



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Departamento de Antibióticos  
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

Maria Luiza de Lima Vitorino

**SELEÇÃO DE *BACILLUS* E *LYSINIBACILLUS* PRODUTORES DE  
ESTERASES E DE SUBSTÂNCIAS BIOCIDAS FRENTE A  
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Recife  
2023

Maria Luiza de Lima Vitorino

**SELEÇÃO DE *BACILLUS* E *LYSINIBACILLUS* PRODUTORES DE  
ESTERASES E DE SUBSTÂNCIAS BIOCIDAS FRENTE A  
MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof.º Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Vitorino, Maria Luiza de Lima.

Seleção de Bacillus e Lysinibacillus produtores de esterases e de substâncias biocidas frente a microrganismos patogênicos / Maria Luiza de Lima Vitorino. - Recife, 2023.

61 p. : il., tab.

Orientador(a): Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, , 2023.

1. Antagonismo. 2. Biossurfactante. 3. Bacteriocinas. 4. Hemólise. 5. Enzima. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

Maria Luiza de Lima Vitorino

**SELEÇÃO DE *BACILLUS* E *LYSINIBACILLUS* PRODUTORES DE  
ESTERASES E DE SUBSTÂNCIAS BIOCIDAS FRENTE A  
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 31/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Me. Renan Andrade Fernandes de Souza (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Me. Wilza Wanessa Melo França (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

*A todos envolvidos nesse processo,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças, saúde e coragem, sempre me guiando para chegar até o final desta caminhada, que não se mostrou fácil um momento sequer ao longo destes cinco anos.

A minha família, em especial os meus pais, Edileusa e Jozélio, que sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando. E ao meu irmão, Thiago, a pessoa que mais amo no mundo.

A minha querida orientadora, Professora Dra. Eulália Ximenes, que muito mais do que apenas uma orientadora, se mostrou uma amiga e mãe, me ouvindo em momentos de pânico, me dando conselhos em momentos de preocupação, rindo em momentos de descontração e dando verdadeiros puxões de orelha quando me mostrei mais teimosa do que deveria. Este trabalho não teria sido possível sem ela de forma alguma. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Rodrigo Oliveira e a todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, pelos momentos compartilhados e ensinamentos passados.

A Professora Dra. Vilma Loreto, pela confiança depositada e por ter me orientado no meu primeiro PIBIC, dando início a esta trajetória no mundo da pesquisa e ciência. Agradeço também a todos os meus colegas do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana, por todas as risadas e experiências trocadas ao longo de um ano.

Agradeço a todos os meus amigos feitos durante estes anos de graduação, que tornaram todos os momentos tristes mais leves e todos os momentos felizes ainda mais alegres. Não teria chegado até aqui sem vocês.

Também agradeço a todos os meus amigos e colegas de fora da graduação que, apesar de muitas vezes terem me dito frases como “eu não sei nem o que é uma mitocôndria”, foram essenciais nessa caminhada, me escutando, aconselhando e torcendo.

Também não posso deixar de agradecer a Fernanda Villarouco, Luciana Furtado e Carlos Falcão, anjos que foram colocados em minha vida no início e fim desta trajetória.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a mim mesma, por ter chegado até o final, realizando o sonho que começou em 2019.

[...] A sorrir eu pretendo levar a vida  
Pois chorando eu vi a mocidade perdida  
Finda a tempestade  
O sol nascerá [...]  
(Cartola, 1974)

## RESUMO

Os gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* compreendem um grupo de bactérias Gram-positivas, formadoras de endósporos, considerados bons produtores de substâncias antimicrobianas, dentre os quais temos antibióticos peptídeos e lipopeptídeos, e bacteriocinas. O presente estudo teve por objetivo fazer uma seleção de cepas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* produtoras de esterases e substâncias biocidas. Nove cepas do gênero *Bacillus* e *Lysinibacillus* foram colocadas a prova em três testes: produção esterásica em pH 5,0 e 7,0; hemolítica e antagonismo frente a cepas patogênicas. Dos nove isolados de *Bacillus* e *Lysinibacillus*, oito foram capazes de produzir esterase e quatro apresentaram atividade hemolítica completa. *Bacillus coagulans* LFBM 01 foi a única espécie a apresentar hemólise parcial e atividade antagônica frente a todas cepas patogênicas. Quatro cepas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* foram capazes de apresentar atividade antagônica contra microrganismos patogênicos e multi droga resistentes. *Bacillus pumilus* CCGB 0203 foi a única cepa a não apresentar nenhuma atividade nos três testes realizados no presente estudo. Não foi observado correlação entre os resultados dos testes de hemólise e atividade antimicrobiana. Esses resultados podem servir de base para futuros estudos que visem otimizar tempo e recursos na produção de enzimas e biossurfactantes. Além de contribuir na pesquisa de novos compostos biocidas contra bactérias multiresistentes.

**Palavras-chave:** antagonismo; biossurfactante; bacteriocina; hemólise; enzima.

## ABSTRACT

The *Bacillus* and *Lysinibacillus* genera comprise a group of Gram-positive, endospore-forming bacteria that are considered good producers of antimicrobial substances, including peptide and lipopeptide antibiotics and bacteriocins. The aim of this study was to select *Bacillus* and *Lysinibacillus* strains that produce esterases and biocidal substances. Nine strains of the genus *Bacillus* and *Lysinibacillus* were put to the test in three tests: esterase production at pH 5.0 and 7.0; hemolytic and antagonism towards pathogenic strains. Of the nine *Bacillus* and *Lysinibacillus* isolates, eight were able to produce esterase and four showed complete hemolytic activity. *Bacillus coagulans* LFBM 01 was the only species to show partial hemolysis and antagonistic activity against all pathogenic strains. Four strains of *Bacillus* and *Lysinibacillus* were able to show antagonistic activity against pathogenic and multi-drug resistant microorganisms. *Bacillus pumillus* CCGB 0203 was the only strain not to show any activity in the three tests carried out in this study. No correlation was observed between the results of the hemolysis tests and antimicrobial activity. These results can serve as a basis for future studies aimed at optimizing time and resources in the production of enzymes and biosurfactants. In addition to contributing to the search for new biocidal compounds against multi-resistant bacteria.

**Keywords:** antagonism; biosurfactant; bacteriocin; hemolysis; enzyme.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo celular de bactérias da ordem Bacillales formadoras de endósporos.....	19
<b>Figura 2.</b>	Coloração de Gram de <i>Bacillus thuringiensis</i> visualizada por microscopia óptica (1000X). É possível observar seu aspecto morfológico de bastonete.....	20
<b>Figura 3 .</b>	Reação de esterificação de Fischer.....	21
<b>Figura 4 .</b>	Representação esquemática da dobra $\alpha,\beta$ -hidrolase.....	22
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática da estrutura orgânica de uma molécula anfifílica.....	27
<b>Figura 6.</b>	Estrutura da principal da surfactina.....	28
<b>Figura 7.</b>	Culturas de <i>Bacillus</i> e <i>Lysinibacillus</i> em meio BHI.....	33
<b>Figura 8 .</b>	Espécies de <i>Bacillus</i> e <i>Lysinibacillus</i> após centrifugação, onde é possível notar a presença de precipitado e sobrenadante.....	34
<b>Figura 9.</b>	Seringa e membrana de porosidade 0,45 $\mu$ m.....	34
<b>Figura 10.</b>	Esquematização do método <i>Agar Spot Test</i> .....	36
<b>Figura 11.</b>	Halos de hidrólise em meio sólido Tween 80 em pH 5,0.....	38
<b>Figura 12.</b>	Halos de hidrólise em meio sólido Tween 80 em pH 7,0.....	39
<b>Figura 13.</b>	Ausência de halos de hidrólise do Tween 80 com filtrado isento de células das culturas de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	39
<b>Figura 14.</b>	Atividade hemolítica dos isolados de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	41
<b>Figura 15.</b>	Antagonismo entre <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 335919 e <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606.....	42
<b>Figura 16A.</b>	Antagonismo entre <i>Bacillus sphaericus</i> 2362 sorotipo H5a5b e <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705.....	43
<b>Figura 16B.</b>	Antagonismo entre <i>Bacillus subtilis</i> LFBM 02 (3) e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB 664 e <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Origem das espécies de <i>Bacillus</i> e <i>Lysinibacillus</i> e sua preservação.....	28
<b>Tabela 2.</b>	Origem das espécies patogênicas e seus perfis de resistência.....	35
<b>Tabela 3.</b>	Crescimento de espécies de <i>Bacillus</i> e <i>Lysinibacillus</i> meio líquido Tween 80 em pH 5,0 e 7,0 bem como seus halos de hidrolise.....	37
<b>Tabela 4.</b>	Atividade hemolítica dos isolados de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	40
<b>Tabela 5.</b>	Atividade antimicrobiana de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> frente a microrganismos patogênicos.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
ATCC	American Type Culture Collection
Atm	Atmosfera
BHI	Brain Heart Infusion
BLIS	Substâncias inibitórias similares a bacteriocinas
CCGB	Coleção de Culturas de <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos
h	Horas
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
min	Minuto
mm	Milímetro
°C	Graus celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivo Específico.....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
3.1	Gênero <i>Bacillus</i> .....	17
3.1.1	<i>Aspectos Gerais</i> .....	17
3.1.2	<i>Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas</i> .....	18
3.2.	Esterases.....	21
3.2.1.	<i>Aspectos Gerais</i> .....	21
3.2.2.	<i>Produção de esterases por Bacillus</i> .....	23
3.2.3.	<i>Aplicações biotecnológicas</i> .....	24
3.3.	Substâncias biocidas .....	25
3.4.	Substâncias biocidas produzidas por <i>Bacillus</i> .....	26
3.5.	Biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus</i> .....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1.	Microrganismos e meios de preservação.....	29
4.2.	Meios de cultura.....	31
4.2.1.	<i>Ágar Nutritivo (AN) Standard</i> .....	31
4.2.2.	<i>Meio Ágar Sangue</i> .....	31
4.2.3.	<i>Meio Brain Heart Infusion (BHI) - Ágar Cérebro Coração</i> .....	32
4.2.4.	<i>Meio Tween 80</i> .....	32
4.3.	Condições de cultivo e seleção qualitativa de microrganismos produtores de esterase.....	33
4.4.	Seleção qualitativa de microrganismos produtores de esterase nos sobrenadantes livres de células.....	33
4.5.	Atividade hemolítica das culturas de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	35
4.6.	Microrganismos testes.....	35
4.7.	Atividade antagônica qualitativa.....	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>

5.1.	Avaliação qualitativa de esterase nas culturas.....	37
5.2.	Avaliação qualitativa de esterase nos sobrenadantes isentos de células	
5.3.	Atividade hemolítica.....	39
5.4.	Atividade antagônica de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> sob microrganismos patogênicos.....	41
6.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
7.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e formadoras de endósporos que são caracterizadas por sua morfologia em formato de bastonete e produção de catalase, podendo ser encontradas nos mais diversos ambientes (Borriss, 2020). A capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos é amplamente distribuída entre bactérias Gram-positivas (Abriouel et al., 2011) e o gênero *Bacillus* é considerado excelente na produção de substâncias antimicrobianas, as quais antibióticos polipeptídeos e lipopeptídeos, e bacteriocinas se destacam (Stein et al., 2005; Perez, 2014).

