar bacteriológico; pH 7,0. Após 96h de incubação a 30°C, os halos resultantes da hidrólise do substrato foram revelados pela adição da solução de Lugol (1,0 g de I_2 ; 2,0 g de KI e 300 ml de água destilada).

4.2.3 Atividade Amilolítica

Para detecção de amilases, utilizou-se o meio proposto por Smibert e Krieg (1994) contendo 2,0 g/L de amido; 0,5 g/L de NaNO_3 ; 1,0 g/L de K_2HPO_4 ; 0,01 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 15 g/L de ágar bacteriológico; pH 7,0. Os isolados foram incubados por 96h a 30°C e a formação de halos, decorrente da hidrólise do amido, foi verificada pela adição da solução de Lugol (ver item 3.2.2) diluída cinco vezes.

4.2.4 Atividade Lipolítica

Utilizou-se, para produção de lipases, uma adaptação do meio descrito por Kouker e Jaeger (1987), composto pelo corante Rodamina B (0,050 g de Rodamina B; 50 ml de água destilada), emulsão de óleo (30 ml de óleo de cozinha residual; 50 ml de água destilada e 250 μL de Tween 80) e meio básico [6,0 g de caldo nutriente (HiMedia); 1,25 g de extrato de levedura (HiMedia); 10,0 g de ágar bacteriológico e 450 ml de água destilada)]; pH 7,0. Após 96 h de incubação a 30°C, a atividade lipolítica foi verificada pela formação de halos alaranjados e fluorescentes através da irradiação das placas por luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 350 nanômetros (nm).

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS

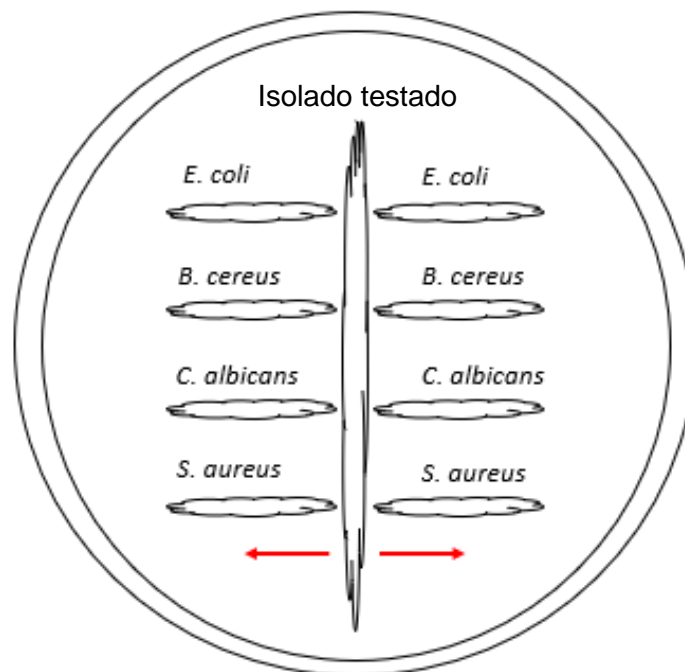
Avaliou-se o potencial inibitório dos isolados bacterianos testados (capacidade de produzir substâncias antimicrobianas) frente à quatro linhagens de referência provenientes da American Type Culture Collection – ATTC (NewProv) e Coleção de Culturas Tropicais – CCT

(Fundação André Tosselo): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (CCT 0198), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.3.1 Ensaio de Atividade Antagonista

O teste de antagonismo microbiano foi realizado pelo método de cultura pareada, no qual o agente antagonista (isolado testado) é incubado juntamente com o microrganismo que se deseja inibir (linhagem de referência). Para este fim, cada isolado foi cultivado em meio sólido Mueller Hinton Ágar, específico para testes de atividade antimicrobiana, na forma de um traço vertical de 7cm de comprimento no centro da placa. Após 48 h de incubação a 30°C, as linhagens de referência foram inoculadas junto ao isolado testado na forma de traços horizontais de 2 cm de comprimento (Figura 1). Após o período de incubação, 24 - 48 h, observou-se o crescimento de *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* e *C. albicans* analisando a ocorrência de inibição das linhagens de referência.

Figura 9 – Disposição dos microrganismos em meio Mueller Hinton ágar no ensaio de atividade antagonista por cultura pareada.



Fonte: Autoria própria (2019).

Notas:

⁽¹⁾ As setas vermelhas indicam o sentido da inoculação das linhagens de referência utilizando a alça bacteriológica.

4.3.2 Ensaio de Susceptibilidade Antimicrobiana (Antibiograma)

A sensibilidade das linhagens de referência frente às substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados bacterianos testados foi aferida pelo ensaio de suscetibilidade antimicrobiana por difusão em meio sólido, adaptado de Kirby e Bauer (1966). Deste modo, as bactérias de interesse foram inoculadas em balões volumétricos contendo 100 mL de Caldo Nutriente (HiMedia), incubadas por 96 h a 37° C e então centrifugadas à 8.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 min à temperatura ambiente para obtenção do sobrenadante.

As linhagens de referência foram incubadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo nutriente por 24-48 h - 37° C e então espalhadas na superfície do meio MHA com auxílio de um swab estéril embebido na cultura. As placas ficaram em repouso por cerca de 30 min e em seguida, fez-se poços de 9 mm de diâmetro no meio, onde foram colocados 50 µL do sobrenadante da cultura do isolado testado.

Após 24 h de incubação a 37° C, os halos de inibição do crescimento das linhagens de referência foram medidos em mm. Os experimentos descritos nos itens 3.3.1 e 3.3.2 foram feitos em duplicata. Para os ensaios de atividade antagonista e suscetibilidade antimicrobiana, os isolados e linhagens de referência foram previamente inoculados em meio sólido BHI, pH 7,4 e incubados por 48 h a 30° C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES POR ISOLADOS BACTERIANOS

Determinou-se a capacidade enzimática dos isolados bacterianos listados na Tabela 1 em hidrolisar gelatina, carboximetilcelulose, amido e óleo de cozinha residual como forma de avaliar a capacidade de produção de enzimas extracelulares para os substratos citados. Observou-se que dezessete isolados (85%) produziram, pelo menos, duas classes de enzimas hidrolíticas, com destaque para O16, O27 e O65 (biotipo A), que degradaram todos os substratos utilizados. Apenas dois isolados - O10 e O20 (10%) não foram capazes de produzir as enzimas analisadas (Tabela 2).

Tabela 1 – Caracterização morfológica dos isolados de bactérias testados.

Biotipo	Morfologia	Isolados
A	Bastonetes Gram + Formadores de endósporos	O16, O18, O27, O37, O59, O65
B	Bastonetes Gram + Não formadores de endósporos	O30
C	Bastonetes Gram –	O2, O5, O6, O10, O15, O20, O36, O41, O47, O54, O55, O61, O66

Fonte: Adaptado de Carvalho (2012).

Tabela 2 – Atividade proteolítica, celulolítica, amilolítica e lipolítica de bactérias.

Isolados	Proteases (mm)	Celulases (mm)	Amilases (mm)	Lipases (+/-)
Biotipo A				
O16	25,3	15,0	13,6	+
O18	30,7	16,7	-	+
O27	27,0	48,3	40,33	+
O37	10,0	14,3	-	+
O59	-	29,7	25,0	+
O65	13,3	38,7	21,3	+
Biotipo B				
O30	-	5,0	-	-
Biotipo C				
O2	23,0	-	-	+
O5	27,0	-	-	+
O6	21,0	-	-	+
O10	-	-	-	-
O15	-	5,6	-	+
O20	-	-	-	-
O36	12,0	-	-	+
O41	13,3	14,7	-	+
O47	13,7	-	-	+
O54	-	31,7	20,0	+

O55	6,0	12,0	-	+
O61	13,0	5,7	-	+
O66	19,7	16,7	-	+

Fonte: Autoria própria (2019).

Notas:

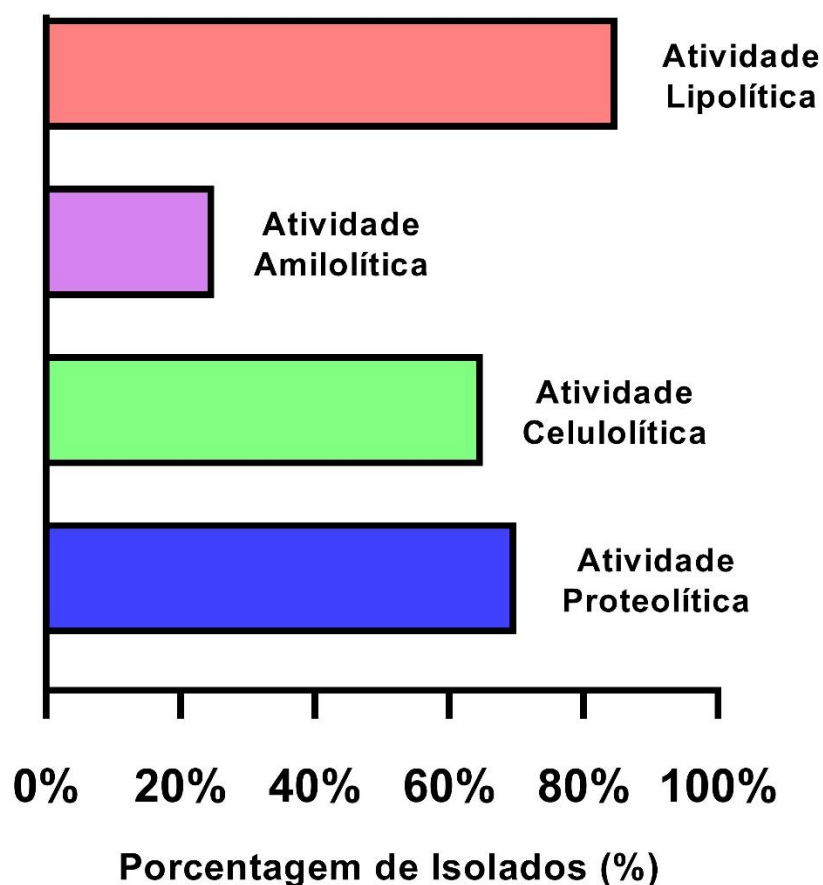
⁽¹⁾ Usou-se hífen (-) para indicar ausência de atividade enzimática.

⁽²⁾ Usou-se o sinal de mais (+) como indicativo de atividade lipolítica.

Dos vinte isolados testados, catorze foram capazes de produzir proteases, treze produziram celulases, cinco produziram amilases e dezessete foram positivas para a produção de lipases, como mostra a Figura 10. O predomínio da atividade lipolítica frente às demais pode ser atribuído ao tratamento do solo de origem das bactérias isoladas, o qual foi utilizado para o descarte experimental de óleo vegetal residual durante três anos, com o objetivo de enriquecimento do mesmo para seleção de microrganismos produtores de lipases. Por consequência, a análise do solo realizada por Carvalho (2012) mostrou um aumento do teor de ácidos graxos livres quando comparado ao solo não tratado, o que pode ter favorecido o desenvolvimento de bactérias lipolíticas. Ademais, o solo utilizado para o isolamento das bactérias apresentou valores de pH e umidade mais baixos que àquele não tratado (CARVALHO, 2012).

O óleo vegetal residual se mostrou um bom indutor da atividade lipolítica das bactérias testadas e o isolado O27 (biotipo A) apresentou, sob radiação ultravioleta, halos alaranjados de forte intensidade (Figura 11). Com relação à intensidade da fluorescência, o corante Rodamina B forma um complexo com os ácidos graxos liberados após a hidrólise dos triglicerídeos, emitindo uma maior fluorescência quanto maior for a liberação de ácidos graxos. Bharathi et al (2018) afirma que óleos vegetais e derivados do petróleo são bons estimulantes da atividade lipolítica de microrganismos, corroborando os resultados apresentados. Microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados em lixo de resíduos agroindustriais, esgotos de indústrias alimentícias, cursos d'água e solos contaminados por óleos vegetais e derivados do petróleo (HABA et al, 2000; SHARMA et al, 2001; KUMAR et al, 2012; SALIHU et al, 2012).