Geralmente, a descoberta de antibióticos com atividade contra patógenos humanos é realizada a partir da observação da interação entre microrganismos; interação essa que recebe o nome de antagonismo. Esse antagonismo acontece uma vez que, substâncias sintetizadas e liberadas inibem o crescimento de outras espécies (Shleeva et al., 2023). Nesta perspectiva, temos o gênero *Bacillus* se destacando como um potencial produtor tanto de enzimas como de outras substâncias biocidas. Ademais, o gênero *Lysinibacillus* também se destaca como sendo um potencial produtor de lipopeptídeos (Almeida et al., 2020), uma vez que a principal característica que distingue os dois gêneros é a presença de L-lisina como terceiro aminoácido do tetrapeptídeo ligado ao peptideoglicano (Orem, 2019). Outros bioprodutos biossintetizados por *Bacillus* e gêneros correlatos são enzimas.

As esterases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, sendo responsáveis por catalisar a hidrólise de compostos constituídos de ligação éster em álcool e ácido a partir de uma reação química (Bhardwaj et al., 2020; Shabbir et al., 2022). Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos, plantas e animais. As esterases de origem microbiana apresentam um maior interesse industrial, visto que possuem diferentes propriedades bioquímicas, como maior especificidade sob diferentes substratos, hidrólise de ésteres e outras reações com alta eficiência catalítica, favorecendo suas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (López-López et al., 2014; Gidiukaite et al., 2017; Meneses, 2020).

Somado a isso, a resistência aos antibióticos é um problema de saúde global crescente, impulsionado por vários fatores sociais e econômicos (Silver, 2011; Organização Mundial da Saúde, 2014). Sabe-se que existem pesquisas que visam saber do potencial das esterases no combate de microrganismos resistentes (Larsen & Johnson, 2018), uma vez que podem superar a dificuldade existente em atravessar

a parede celular bacteriana e assim atingir efetivamente os microrganismos resistentes (Hoagland et al., 2016; Herrmann et al, 2017; Mori et al., 2017; Singh & Mizrahi, 2017; Benedetto Tiz et al., 2018).

Ainda sob o viés da problemática dos microrganismos patogênicos e resistentes, a disseminação de cepas bacterianas que causam doenças infecciosas graves e resistentes a antimicrobianos conhecidos gera um quadro cada vez maior de preocupação, exigindo a busca por um desenvolvimento de novas abordagens (Lerminiaux & Cameron, 2019). A previsão para a disseminação da resistência a antibióticos sugerem que as infecções multi resistentes se tornarão cada vez mais comum dentre os próximos 50 anos (Alanis, 2005; Organização Mundial da Saúde, 2014); e é neste cenário que aparecem como um objeto de extensas pesquisas as substâncias biocidas. Biocida é o nome genérico dado para substâncias utilizadas para combater pragas em geral, como vírus, fungos, bactérias ou insetos (UFF, acesso: 2023).

Diante do exposto, o presente trabalho foi voltado a pesquisa destas moléculas biossintetizadas por espécies de *Bacillus*. Assim, esse trabalho teve por objetivo fazer uma seleção de cepas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* produtoras de esterases e substâncias biocidas, a fim de servir de base para trabalhos futuros, além de analisar a atividade que esta enzima e substâncias, produzidas sob diferentes aspectos, são capazes de desempenhar frente a microrganismos patogênicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Selecionar espécies de *Bacillus* e *Lysinibacillus* produtoras de esterases e substâncias biocidas frente a microrganismos multi-drogas resistente.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar espécies de *Bacillus* e *Lysinibacillus* produtoras de esterases em pH 5,0 e pH 7,0.
- Avaliar a produção de esterases em cultura e nos seus respectivos extratos livres de células.
- Selecionar espécies de *Bacillus* e *Lysinibacillus* produtoras de biossurfactantes.
- Avaliar a atividade antagonista de cepas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* frente a microrganismos patôgenicos e multri-droga resistente.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Gênero *Bacillus*

##### 3.1.1. Aspectos Gerais

Pertencente à família *Bacillaceae* (Fischer, 1895; Skerman et al, 1980), o gênero *Bacillus* foi reportado pela primeira vez em 1872 por Cohn, como a espécie *B.subtilis*, após este ter sido descrito pela primeira vez em 1835 como “*Vibrio subtilis*” por Ehrenberg (Ehrenberg, 1835; Gordon, 1981; Villarreal-Delgado et al. 2018; Borriss, 2020). Englobando bactérias sapróbicas, aeróbicas e ou anaeróbios facultativos, esporuladas e em forma de bastonete Gram-positivos (Baron, 1996), o gênero *Bacillus* está classificado no Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli e Ordem Bacillales (Maughan & van der Auwera, 2011; Villarreal-Delgado, 2018). Contendo um número cada vez maior de integrantes, o que soma cerca de 268 espécies e 7 subespécies (Silva et al., 2021), é considerado o gênero mais importante e diverso dos bacilos aeróbicos formadores de endósporo (Slepecky & Hemphill, 2006; Borriss, 2020).

Os endósporos foram descritos primeiramente por Cohn, em *B. subtilis*, e novamente por Koch em *Bacillus anthracis*, um patógeno obrigatório de vertebrados, e configuram estruturas altamente refráteis que estão presentes no interior das células bacterianas, podendo ter uma forma redonda, oval ou cilíndrica (Baron, 1996; Slepecky & Hemphill, 2006). A presença destes endósporos permite ao gênero *Bacillus*, e gêneros correlatos, uma impressionante capacidade de disseminação e prevalência nos ecossistemas (Villarreal-Delgado et al., 2021), fazendo com que sejam onipresentes nos *habitats* terrestres (Talaro et al., 1996; Villarreal-Delgado et al., 2018; Soltani et al. 2019). São microrganismos ubiqüitários, estão presentes no solo – principal reservatório, dada a quantidade de espécies sapróbicas (McSpadden, 2004; Villarreal-Delgado et al., 2021), em usinas de compostagem (Yang et al, 2013) e também em ambientes aquáticos (Ichimatsu et al. 2000; Motta et al., 2004; Soltani et al., 2019).

Este grupo de bactérias acaba sendo conhecido por sua versatilidade em degradar macromoléculas complexas e por ser uma fonte de substâncias biocidas, como antibióticos, surfactantes e bacteriocinas (Talaro et al., 1996; Stein, 2005; Abriouel et al., 2011; Soltani et al., 2019), além de ter a capacidade de biossintetizar

inúmeras enzimas, como celulase, protease e lipase (Ray et al., 2012; Ghosh et al., 2018; Soltani et al., 2019).

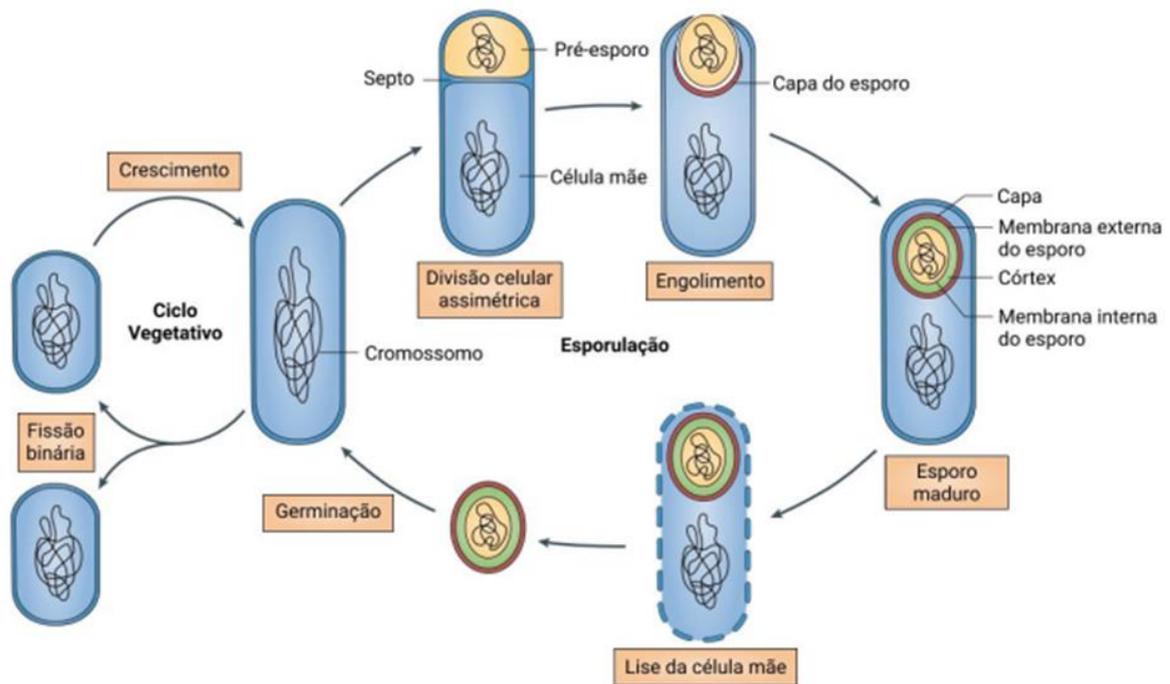
Dentre todas as suas características morfológicas e fisiológicas é notório que a sua capacidade de esporulação, produção de enzimas e de substâncias antimicrobianas permitem aos *Bacillus* colonizar diferentes ambientes e, além disso, serem utilizados como probióticos (Moriarty, 1998; Hong et al., 2005; Soltani et al., 2019). Os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis subsp. Globigii*, espécies termófilas (resistentes ao calor e à radiação, respectivamente), são utilizadas em procedimentos de esterilização por calor e fumigação (Baron, 1996). Outras espécies de *Bacillus* são importantes na participação de processos como degradação natural ou artificial de produtos residuais e biossíntese de compostos bioativos com propriedades inseticidas (Baron, 1996).

### **3.1.2. Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas**

As espécies do gênero *Bacillus* são morfológicamente definidas como bastonetes - com algumas variações espécie-específicas, variando entre 0,4 a 1,8µm de diâmetro e 0,9 a 10µm de comprimento, e pela coloração de Gram, apresentam-se como Gram-positivas (Figura 2), além de serem catalase-positivas, aeróbias ou anaeróbicas facultativas e formadoras de esporos (Soltani et al., 2019; Borriss, 2020). Seu melhor nível de crescimento se dá em pH neutro, podendo apresentar amplo intervalo de temperatura ainda que a grande maioria das espécies sejam mesófilas (Tejera-Hernández et al., 2011; Villarreal-Delgado et al., 2021). A maioria das espécies do gênero cresce em meios ordinários, como o ágar nutriente (Borriss, 2020).

Seu ciclo de vida pode ser dividido entre as fases de crescimento vegetativo e esporulado (Tejera-Hernández et al., 2011). Durante o estado vegetativo, ocorre um crescimento exponencial enquanto há condições favoráveis; uma vez que os nutrientes se esgotam, ocorre a esporulação (Figura 1), onde a célula original sofre uma transformação e o endósporo é liberado (Tortora et al., 2000; Tejera-Hernández et al., 2011). Uma vez que o endósporo encontre as condições adequadas, através de efeitos físicos ou químicos, ele retorna ao seu estado vegetativo através do processo de germinação (Tortora et al., 2000).

**Figura 1.** Ciclo celular de bactérias da ordem Bacillales formadoras de endósporos.



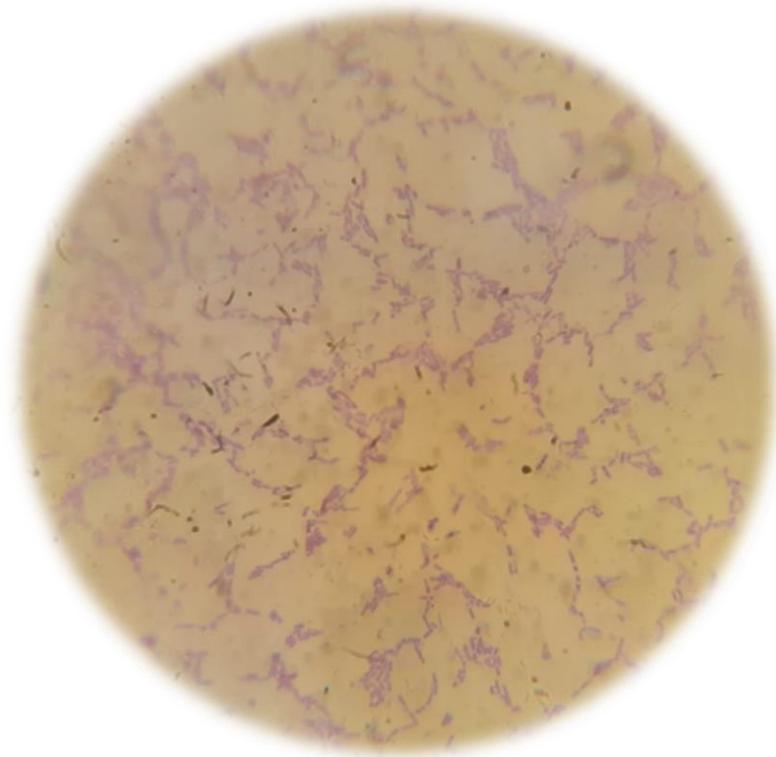
Fonte: Araújo, 2020.

Na fase de crescimento exponencial, as células podem formar cadeias de comprimentos diferentes; enquanto ao final desta fase, frequentemente, são formados esporos (Carvalho, 2005; Dworkin & Losick, 2005, Oliveira, 2006; Borriss, 2020). Com base na morfologia dos seus endósporos, o gênero *Bacillus* pode ser classificado em três grupos (Smith et al., 1952; Borriss, 2020), sendo eles: *endósporos elipsoidais ou esféricos*, de posição principalmente central ou às vezes terminal; *endósporos elipsoidais ou esféricos*, às vezes cilíndricos, posição central ao terminal, e *esporos redondos ou arredondados*, posição terminal ou subterminal. Nessa última classificação encontra-se *Lysinibacillus shapericus* (Borriss, 2020), anteriormente classificado como pertencente ao gênero *Bacillus*.

Na bactérias Gram positivas esporuladas, principalmente nos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*, são encontradas no citoplasma inclusões lipídicas, reserva desses compostos, que são reveladas pela coloração com negro de Sudão B (Tortora et al., 2000). Essas bactérias apresentam, ainda uma grande versatilidade metabólica, tais como solubilização de fosfato, sendo um dos gêneros mais estudados com relação a esta capacidade, com destaque para *B.megaterium* e *B.subtilis* (Tejera-Hernandez et al., 2011). Também existe amplo estudo com relação a sua capacidade de transportar

e realizar processos de fixação de nitrogênio (Tejera-Hernandez et al., 2011). Com relação a via das pentoses-fosfato, *B. subtilis* se destaca como sendo uma das espécies que utilizam essa via na produção de ATP (Tortora et al., 2000). Na respiração anaeróbica, os *Bacillus* podem utilizar o íon nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como um receptor final de elétrons, uma vez que este íon é reduzido a um íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nitroso ou nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Tortora et al., 2000). Somado a isso, do ponto de vista bioquímico, métodos tradicionais de caracterização do gênero foram descritos, tais como: Voges e Proskauer para avaliar a produção de acetil metil carbinol durante a glicólise, Redução de nitrato a nitritos e formação de indol a partir do triptofano (Gordon et al., 1973; Claus & Berkeley, 1986, Borris, 2020).

**Figura 2.** Coloração de Gram de *Bacillus thuringiensis* visualizada por microscopia óptica (1000X). É possível observar seu aspecto morfológico de bastonete.



Fonte: A autora (2023)

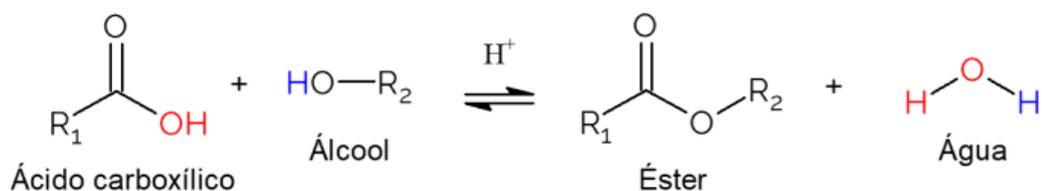
## 3.2. Esterases

### 3.2.1. Aspectos Gerais

As enzimas são moléculas essenciais aos organismos, responsáveis por comandar centenas de milhares de reações nos sistemas vivos (Rao et al., 2013; Nelson & Cox, 2013). Por regular múltiplos processos de reação em ambientes complexos, tanto químicos quanto biológicos, diversas pesquisas foram realizadas para entender como essas moléculas funcionam, a fim de aplicar-las biotecnologicamente (Rao et al., 2013). Usualmente as enzimas são nomeadas de acordo com a reação as quais elas realizam (Sayali et al., 2013).

Definidas como enzimas que hidrolisam ésteres solúveis de ácidos graxos de cadeia curta em substratos solúveis em água (Liu et al., 2004; Broome et al., 2011) (Figura 3). As esterases podem catalisar três tipos de reações, sendo elas reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (Sayali et al., 2013). A primeira gera como produto um éster e água, sendo conhecida como esterificação de Fischer, forma clássica para obtenção de ésteres (Tanaka, acesso: 2023). A transesterificação é reconhecida como o processo de obtenção de um novo éster a partir de um éster e um álcool ou um éster e um ácido, reação que vem despertando bastante interesse, visto que o éster gerado possui propriedades similares as do diesel de petróleo (Leite & Braga, acesso: 2023)

**Figura 3.** Reação de esterificação de Fischer



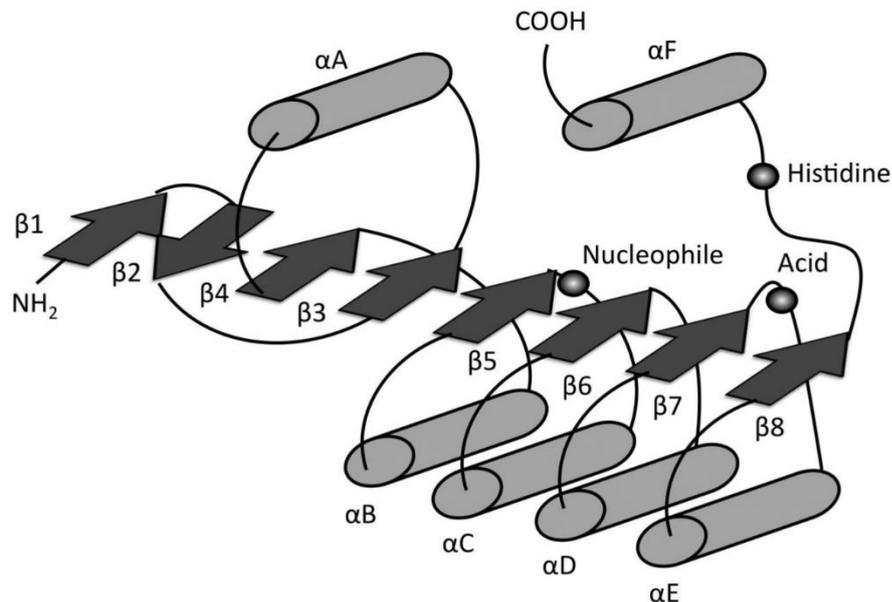
$\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  = cadeias carbônicas

Fonte: Tanaka, acesso: 2023

As esterases não necessitam de cofatores, o que faz delas biocatalizadores de interesse, além de estarem presente entre as duas maiores classes de hidrolases (Sayali et al., 2013).