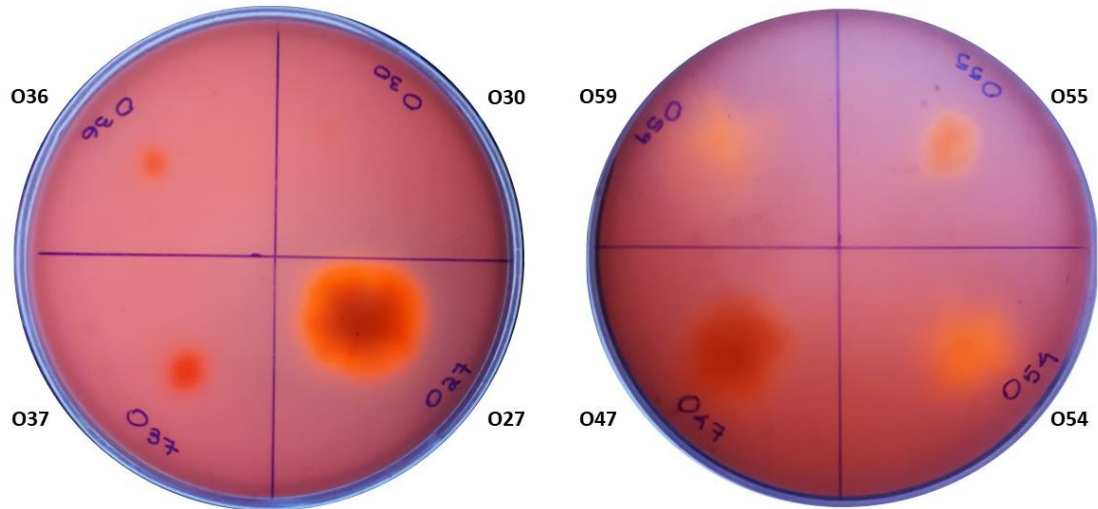
Figura 10 – Porcentagem (%) de isolados bacterianos que apresentaram atividade enzimática.



Fonte: Autoria própria (2019).

No que diz respeito à atividade proteolítica, segunda mais frequente entre os isolados testados, destacaram-se aqueles cuja média dos halos de degradação da gelatina ultrapassaram 20 mm de diâmetro - O2, O5, O6, O16, O18 e O27, como elencado na Tabela 2. Além da gelatina, outros substratos proteicos têm sido utilizados para triagem de microrganismos produtores de proteases, tais como: caseína, albumina, elastina, queratina, extrato de levedura, peptona, leite desnatado, extratos de soja, carne e peixe (SHARMA et al, 2017; BHAGWAT; DANDGE, 2018; GARCÍA et al, 2019). A exemplo disso, os ensaios realizados por Pant et al (2015) apontaram a gelatina como substrato de escolha para a máxima produção de proteases por *Bacillus subtilis* em comparação à caseína e ao leite desnatado. Assim como este, os achados de Mukherjee et al. (2007) e Jaswal et al. (2008) corroboram o uso da gelatina como um bom indutor da atividade proteolítica das bactérias testadas (Figuras 12 e 15).

Figura 11 – Visualização da atividade lipolítica de bactérias frente à irradiação das placas com luz ultravioleta (350 nm).

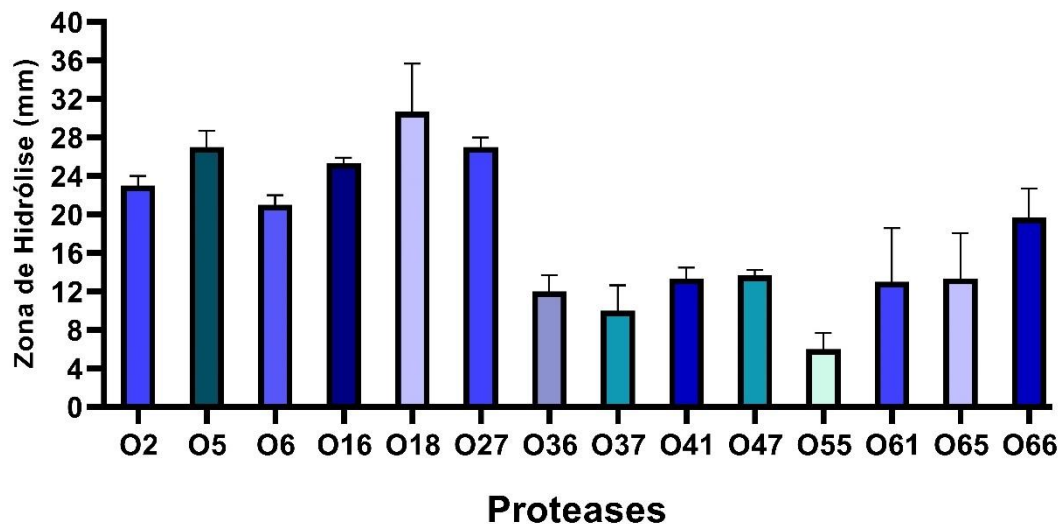


Fonte: Autoria própria (2019).

Notas:

⁽¹⁾ O isolado O30 não apresentou atividade lipolítica.

Figura 12 – Atividade proteolítica dos isolados bacterianos.

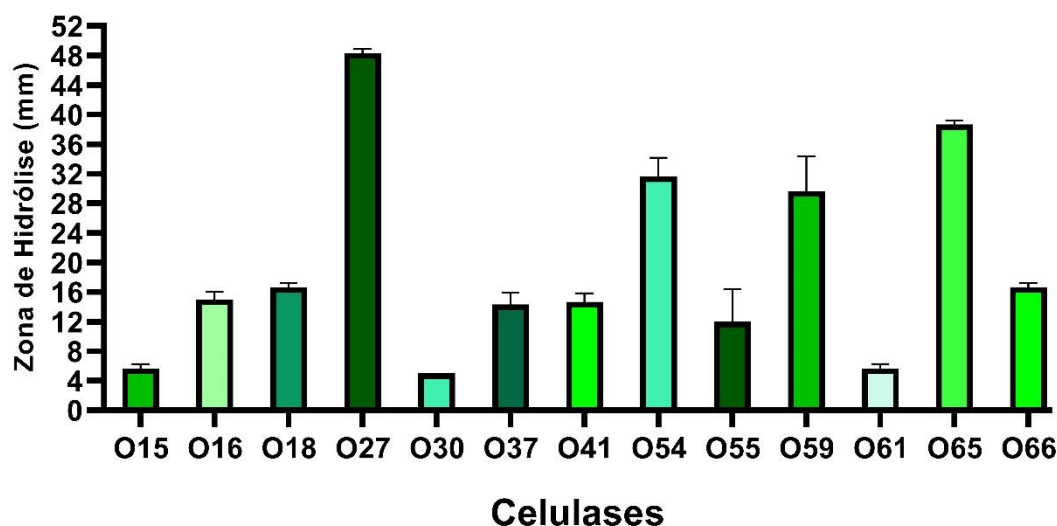


Fonte: Autoria própria (2019).