Sendo reconhecido como um dos subgrupos de enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ -hidrolase ( $\beta$ -fita envolvida entre duas camadas de  $\alpha$ -hélice), possuem sua atividade baseada na tríade catalítica (união de três aminoácidos coordenados encontrados no sítio ativo), que consiste em um nucleófilo composto por serina, cisteína e aspartato - com o aminoácido serina sendo incorporado na sequência Glicina-x-Ser-x-Glicina; uma histidina, ácido e dois ou três aminoácidos (Figura 4) (Ollis et al., 1992; Bornscheuer, 2002; Satoh & Hosokawa, 2006; Choi et al., 2016; Lee, 2016; Bauer et al, 2019; Meneses, 2020; Hetrick & Raines, 2022).

**Figura 4.** Representação esquemática da dobra  $\alpha$ ,  $\beta$ -hidrolase.



Fonte: Lord et al., (2013).

As esterases são encontradas em animais, plantas e microrganismos, alimentando a hipótese de que esta família de enzimas provavelmente evoluiu no intuito de desintoxicar compostos xenobióticos (Hetrick & Raines, 2022). Geralmente, são classificadas como carboxilesterases, colinesterases e arilesterases, (Yaqoob et al., 2022; Shital et al., 2023). Ademais, quando atuante em substrato hidrossolúvel, é significativamente ativa e estável em pH 6 (Lai et al., 2019 ; Sharma et al., 2017; Famiglietti et al., 2023), além de serem biodegradáveis (López-Iglesias & Gotor-

Fernández, 2015; Littlechild, 2015; Famiglietti et al., 2023). Além disso, algumas esterases apresentam tolerância a altas temperaturas, resistência a condições extremas de pH, salinidade e a presença de solventes orgânicos (Castilla et al., 2017). Estas características, quando combinadas, trazem vantagem aos processos industriais a depender da reação catalítica a que será aplicada (Zarafeta et al., 2016).

Do ponto de vista bioquímico, as esterases são responsáveis pela ativação de pró-fármacos - versão inativa de um fármaco administrado a um paciente e ativada extra ou intracelularmente por processo enzimático ou químico visando expor o fármaco ativo (Clas et al, 2014), e pela desintoxicação de muitos fármacos através da hidrólise dos compostos que apresentem ligações éster, tioéster e amina em suas estruturas (Shabbir et al., 2022). Atualmente, considera-se que as esterases estão presentes no metabolismo de cerca de 10% dos medicamentos comercializados (Fukami, 2015; Shabbir et al., 2022).

É válido destacar, ainda, que as esterases passaram a adquirir maior importância devido às suas funções farmacológicas e toxicológicas (Shabbir et al., 2022), e que também se fazem presente nas aplicações em sínteses orgânicas de escala laboratorial e processamento em escala industrial de gorduras e óleos a fim de permitir sínteses quirais de ingredientes farmacêuticos ativos (Panda & Gowrishankar, 2005; Hetrick & Raines, 2022). Contudo mais estudos precisam ser realizados a fim de se entender por completo a importância dessas enzimas (Fukami & Yokoi, 2012; Fukami, 2015 ; Shabbir et al., 2022).

### **3.2.2. Produção de Esterases por *Bacillus***

As esterases podem ser encontradas e obtidas a partir de diferentes fontes, tais como animais, microrganismos e plantas (Sharma et al., 2017; Famiglietti et al., 2023) e a partir da fonte de isolamento destas moléculas, são encontradas e descritas diferentes funções e aplicações para elas (Rao et al., 2013; Famiglietti et al., 2023).

Uma vez que microrganismos são capazes de viver nos mais diversos ambientes naturais, desde locais úmidos, salgados e alcalinos até leitos marinhos profundos e frios ou ambientes de alta temperatura, quando estas moléculas são provenientes destes microrganismos, são capazes de possuir propriedades funcionais variadas em função da diversidade encontrada na sua fonte de extração (Rao et al., 2013; Famiglietti et al., 2023). Hoje, sabe-se que microrganismos produtores de esterases são capazes de se espalhar em substâncias ou superfícies oleosas (Lai et

al., 2019; Famiglietti et al., 2023), onde *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* são exemplos de espécies produtoras de esterases (Kaiser et al., 2006; Bao et al., 2012; Sharma et al., 2016; Famiglietti et al., 2023).

O isolamento dessas enzimas a partir de *Bacillus* e gêneros próximos vem sendo exploradas em diversos setores industriais (Famiglietti et al., 2023). Algumas espécies apresentam uma produção de esterases bem definidas como *Bacillus pumilus* com acetil xilana esterase (Degrassi et al., 1998), *B. subtilis* com acetilesterase (Higerd & Spizizen, 1973) e *B. subtilis* NRRL 365 com carboxila esterase I e II (Meghji et al., 1990).

As esterases possuem uma gama de aplicações industriais como em alimentos, detergentes, produtos químicos, farmacêuticos, cosméticos e biodiesel (Liaw et al., 2010; Bhardwaj et al., 2020). Além disso, atualmente existe uma grande demanda pela obtenção de novas esterases a partir de microrganismos dada a capacidade destes organismos em colonizar diferentes ambientes (Bhardwaj et al., 2020).

### **3.2.3. Aplicações Biotecnológicas**

O valor de mercado global das enzimas obtidas via biotecnologia alcançou a marca dos 5 bilhões de dólares em 2016, e as lipases e esterases contabilizaram aproximadamente 10% das enzimas industriais, perdendo o pódio apenas para carboidrases e proteases, respectivamente (Singh et al., 2016; Guerrand, 2017; Lai et al., 2018).

O avanço do mercado de biocatalisadores acaba sendo impulsionado pela capacidade das enzimas de catalisar reações com uma eficiência maior e mais estável, além do fator ecologicamente correto quando comparado com os processos químicos convencionais, fazendo-as moléculas atraentes e versáteis do ponto de vista industrial (Choi and Lee, 2001; Bornscheuer, 2002; Hasan et al., 2006; de Godoy Daiha et al., 2015; Singh et al., 2016; Lai et al., 2018). Deste modo, as esterases têm muitas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e petroquímica (Lai et al., 2018). Muitos dos emulsificantes e aromatizantes utilizados na indústria farmacêutica e cosmética são ésteres de ácidos graxos à base de glicerol que, na indústria alimentícia, ajudam a melhorar a atividade de superfície para gerar a estabilização adequada dos alimentos processados; enquanto na indústria de cosméticos, melhora a consistência de cremes e loções (Lai et al., 2018). Alguns aromatizantes e compostos aromáticos são ésteres alifáticos de cadeia curta – aditivos que são

utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos importantes - encontrados em baixa quantidade na natureza (Su et al., 2016).

Com relação à indústria farmacêutica, uma das propriedades das esterases é a sua capacidade de diferenciar entre enantiômeros de moléculas quirais, tornando-se biocatalisadores de grande interesse (Bornscheuer, 2002, Lai et al., 2018), além da ativação de pró-fármacos, uma vez que uma de suas estratégias de desenvolvimento é mascarar as funcionalidades polares, como álcoois ou ácidos carboxílicos, transformando-os em ésteres e, assim, melhorando a permeabilidade celular (Testa, 2009; Hamada, 2017; Larsen & Johnson, 2018). Ademais, é possível destacar, ainda, a utilização de ésteres na produção de perfumes e degradação de materiais sintéticos (Panda & Gowrishankar, 2005).

Em contrapartida, vale destacar que o alto custo para obtenção dessas enzimas, junto com uma baixa estabilidade operacional, segue sendo um fator importante que limita suas aplicações na indústria de forma generalizada (Lai et al., 2018).

### **3.3. Substâncias Biocidas**

Biocida é o nome dado para substâncias ativas utilizadas para combater, neutralizar, exterminar ou prevenir a ação de microrganismos vivos (Polyorganic, acesso: 2023). Muitas das substâncias biocidas biossintetizadas por microrganismos esporulados são detectadas na fase estacionária onde a esporulação é acentuada.

A esporulação, mecanismo de sobrevivência, é uma das características do gênero *Bacillus*. A exaustão de nutrientes leva a indução de quimiotaxia e motilidade, síntese de enzimas catabólicas, desenvolvimento de competência genética e produção de antibióticos peptídicos (Marahiel, Nakano & Zuber, 1993; Monteiro, 2002). É na fase da esporulação ou pré-esporulação que muitas dessas moléculas são biossintetizadas, por exemplo bacteriocinas.

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, sintetizados nos ribossomos e possuindo entre 30 e 60 aminoácidos, com atividade antagônica contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo a bactéria produtora deste peptídeo portadora de mecanismos de imunidade específicos que a protege da sua bacteriocina (And & Hoover, 2003; Cotter et al., 2013; Ogaki et al., 2015). Esses peptídeos variam quanto à atividade, mecanismo de ação, massa molecular, propriedade bioquímica e origem genética (Tagg et al., 1976;

Klaenhammer, 1988; 1993; Abee et al., 1995; Gálvez et al., 2008; Cleveland et al., 2011; Leite, 2012), e foram descobertos pela primeira vez em 1925, com a colicina, bacteriocina produzida por *Escherichia coli* (Cascales et al., 2007). As substâncias inibitórias similares a bacteriocinas (BLIS), são definidas como peptídeos ou proteínas antimicrobianas com aminoácidos incomuns, apresentando diferentes estruturas químicas (Settanni & Corsetti, 2008) e atuando como substâncias antagônicas, com potencial bactericida (Leite, 2012). Nesta perspectiva e na busca por novos antibióticos, membros do gênero *Bacillus* são considerados produtores de substâncias antimicrobianas, o que inclui bacteriocinas e BLIS (Monteiro, 2002; Stein, 2005; Abriouel et al., 2011).