Observou-se que 65% dos isolados foram capazes de degradar a carboximetilcelulose (Figura 10) e que as linhagens O27 e O65 (biotipo A) apresentaram elevado potencial

hidrolítico ao exibir, respectivamente, zonas de degradação de 48,33 e 38,66 mm de diâmetro (Tabela 2, Figuras 13 e 16). Em virtude do alto grau de polimerização e da baixa cristalinidade, a CMC é o substrato preferencial para triagem de microrganismos secretores de endoglucanases, enzimas que iniciam o processo de hidrólise da celulose (ZHANG, 2006; FLORENCIO, 2011). Por sua vez, exoglucanases e β -glicosidases não possuem especificidade pela CMC, e desta forma, faz-se necessária a realização de ensaios complementares utilizando substratos específicos para as mesmas, como a celulose cristalina (Avicel) e a celobiose (SHUANGQI et al, 2011; BEHERA et al, 2017).

Figura 13 – Atividade celulolítica dos isolados bacterianos.



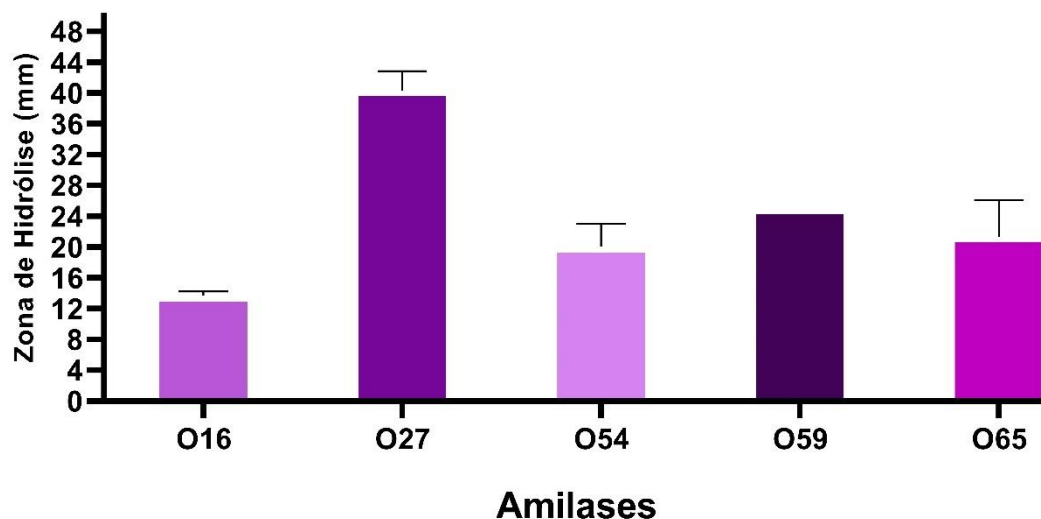
Fonte: Autoria própria (2019).

Fungos filamentosos são os principais produtores das enzimas celulolíticas de importância industrial, em virtude da alta taxa de secreção e facilidade de extração e purificação (SHARMA; YAZDANI, 2016). A título de exemplo, *Trichoderma reesei* foi um dos primeiros microrganismos estudados a apresentar capacidade de secretar todas as três enzimas necessárias à degradação completa da celulose (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) e continua sendo um dos mais utilizados pela indústria (MOHITE; PATIL, 2016). Apesar disso, as bactérias também são uma importante fonte de celulasas e embora menos estudadas, exibem uma série de vantagens como: rápido crescimento, estabilidade celular e secreção de enzimas celulolíticas estáveis, altamente específicas e que atuam de modo sinérgico para despolimerização da celulose (SHARMA; YAZDANI, 2016; PATEL et al, 2019). Por esse

motivo, a bioprospecção de celulases bacterianas tem sido um objeto relevante de pesquisa, haja vista a abundância de gêneros produtores destas enzimas, tais como, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Clostridium*, *Acidothermus* e *Caldocellum* (RASTOGI et al, 2010; ZAMBARE et al, 2011; MOHITE; PATIL, 2016).

O amido foi a fonte de C menos utilizada pelas bactérias, como observado na Tabela 2 e nas Figuras 10 e 14. Entretanto, dos cinco isolados com atividade amilolítica, quatro exibiram halos de degradação superiores a 20 mm de diâmetro, com destaque para O27, que apresentou o maior halo de hidrólise do amido - 40,3 mm de diâmetro (Figura 17). Amido, amilopectina, maltose, galactose, inulina e glicogênio são referidos pela literatura como indutores da atividade amilolítica de microrganismos (RAY; NANDA, 1996; GUPTA et al, 2003; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018) e além destes, resíduos agroindustriais de caráter amiláceo têm sido amplamente utilizados (ABD-ELHALEM et al, 2015; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Ademais, Simair et al. (2017) apontou o amido como uma das fontes de C preferenciais para otimização da atividade amilolítica de uma linhagem do gênero *Bacillus sp.*

Figura 14 – Atividade amilolítica dos isolados bacterianos.

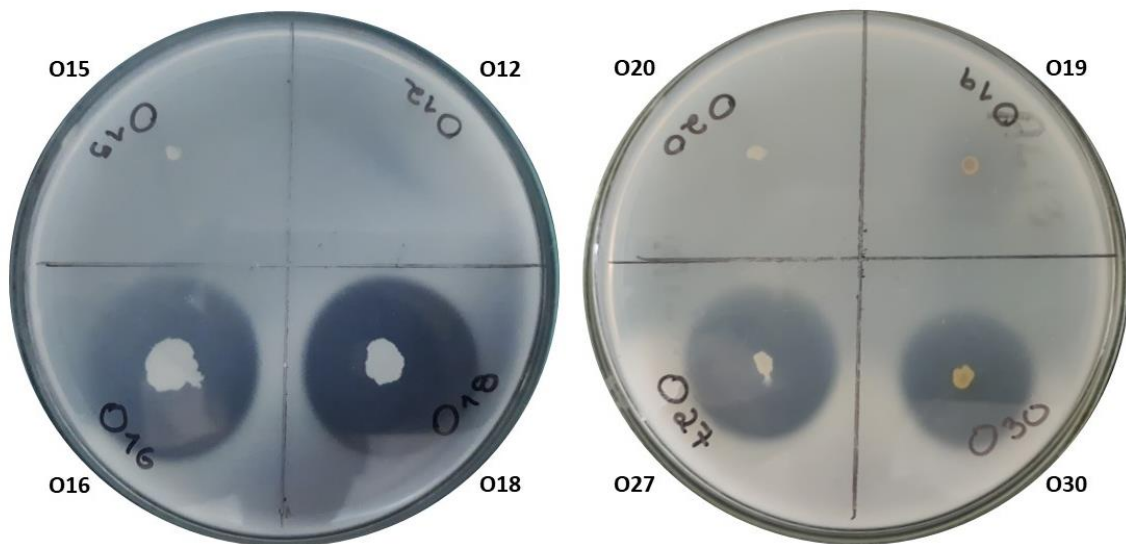


Fonte: Autoria própria (2019).

A sobrevivência dos microrganismos está diretamente atrelada a sua capacidade de alocar parte do carbono (C) e nitrogênio (N) assimilados do meio para a síntese e secreção de enzimas extracelulares, com um custo energético significativamente menor que o de enzimas

intracelulares (SMITH; CHAPMAN, 2010; BURNS et al, 2013). Desta forma, a habilidade de utilizar mais de um substrato, como observado, pode ser vista como uma forma de prevenir a desnutrição e consequente morte celular (BURNS et al, 2013) e se deve ao fato de bactérias poderem detectar a presença de moléculas-sinal do ambiente, que podem indicar, entre outras coisas, o tipo, localização, qualidade e quantidade dos substratos disponíveis, num fenômeno conhecido como *quorum sensing* (GOO et al, 2015).

Figura 15 – Atividade proteolítica dos isolados O16, O18, O27 e O30.

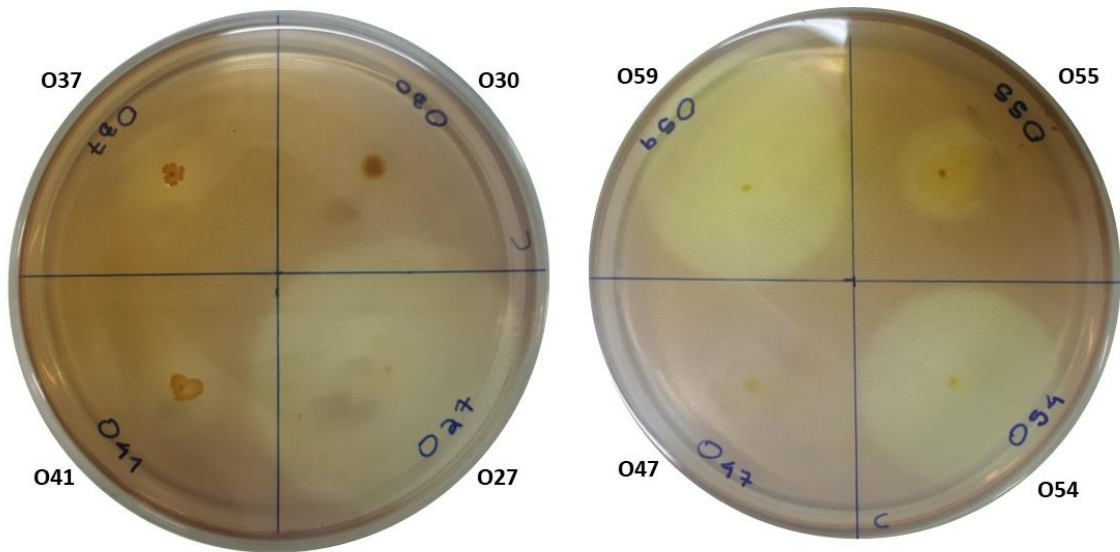


Fonte: Autoria própria (2019).

Notas:

⁽¹⁾ Os isolados O12, O15, O19 e O20 não apresentaram atividade enzimática.

Figura 16 – Atividade celulolítica dos isolados O27, O30, O37, O47, O54, O55 e O59.

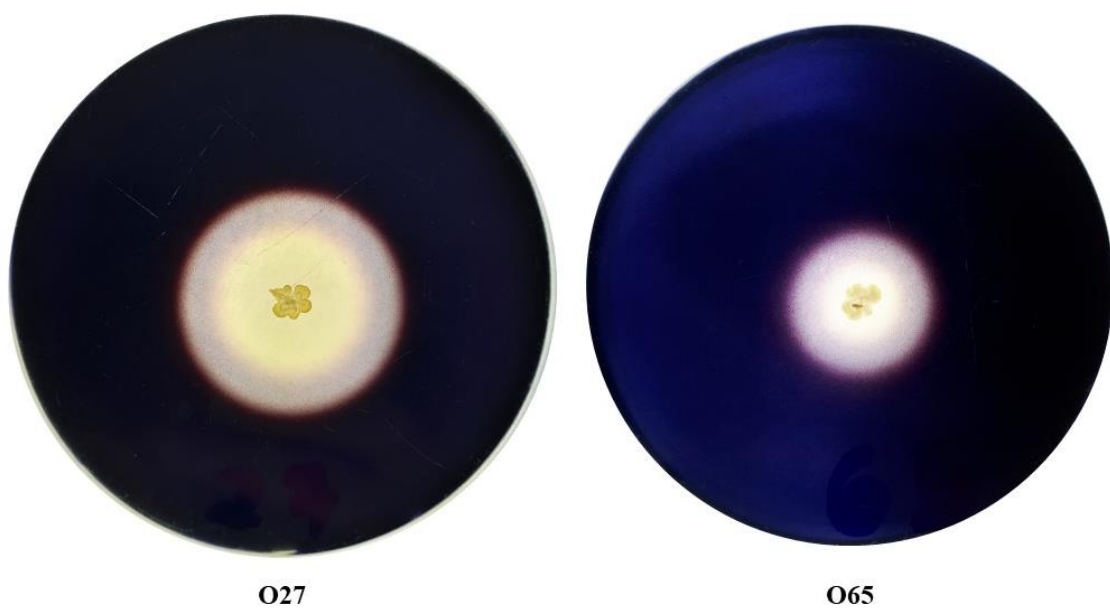


Fonte: Autoria própria (2019).