### **3.4. Substâncias Biocidas Produzidas por *Bacillus***

Grande parte das bactérias Gram-positivas apresentam a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos (Abriouel et al., 2011), de modo que as bacteriocinas produzidas por estas bactérias são as mais abundantes e diversas, sendo similares a peptídeos microbianos produzidos por eucariotos (Oliveira, 2019).

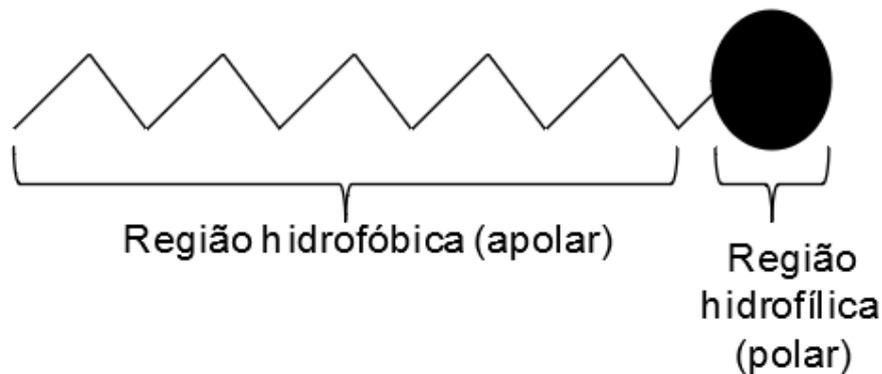
A produção de bacteriocinas ou substâncias similares foi descrita para várias espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* e *B. licheniformis* (Shafia, 1966; Bradley, 1967; Novotny & Perry, 1992; Bizani et al., 2005; Kamoun et al., 2005; Cherif et al., 2006; He et al., 2006; Sebei et al., 2007). Dentre as bacteriocinas produzidas, há um destaque para a subtilina, produzida por *B. subtilis* e a coagulina, produzida por *B. coagulans* (Cherif et al., 2006; Rasi, 2010). A primeira bacteriocina de *B. thuringiensis* caracterizada foi a thuricina, biossintetizada por 46 estirpes de *Bacillus thuringiensis* e capaz de inibir espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bowdish et al., 2005; Rasi, 2010; Oliveira, 2019).

### **3.5. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus***

Ainda nesta perspectiva, pode-se dizer que há também um certo destaque para os chamados biossurfactantes. Podendo ser de origem química ou biológica, os surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam característica química dupla - hidrofílica e lipofílica (Figura 5) (Nitschke et al., 2004), e que apresentam propriedades de redução da tensão superficial e interfacial, o que acaba por lhes conferir uma grande variedade de aplicações em processos, principalmente na

indústria de petróleo, cosméticos, sabão, detergente e produtos de higiene (Cameotra & Makkar, 2004). Devido a sua importância, e visando diminuir os riscos ao meio ambiente, os surfactantes naturais (biossurfactantes) passaram a receber um maior interesse (Silva et al., 2016).

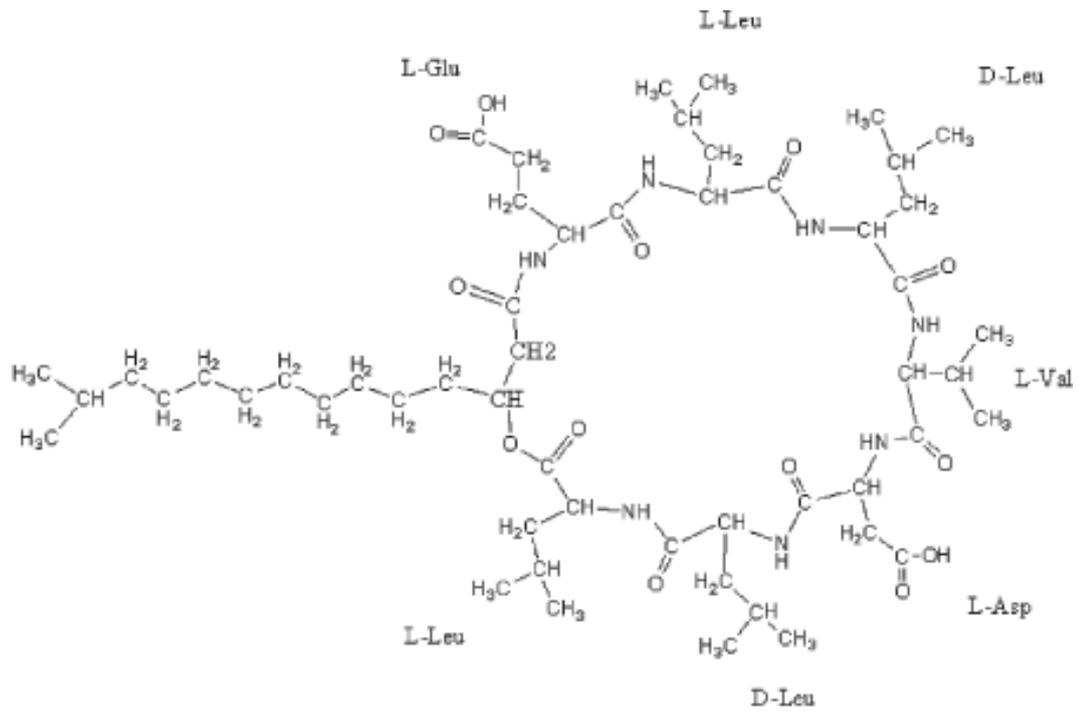
**Figura 5.** Representação esquemática da estrutura orgânica de uma molécula anfifílica.



Fonte: Ferreira, acesso: 2023.

A detecção de microrganismos produtores de surfactantes, dentre eles, *Bacillus* e *Lysinibacillus*, são realizadas através de técnicas em meio ágar sangue visando destruir eritrócitos, uma vez que o tamanho do halo de  $\beta$ -hemólise está associado à capacidade de produção dessas substâncias (Lin, 1996; Monteiro, 2002). Sabe-se que algumas linhagens de *B. subtilis* produzem lipopeptídeos cíclicos com carácter surfactantes; lipopeptídeo esses que apresentam potente atividade biocida (Cameotra & Makkar, 2004; Fernandes, 2006). Dentre todos os biossurfactantes produzidos por este gênero, provavelmente o mais conhecido é a surfactina (Figura 6) (WU et al., 2017; Almeida et al., 2020). A surfactina, sintetizada por linhagens de *B. subtilis*, apresenta na sua estrutura um peptídeo cíclico composto de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácidos graxo (Felix, 2012). É válido destacar, ainda, que a depender da espécie produtora e tipo de biossurfactante biossintetizado, sua estrutura muda.

Figura 6. Estrutura da surfactina.



Fonte: Barros et al., 2007.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismos e meios de preservação

As bactérias utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pela professora Eugênia Rios e estão preservadas, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE, em discos ou fitas de papel de filtro (Tabela 1). A escolha desses microrganismos foi realizada aleatoriamente.

**Tabela 1.** Origem das espécies de *Bacillus* e *Lysinibacillus* e sua preservação.

<b>Microrganismos</b>	<b>Origem</b>	<b>Comentários</b>	<b>Manutenção/Preservação</b>
1. <i>Bacillus thuringiensis sub israelensis</i>	Instituto de Biologia-México	cedido pela professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos/discos de papel
2. <i>Bacillus subtilis LFBM 01</i>	Isolado do produto CENZONE® - probiótico para gado bovino	cedido pela professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos/discos de papel
3. <i>Bacillus subtilis LFBM 02</i>	Isolado de efluente e Resistente ao Cloro	cedido pela professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos/discos de papel
4. <i>Lysinibacillus sphaericus CCGB 664</i>	Isolado no estado do Amazonas - origem da coleção de cultura Osvaldo Cruz	cedido pela professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos/discos de papel

5. <i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB148	Isolado da água- origem da coleção de cultura Osvaldo Cruz	cedido pela professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos- Departamento de Antibióticos/discos de papel
6. <i>Bacillus thuringiensis</i>	Instituto Aggeu Magalhães – Recife	cedido a professora Eugênia Rios pela pesquisadora Leda Regis ativo contra culicídeos	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos- Departamento de Antibióticos/discos de papel
7. <i>Bacillus sphaericus</i> 2362, sorotipo H5a5b	Isolado do mosquito negro na Nigéria	cedido a professora Eugênia Rios-	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos- Departamento de Antibióticos/discos de papel
8. <i>Bacillus coagulans</i> LFBM 01	Isolado do probiótico Azo yeast plus ®	Isolado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos- Departamento de Antibióticos/discos de papel
9. <i>Bacillus pumillus</i> CCGB 0203	Isolado do solo- origem da coleção de cultura Osvaldo Cruz	cedido a professora Eugênia Rios	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos- Departamento de Antibióticos/discos de papel

Fonte: A autora (2023).

## 4.2. Meios de cultura

Diversos meios de cultura foram utilizados neste trabalho. Dentre eles:

### 4.2.1. Agar Nutritivo (AN) Standard

Utilizado para obtenção de cultura viável.

Composição:

Extrato de levedura.....	2,8g
Peptona.....	15,6g
NaCl.....	5,6g
Ágar.....	6,0g
Glicose.....	1,0g
Água destilada.....	1000ml

Preparação de Meio: Adicione os componentes à água destilada/deionizada e complete o volume para 1,0L. Homogenize. Aqueça suavemente e deixe levantar fervura. Distribua em tubos ou frascos. Autoclave por 15 min a 1 atm de pressão 121°C. Verta em placas de Petri estéreis.

### 4.2.2. Meio Agar Sangue

Utilizado para realização dos testes de atividade hemolítica dos *Bacillus*.