Notas:

⁽¹⁾ O isolado O47 não apresentou atividade enzimática.

Figura 17 - Atividade amilolítica dos isolados O27 e O65.



Fonte: Autoria própria (2019).

5.2 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Os vinte isolados bacterianos foram analisados quanto à produção de substâncias antimicrobianas por meio da inibição do crescimento de quatro linhagens de referência, conhecidas por causarem infecções em seres humanos, no ensaio de atividade antagonista. À vista disso, dois isolados - O36 e O41 (biotipo C) apresentaram relação de antibiose frente a todas as linhagens testadas - *E. coli*, *B. cereus*, *C. albicans* e *S. aureus* (Figura 6), com zonas expressivas de inibição (Tabela 3, Figura 18). Enquanto isso, dezoito isolados não exibiram atividade antagônica sobre os microrganismos citados.

Tabela 3 – Zonas de inibição (mm) promovidas pelos isolados O36 e O41 no teste de atividade antagonista.

Isolados	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
O36	5	6,2	10,5	6
O41	10,8	12	16,5	9,8

Fonte: Autor (2019).

Notas:

⁽¹⁾ Os valores estão expressos em média aritmética.

Para avaliar a sensibilidade das linhagens de referência frente às substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados O36 e O41, que mostraram resultados positivos no ensaio de atividade antagonista, realizou-se o teste de suscetibilidade antimicrobiana. Como resultado, observou-se que *C. albicans* apresentou sensibilidade (halos de inibição) às substâncias antimicrobianas secretadas pelos dois isolados, como observado na Figura 19 e na Tabela 4. No entanto, *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus* não apresentaram sensibilidade a esses metabólitos e uma possível explicação pode estar relacionada aos meios de cultura utilizados. MHA é o meio padrão para ensaios de atividade antimicrobiana (Nassar et al., 2018) em virtude de uma série de fatores, como a presença de amido, que absorve toxinas liberadas pelo metabolismo bacteriano para que não interfiram na atividade antimicrobiana, suporte ao

crescimento de um amplo espectro de isolados e linhagens de referência e boa reprodutibilidade. Seu uso, no entanto, é limitado por questões financeiras e ágar nutriente tem sido utilizado no seu lugar (NIEDERSTEBRUCH; SIXT, 2013). Em virtude disso, Nassar et al. (2018) comparou resultados de ensaios de suscetibilidade antimicrobiana utilizando ágar nutriente frente àqueles já estabelecidos pelo uso do MHA, constatando sua inaptidão em experimentos desta natureza, por apresentar elevada taxa de erro.

Neste trabalho, os isolados positivos no teste de cultura pareada foram incubados em caldo nutriente para o teste de antibiograma. Existe a possibilidade de que a produção de metabólitos antimicrobianos pelos isolados testados tenha sido afetada pelo meio de cultura utilizado, uma vez que nos ensaio de atividade antagonista em cultura pareada foi observada a inibição de todas as linhagens padrões, enquanto no ensaio de suscetibilidade antimicrobiana o sobrenadante inibiu apenas *C. albicans*.

Tabela 4 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) das linhagens de referência no ensaio de suscetibilidade antimicrobiana.

Isolados	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
O36	-	-	13,0	-
O41	-	-	11,3	-

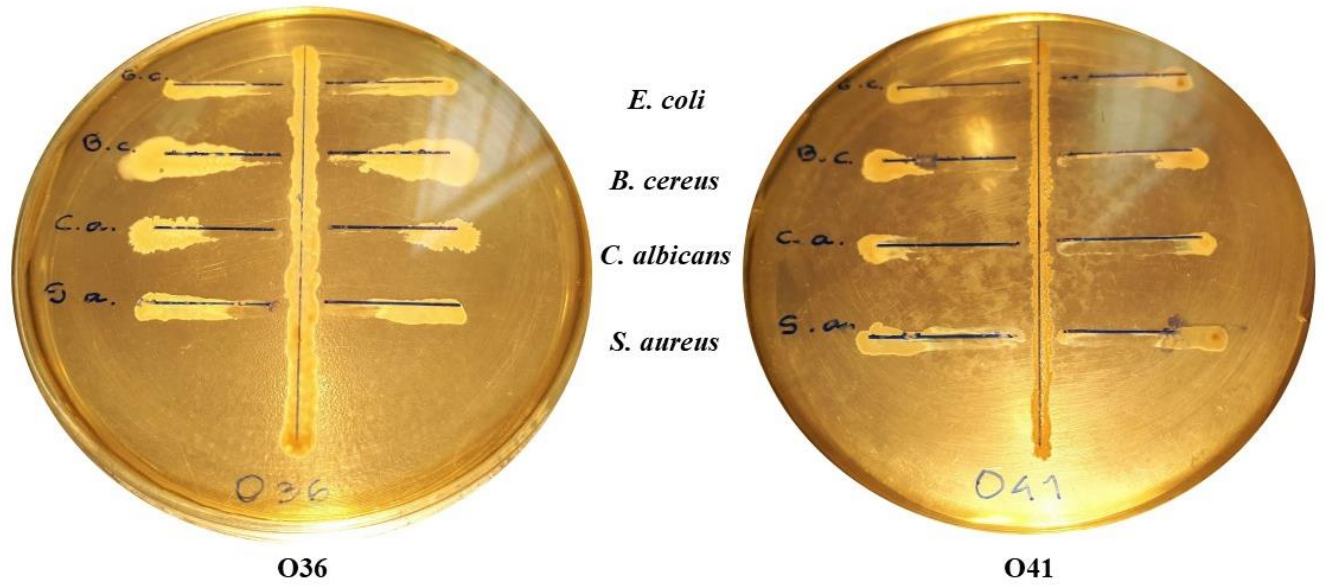
Fonte: Autor (2019).

Notas:

⁽¹⁾ Usou-se o sinal de menos (-) para indicar ausência de atividade antimicrobiana.

O teste de antagonismo por cultura pareada, conhecido em inglês como *cross streak* ou *perpendicular streak*, e o ensaio de suscetibilidade antimicrobiana por difusão em meio sólido são amplamente utilizados na literatura para seleção de isolados bacterianos com atividade antimicrobiana sobre patógenos humanos, estando de acordo com a metodologia usada neste trabalho (LERTCANAWANICHAKUL; SAWANGNOP, 2008; RAHMAN et al., 2011; HOSSAIN; RAHMAN, 2014; ELBENDARY et al., 2018; GISLIN et al., 2018; NASFI et al., 2018).