Composição:

Extração de Carne.....	10,0g
Peptona.....	10,0g
NaCl.....	5,0g
Ágar.....	15,0g
Sangue de carneiro.....	50-80mL
Água destilada.....	1000mL

pH 6,8 – 7,0

Preparação de Meio: Dissolver 40g/L. Autoclave por 15 min a 1 atm de pressão 121°C. Deixe esfriar a 45-50°C. Após esse processo, adicione 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Verta em placas Petri estéreis. Os microrganismos que biossintetizam biossurfactante aparecem com as colônias apresentando uma  $\beta$ -hemólise no meio.

#### **4.2.3. Meio Brain Heart Infusion (BHI) – Ágar Cérebro Coração**

Utilizado para reativação das culturas de *Bacillus* preservadas.

Composição:

Infusão Cérebro e Coração.....	17,5g
Peptona.....	10,0g
Glicose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato Dissódico.....	2,5g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000ml

pH 7,4 – 7,6

Preparação de Meio: Adicione os componentes à água destilada/deionizada e complete o volume para 1,0L. Homogenize. Aqueça suavemente e deixar levantar fervura. Distribua em tubos ou frascos. Autoclave por 15 min a 1 atm de pressão 121°C. Verta em placas de Petri estéreis.

#### **4.2.4. Meio Tween 80**

Utilizado para analisar a capacidade dos *Bacillus* hidrolisarem Tween 80 e, portanto, analisar a capacidade de produzir esterase.

Composição:

Ágar.....	12,0g
Peptona.....	10,0g
NaCl.....	5,0g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,1g
Tween 80.....	10.0ml
Água destilada.....	1000ml

pH 7,2 – 7,4

Preparação de Meio: Adicione os componentes à água destilada/deionizada e complete o volume para 1,0L. Homogenize. Aqueça suavemente e deixar levantar fervura. Distribua em tubos ou frascos. Autoclave por 15 min a 1 atm de pressão 121°C. Verta em placas de Petri estéreis. As bactérias que hidrolisam o Tween 80 apresentam-se como colônias rodeadas por uma zona opaca.

#### 4.3. Condições de cultivo e seleção qualitativa de microrganismos produtores de esterase

Para a seleção das espécies de *Bacillus* produtoras de esterase, culturas preservadas em papel de filtro foram cultivadas em caldo de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 h (Figura 7).

Em seguida, essas culturas foram inoculadas em meio líquido Tween 80® 1% pH 5,0 e pH 7,0 e semeadas em ágar Tween80® pH 5,0 e pH 7,0. As placas foram então observadas quanto à formação de um halo opaco em torno das colônias, as quais foram medidas em milímetros (mm).

A presença de zonas opacas foi indicativo de hidrólise do Tween 80 e consequentemente positividade no teste de produção de esterase.

**Figura 7.** Culturas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* em meio BHI.



Fonte: A autora (2023)

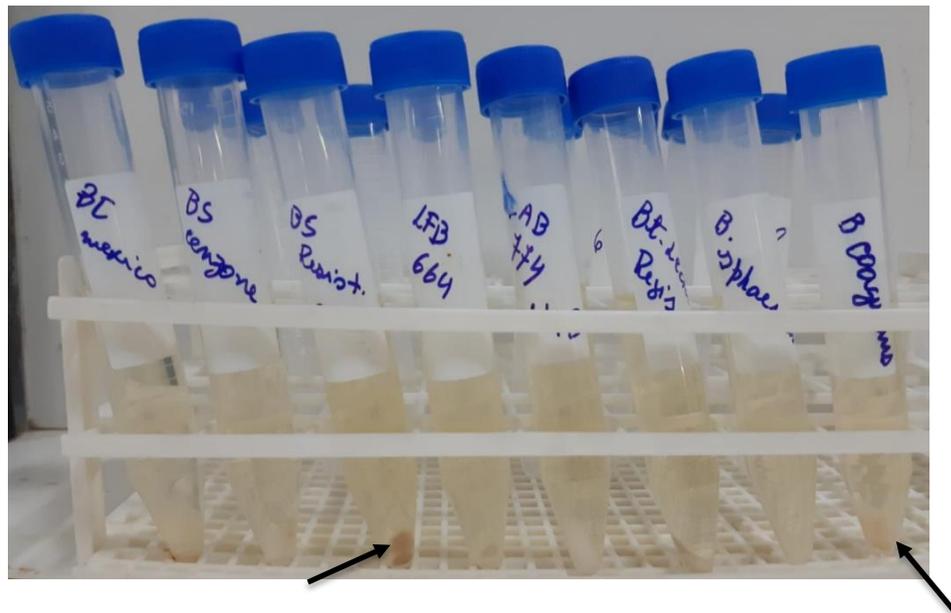
#### 4.4. Seleção qualitativa de microrganismos produtores de esterase nos sobrenadantes livres de células

Para essa etapa, as culturas crescidas em caldo Tween80® pH 5,0 e pH 7,0 foram centrifugadas 3000g por 30 min e o sobrenadante (Figura 8) filtrado utilizando membrana Millipore® de porosidade 0,45µm (Figura 9).

Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram saturados com esse filtrado, depositados sobre a superfície do ágar Tween80® pH 5,0 e pH 7,0 e incubados a 37°C por 24 horas.

A leitura foi realizada pelo aparecimento de um halo opaco em torno do disco, medido em milímetros (mm).

**Figura 8.** Espécies de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* após centrifugação, onde é possível notar a presença de precipitado (seta) e sobrenadante.



Fonte: A autora (2023)

**Figura 9.** Seringa e membrana Millipore® de porosidade 0,45µm



Fonte: A autora (2023)

#### 4.5. Atividade hemolítica das culturas de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*

O teste de hemólise foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade hemolítica desses gêneros, o que pode ser utilizado como indicador da produção de biossurfactantes.

Para a realização desta etapa, 10 µL de culturas de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*, previamente crescidas em caldo nutritivo, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h e a leitura dos diâmetros dos halos de hemólise medido em milímetros.

A presença de zonas de β-hemólise foi presuntivo da biossíntese de biossurfactantes.

#### 4.6. Microrganismos teste

Para analisar qualitativamente a atividade antagônica de espécies de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*, foram utilizados cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores de glicose preservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE (Tabela 2). Essas bactérias de origem da *American Type Culture Collection*, foram escolhidas com base no seu perfil de multirresistência.

**Tabela 2.** Origem das espécies patogênicas e seus perfis de resistência.

<b>Microrganismos - teste</b>	<b>Origem/perfil de resistência</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	American Type Culture Collection/ cepa multidroga resistente
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	American Type Culture Collection/ cepa vancomicina resistente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	American Type Culture Collection/ cepa produtora de carbapenemase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa selvagem/produtora de biofilme
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	American Type Culture Collection/cepa multidroga resistente

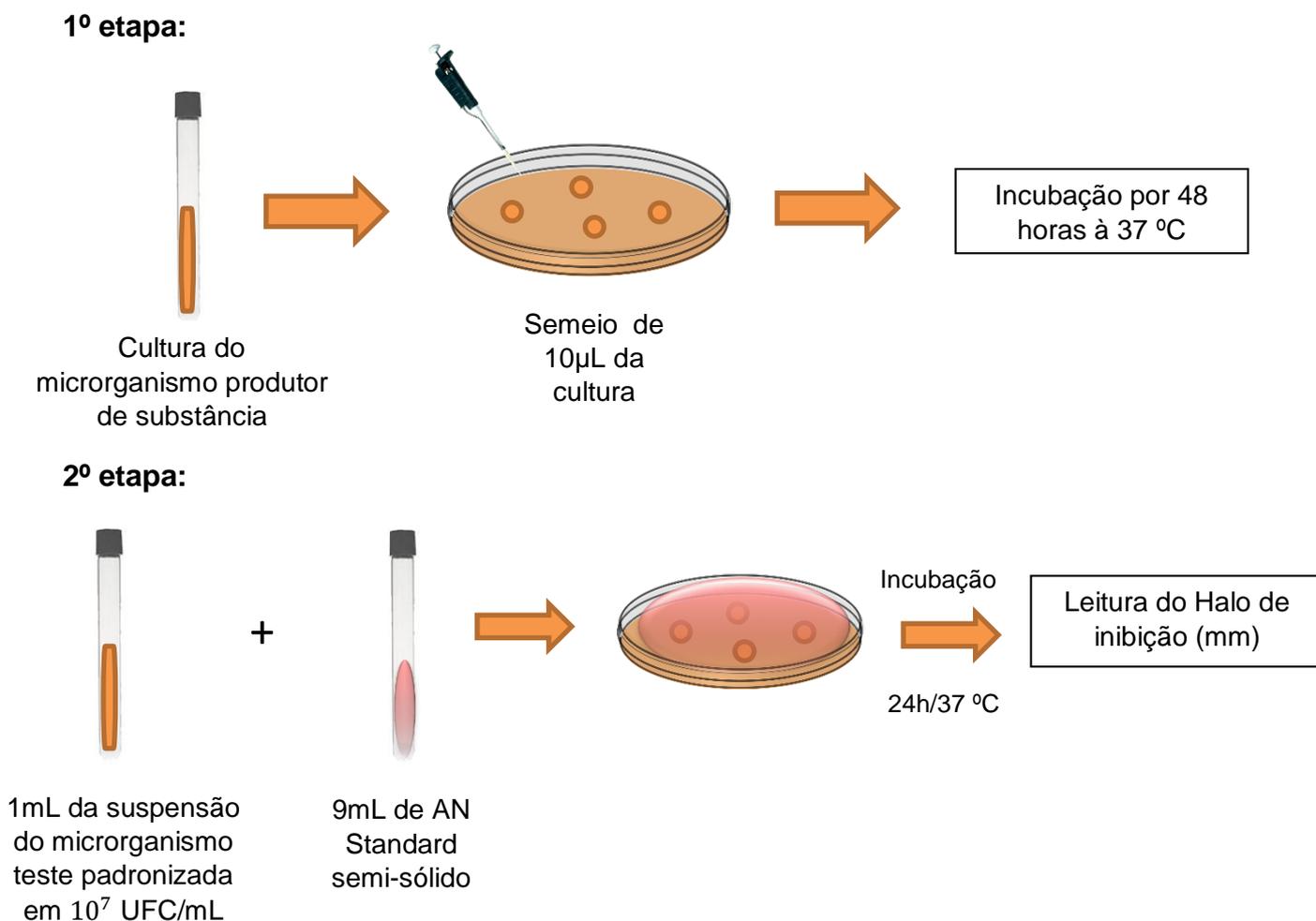
Fonte: A autora (2023)

#### 4.7. Atividade antagônica qualitativa

A atividade antagônica qualitativa sobre microrganismos patogênicos foi realizada utilizando o *Agar Spot Test* (Schillinger & Lucke, 1989). O teste foi realizado a partir de duas etapas, onde na primeira foi cultivado o microrganismo produtor de bacteriocina, neste caso *Bacillus* e *Lysinibacillus*, cultivado em caldo nutritivo. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  desta cultura foi depositada em placa de Petri contendo ágar nutritivo sólido e incubada por 48h à 37°C.

A segunda etapa consiste em inocular 1mL de suspensão dos microrganismos teste patogênica padronizada em  $10^7$  UFC/mL, através da escala McFarland, em 9mL de meio semi-sólido AN. O meio semi-sólido é então vertido sobre o ágar sólido. A leitura dos resultados foi realizada pela subtração do diâmetro total do halo de inibição menos o diâmetro das colônias de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*.

**Figura 10.** Esquematização do método *Agar Spot Test*



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação qualitativa de esterase nas culturas

A seleção qualitativa das espécies de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* observadas através da medida em milímetros (mm) dos halos em torno da colônia está apresentada na Tabela 3 e Figuras 11 e 12.

Várias espécies de *Bacillus* e *Lysinobacillus sphaericus* produziram zona de hidrólise, entretanto, apenas *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664; *Lysinibacillus sphaericus* CCGB148 e *Bacillus sphaericus* 2362 sorotipo H5a5b produziram esterase nos meios com pH 5,0 e pH 7,0 mostrando assim, uma versatilidade na produção desta enzima em relação ao pH.

**Tabela 3.** Crescimento de espécies de *Bacillus* e *Lysinibacillus* meio líquido Tween 80 em pH 5,0 e 7,0 bem como seus halos de hidrólise.

Microrganismo	Crescimento em caldo Tween80		Hidrólise do Tween80 1% (diâmetro mm) $\bar{x} \pm \delta$	
	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0
<i>Bacillus thuringiensis sub israelensis</i>	+	+	28,0 $\pm$ 0,0	0
<i>Bacillus subtilis</i> LFBM 01	+	+	22,0 $\pm$ 1,4	0
<i>Bacillus subtilis</i> LFBM 02	+	+	20,5 $\pm$ 2,1	0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB 664	+	+	32,0 $\pm$ 3,5	15,2 $\pm$ 0,35
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB148	+	+	18,0 $\pm$ 7,0	20,0 $\pm$ 0,0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	40,5 $\pm$ 13,4	0
<i>Bacillus sphaericus</i> 2362	+	+	17,5 $\pm$ 7,7	25,2 $\pm$ 2,6

sorotipo H5a5b				
<i>Bacillus coagulans</i> LFBM 01	-	+	0	23,5 ± 4,9
<i>Bacillus pumillus</i> CCGB 0203	-	-	0	0

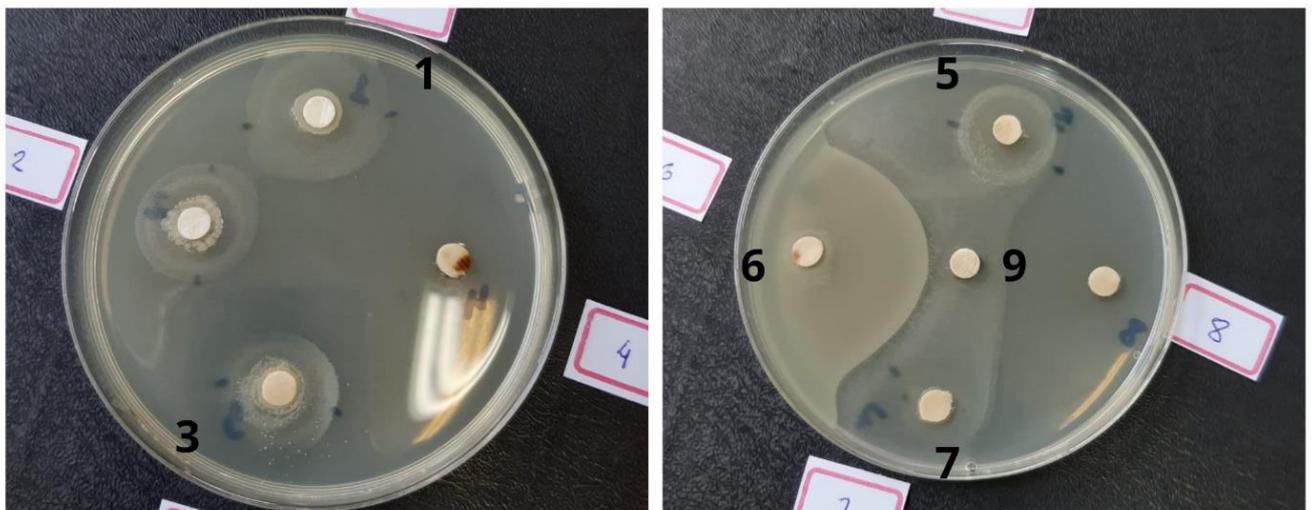
$x \pm \delta$  = Média  $\pm$  desvio padrão da amostra; - = não houve crescimento no meio com Tween 80 ® como fonte de carbono; 0 = Nenhum halo de hidrólise do Tween 80 ®

Fonte: A autora (2023)

A partir das figuras e tabela, é possível notar que o *Bacillus sphaericus* 2362 sorotipo H5a5b e *Bacillus thuringiensis* apresentaram, em média, os maiores halos de hidrólise em pH 7,0 e 5,0, respectivamente.

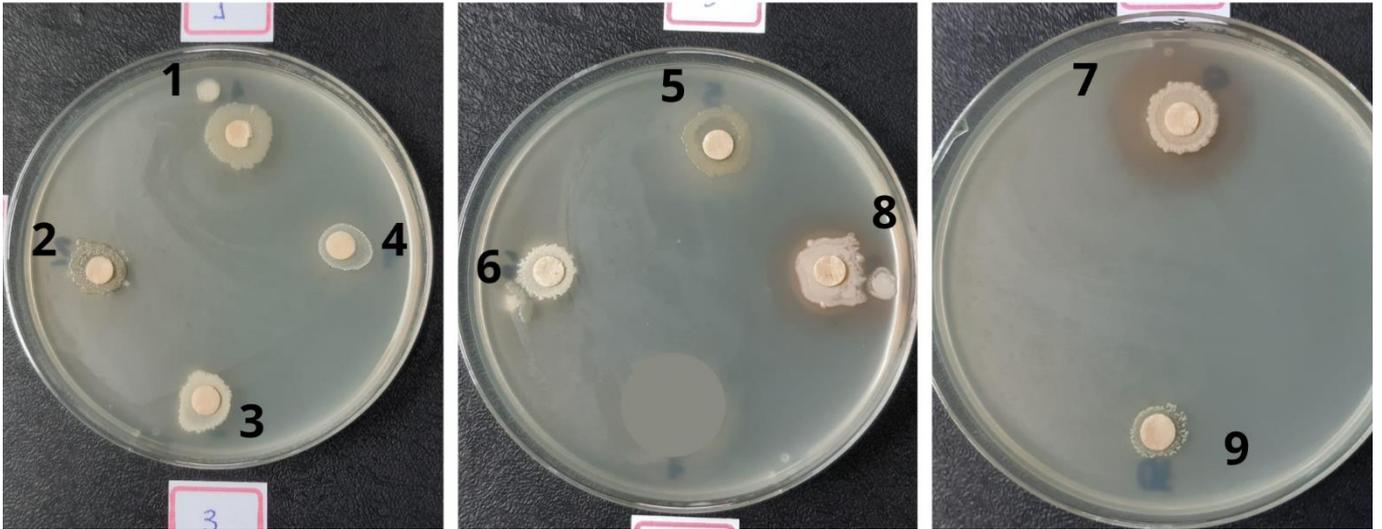
É interessante analisar que espécies que não hidrolisaram ou tiveram halos muito pequenos em pH 5,0, tiveram um desenvolvimento consideravelmente melhor em pH 7,0 e vice-versa; é o caso de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus coagulans* LFBM 01, por exemplo.

**Figura 11.** Halos de hidrólise de Tween 80 em pH 5,0.



Fonte: A autora (2023).

**Figura 12.** Halos de hidrólise em meio sólido Tween 80 em pH 7,0.

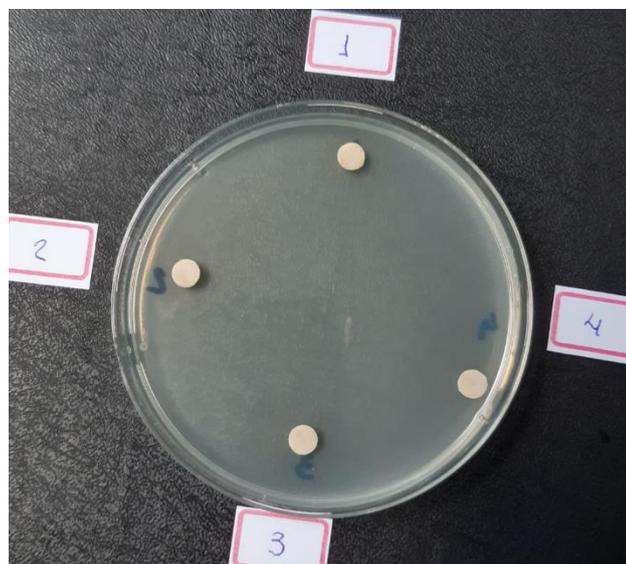


Fonte: A autora (2023).

## 5.2. Avaliação qualitativa de esterase nos sobrenadantes isento de células

Após a filtração, não foi observada hidrólise do Tween 80® com nenhum dos sobrenadantes (Figura 13).