Figura 18 – Atividade antimicrobiana dos isolados O36 e O41 no teste de atividade antagonista (inibição de crescimento das linhagens de referência).



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 19 – Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana de *C. albicans* frente ao sobrenadante dos isolados O36 e O41.



Fonte: Autoria própria (2019).

C. albicans é um fungo considerado resistente contra a maioria dos antifúngicos usados atualmente na medicina e existem poucos relatos na literatura de antimicrobianos biológicos eficazes contra esta espécie (SARDI et al., 2013). Nesse contexto, os isolados que apresentaram atividade inibitória do crescimento de *C. albicans*, bem como de outras linhagens de referência, merecem estudos mais detalhados sobre as substâncias antimicrobianas por eles produzidas.

CONCLUSÕES

1. A maioria dos isolados bacterianos testados apresentou a produção de enzimas extracelulares.
2. As atividades lipolítica, proteolítica e celulolítica foram as mais comuns. O isolado O27 pertencente ao biótipo de bactérias Gram positivas formadoras de endósporos se destacou como bom produtor de todas as enzimas analisadas.
3. A atividade antagonista frente *E. coli*, *B.cereus*, *S. aureus* e *C. albicans* foi apresentada por dois isolados pertencentes ao biótipo de bastonetes Gram negativos.
4. O teste de antibiograma revelou que apenas *C. albicans* apresentou sensibilidade frente às substâncias antimicrobianas produzidas por dois isolados positivos no ensaio de atividade antagonista.
5. Alguns isolados apresentaram um potencial na produção de enzimas e substâncias com ação antimicrobiana e foram selecionados para as futuras pesquisas mais detalhadas.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALEM, B.T. et al. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2015.
- AGUILAR, J.G.S.; SATO, H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2017.
- AKHTAR, N. et al. Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications. **Cellulose Chemistry and Technology Biodiversity**, v. 50, p. 983-99, 2014.
- ALBERTS, B. et al. Proteínas. In: _____ **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Artmed, 2017. p. 109-172.
- Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. **CDC**, 2013. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2019.
- Antibiotic Use in the United States, 2017: Progress and Opportunities. **CDC**, 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/stewardship-report/index.html>. Acesso em: 29 abr. 2019.
- ARUN, S. et al. A review on antibiotics consumption, physico-chemical properties and their sources in asian soil. In: HASHMI, A. et al. **Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils**. 1. ed. Springer, 2017. p. 39-48.
- BANERJEE, G.; RAY, A.K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.
- BBOOSA, G.S. et al. Antibiotics / antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. **Scientific Research**, v. 6, n. 5, p. 410-425, 2014.
- BEHERA, B.C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197-210, 2016.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: A personal view. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.
- BHAGWAT, P.K.; DANDGE, P.B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43-55, 2018.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G.; KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. **Journal of King Saud University – Science**, p. 1-4, 2018.

BURNS, R.G. et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2012.

BORRELLI, G.M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, 2015.

CARVALHO, L.C.T. Produção de Lipases e Biossurfactantes por Bactérias Isoladas de um Solo Contaminado com Óleo Vegetal Residual. 2012. 198 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal da Paraíba, 2012.

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259-266, 2017.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling Analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, p. 56-66, 2019.

CHANDRA, N.; KUMAR, S. Antibiotics producing soil microorganisms. In: HASHMI, A. et al. **Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils**. 1. ed. Springer, 2017. p. 1-18.

CHEW, L.Y.; TOH, G.T.; ISMAIL, A. Application of proteases for the production of bioactive peptides. In: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2018. p. 247-261.

CONTESINI, F. J.; MELO, R.G.; SATO, H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 321-334, 2017.

DANQUAH, MK.; AGYEI, D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. **Medical Biotechnology**, v., 1, n. 2, p. 1-7, 2012.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In: SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: History of Modern Biotechnology**. Springer, 2001. p. 1-40.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 5-16, 2009.

ELBENDARY, A.A. et al. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 44-46, 2018.

FERRAZ, J.L.A.A. et al. Obtenção de lipases microbianas: Uma breve revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 20, n. 1, p. 30-53, 2018.

FLORENCIO, C. Microrganismos Produtores de Celulases : Seleção de Isolados de *Trichoderma spp.* 2011. 86 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, 2012.

GARCÍA, M-D. et al. Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. **Electronic Journal of Biotechnology**, p. 1-9, 2019.

GISLIN, D. et al. Antibacterial activity of soil bacteria isolated from Kochi, India and their molecular Identification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n.2, p. 287-294, 2018.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable polymers. In: CHAMY, R. **Biodegradation - life of science**. IntechOpen, 2013. p. 141-185.

GOO, E. et al. Control of bacterial metabolism by quorum sensing. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 567-576, 2015.

GOPINATH, S.C.B et al. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **Biomedical Research International**, p. 1-9, 2017.

GUERRAND, D. Economics of food and feed enzymes: status and prospectives. In: KUMAR, V.; NUNES, C. **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 487-514.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, p. 1599-1616, 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 736-781, 2004.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

GURUNG, N. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomedical Research International**, p. 1-18, 2013.

HABA, E. et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 40-44, 2000.

HARWOOD, C.R.; CRANENBURGH, R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. **Cell Press**, p. 73-79, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HASNAIN, A. et al. Antibiotics resistance genes. In: HASHMI, A. et al. **Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils**. 1. ed. Springer, 2017. p. 19-37.

HOLMES, A.H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, p. 176-187, 2016.

HOSSAIN, MD. N.; RAHMAN, MD. M. Antagonistic activity of antibiotic producing streptomycetes sp. against fish and human pathogenic bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 2, p. 233-237, 2014.

HOVER, B.M. et al. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 415-422, 2018.

Industrial enzymes – a global market overview. **Industry Experts**, 2018. Disponível em: <<http://industry-experts.com/verticals/biotechnology/industrial-enzymes-a-global-market-overview>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

JAEGER, K-E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JASWAL, R.K.; KOCHER, G.S.; VIRK, M.S. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: A statistical approach. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 356-360, 2008.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2017.

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 33, p. 188-203.

KAUR, H.; GILL, P.K. Microbial enzymes in food and beverages processing. In: GRUMEZESCU, A.; HOLBAN, A-M. **Engineering Tools in the Beverage Industry**. 1. ed. Woodhead Publishing, 2019. p. 255-282.

KINKEL, L.L. et al. Sympatric inhibition and niche differentiation suggest alternative coevolutionary trajectories among *Streptomyces*. **International Society for Microbial Ecology**, v. 8, n. 2, p. 249-256, 2014.

KIRBY, W.M.; BAUER, A.W. Antibiotic susceptibility testing a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.K.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria : from targets to networks. **Nature**, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

KOTWANI, A.; HOLLOWAY, K. Trends in antibiotic use among outpatients in New Delhi, India. **BMC Infections Diseases**, v. 11, n. 99, p. 1-9, 2011.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p.211-213, 1987.

KUDDUS, M.; ROOHI. Microbial cold-active α -amylases: From fundamentals to recent developments. **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 1265-1276.

KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, p. 1-10, 2011.

KUMAR, S. et al. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300-304, 2012.

KUMARI, A. et al. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 2, p. 108-144, 2015.

LADICS, G.S.; SEWALT, V. Industrial microbial enzyme safety: what does the weight-of-evidence indicate? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 151-154, 2018.

LAXMINARAYAN, R. et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, p. 168-175, 2016.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance - the need for global solutions. **The Lancet**, v. 13, p. 1057-1098, 2013.

LERTCANAWANICHAKUL, M.; SAWANGNOP, S. A Comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 161-171, 2008.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: BRAHMACHARI, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Academic Press, 2016. p. 267-298.

MADIGAN, M.T. et al. Microbiologia diagnóstica. In: _____ **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Artmed, 2016, p. 793-826.

MESSIAS, J.M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234.

MOHR, K.I. History of antibiotics research. In: AHMED, R. et al. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1. ed. Springer, 2016.

MCDONALD, J.K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms, aspects related to nomenclature and classification. **Histochemical Journal**, v. 17, p. 773-785, 1985.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1-20, 2018.

MOHITE, B.B.; PATIL, S.V. Impact of microbial cellulases on microbial cellulose biotechnology. In: GUPTA, V. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial cellulase system properties and applications**. 1. ed. Elsevier, 2016. p. 31-40.

MUKHERJEE, A.K.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 353-361, 2008.

NASSAR, M.S.M.; HAZZAH, W.A.; BAKR, W.M.K. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? **Journal of the Egyptian Public Health Association**, v. 94, n. 4, p. 1-5, 2019.

NIEDERSTEBRUCH, N.; SIXT, D. Standard Nutrient Agar 1 as a substitute for blood-supplemented Müller – Hinton agar for antibiograms in developing countries. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, p. 237-241, 2013.

NOTLEY, S.M.; PETTERSON, B.; WAGBERG, L. Direct measurement of attractive van der waals' forces between regenerated cellulose surfaces in an aqueous environment. **JACS Communications**, p. 13930-13931.

O'NEILL, J. **Review on Antimicrobial resistance**: tackling a crisis for the health and wealth of nations. O'Neill, J, 2014.

PALIWAL, N.; SINGH, S.P.; GARG, S.K. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus*. **Bioresource Technology**, v., 50, n. 1, p. 209-211, 1994.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2005.

PARRA, L.P. Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: Expression of a cold-active lipase with high specific activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 68, p. 56-61, 2014.

PAUL, T. et al. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8-22, 2016.

PATEL, A.K. et al. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385-392, 2019.

PLANTE, A.F.; STONE, M.S.; MCGILL, W.B. The metabolic physiology of soil microorganisms. In: PAUL, E. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4. ed. Academic Press, 2015. p. 245-272.

PROCÓPIO, R.E.L. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

RAHMAN, MD. A.; ISLAM, M.Z.; ISLAM, MD. A. Antibacterial Activities of *Actinomycete* Isolates Collected from Soils of Rajshahi , Bangladesh. **Biotechnology Research International**, p. 1-6, 2011.

RAY, R.R.; NANDA, G. Microbial β -amylases: biosynthesis, characteristics, and industrial applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 181-199, 1996.

RASTOGI, G. et al. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, 2010.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation & Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SHALLES, D. The Perfect Storm. In: _____ **Antibiotics: The Perfect Storm**. 1. ed. Springer, 2010. p. 1-7.

SHAFEE, T. Evolvability of a viral protease catalysis, robustness and specificity. 2013. 194 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Filosofia). University of Cambridge, 2013.

SHARMA, P. et al. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369-377, 2017.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S.; YAZDANI, S.S. Diversity of microbial cellulase system. In: GUPTA, V. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial cellulase system properties and applications**. 1. ed. Elsevier, 2016. p. 49-64.

SHUANGQI, T. et al. Determination methods of cellulase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 37, p. 7122-7125, 2011.

SIMAIR, A.H. et al. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **Biomedical Research International**, p. 1-10.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -amylases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. **Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products**. 1. ed. Elsevier, 2016. p. 3-24, 2016.

SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial enzyme in food biotechnology. In: SINGH, R. S. et al. **Advances in enzyme technology**. 1. ed. Science Direct, 2019. p. 19-28.

SINGH, R.S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes - an overview. In: SINGH, R.S. et al. **Advances in Enzyme Technology**. 1. ed. Elsevier, 2019. p. 1-40.

SMIBERT, R.M.; KRIEG, N.R. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington DC, 1994. p. 607-654.

SMITH, D.R.; CHAMPAN, MR. Economical evolution: microbes reduce the synthetic cost of extracellular proteins. **American Society for Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2010.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. 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.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

TYC, O. et al. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 280-292, 2017.

ÜLKER, S. et al. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 543-550, 2010.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Enzymes in the Beverage Industry. In: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2018. p. 29-43.

VAN BOECKEL, T.P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN BOECKEL, T.P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 742-750, 2014.

VAN DER MAAREL, M.J.E.E. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 137-155, 2002.

WATVE, M.G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001.

Who report on surveillance of antibiotic consumption. **OMS**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en/>. Acesso em: 29 abr. 2019.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, R.J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZAMBARE, V.P. Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. **Extremophiles**, v. 15, p. 611-618, 2011.

ZIMDAHL, R. Antibiotics. In: _____ **Six Chemicals That Changed Agriculture**. 1. ed. Academic Press, 2015. p. 165-182.