**Figura 13.** Ausência de halos de hidrólise do Tween 80 com o filtrado isento de células das culturas de *Bacillus sp* e *Lisinibacillus sphaericus*.



Fonte: A autora (2023).

### 5.3. Atividade Hemolítica

Os resultados dos ensaios para atividade hemolítica de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* estão expostos na Tabela 4 e Figura 14.

Dentre os nove microrganismos avaliados, quatro apresentaram halos de hemólise, sendo eles *Bacillus thuringiensis sub israelensis*, *Bacillus subtilis LFBM 01*, *Lysinibacillus sphaericus CCGB 664* e *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis sub israelensis* destacou-se dos demais microrganismos apresentando uma  $\beta$ -hemólise com halo de 12mm.

**Tabela 4.** Atividade hemolítica dos isolados de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*.

Microrganismos	Produção de Hemolisina
	Diferença entre o diâmetro da hemólise em torno da colônia e da própria colônia (mm)
<i>Bacillus thuringiensis sub israelensis</i>	(25-13) = 12
<i>Bacillus subtilis</i> LFBM 01	(14-8) = 6
<i>Bacillus subtilis</i> LFBM 02	(0-8) = 0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB 664	(20-13) = 7
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB148	(0-8) = 0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	(9-8) = 1
<i>Bacillus sphaericus</i> 2362 sorotipo H5a5b	(0-15) = 0
<i>Bacillus coagulans</i> LFBM 01	(0-8) = 0*
<i>Bacillus pumillus</i>	

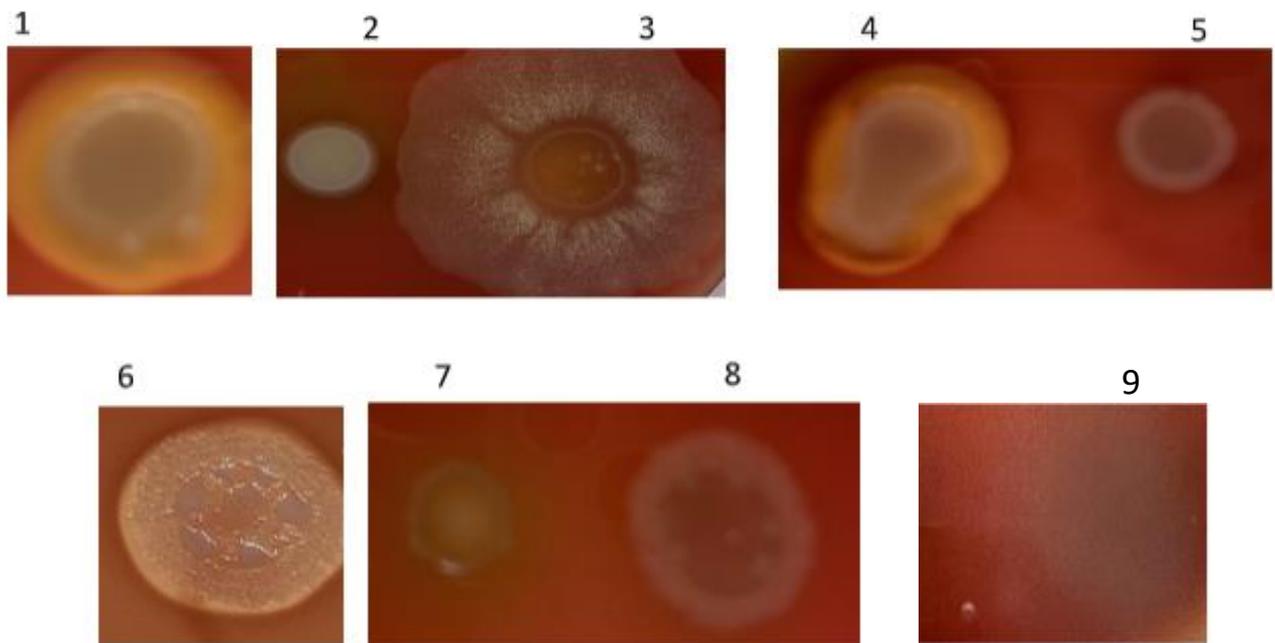
CCGB 0203

(0-35) = 0

\*hemólise parcial

Fonte: A autora (2023)

**Figura 14.** Atividade hemolítica dos isolados de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*.



Fonte: A autora (2023)

#### 5.4. Atividade Antagônica de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* contra microrganismos patogênicos

Os resultados para a atividade antimicrobiana *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* sobre microrganismos patogênicos estão apresentados nas figuras 15, 16.A e 16.B e Tabela 5. Esse resultados mostram a inibição de crescimento de cinco microrganismos multi-droga resistentes pelo *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* avaliados: *B.subtilis* LFBM 02; *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664; *B. sphaericus* 2362 e *B.coagulans*.

*B. sphaericus* 2362 demonstrou ser o mais eficiente na atividade antagônica frente *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705; enquanto que na inibição, *B.coagulans*

se mostrou mais eficiente, apresentando atividade antagônica contra cinco microrganismos.

**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana de *Bacillus* e *Lysinibacillus* frente a microrganismos patogênicos.

Microrganismos patogênicos	Atividade antimicrobiana			
	(diferença entre o diâmetro de inibição do crescimento em torno da colônia e da colônia) (mm))			
	<i>B.subtilis</i> LFBM 02	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CCGB 664	<i>B. sphaericus</i> 2362	<i>B.coagulans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	(13-9) = 4mm	(19-10) = 9mm	(20-7) = 13mm	(12-7) = 5mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	(19-11) = 8mm	-	(11-7) = 4mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	-	-	-	(10-7) = 3mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 335919	-	-	-	(11-7) = 4mm
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-	-	(10-7) = 4mm

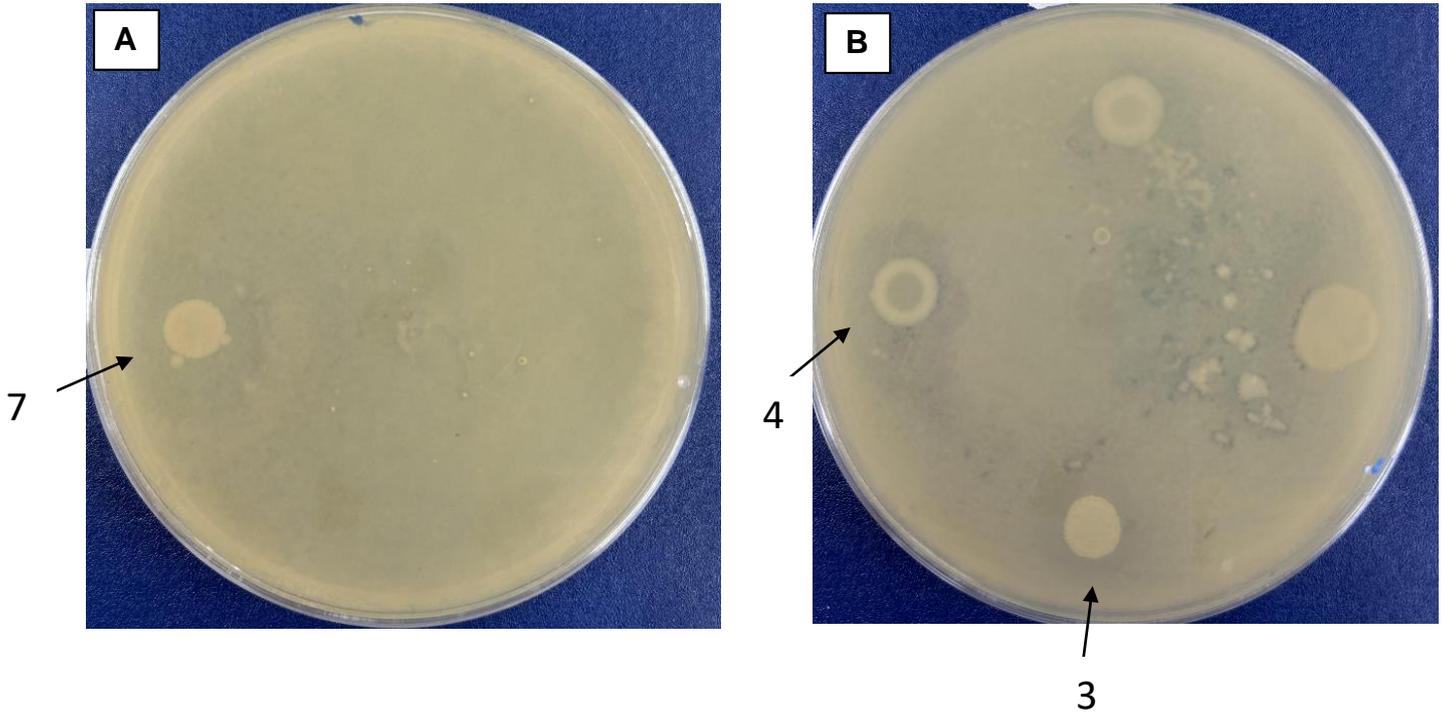
Fonte: A autora (2023)

**Figura 15.** Antagonismo entre *Bacillus coagulans* e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (A); *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (B); *Staphylococcus aureus* ATCC 335919 (C) e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (D)



Fonte: A autora (2023)

**Figuras 16.** **A-** Antagonismo entre *Bacillus sphaericus* 2362 (**7**) sorotipo H5a5b e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705. **B-** Antagonismo entre *Bacillus subtilis* LFBM 02 (**3**) e *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664 (**4**) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705.



Fonte: A autora (2023)

## 6. DISCUSSÃO

A produção de enzimas por bactérias desempenha um papel de extrema importância em diversos processos biológicos e biotecnológicos (Silva, acesso: 2023). No campo da biotecnologia, as enzimas bacterianas são amplamente utilizadas na produção de alimentos, na indústria farmacêutica e na produção de biocombustíveis, entre outros setores (Monteiro & Do Nascimento, 2009). Nesta perspectiva, a utilização de esterase de origem microbiológica é crescente nos mais diversos setores industriais (Leite, 2021), mas é necessário atentar para determinados fatores que possam interferir na produção dessas moléculas, como pH, temperatura e tempo (UFRGS, acesso: 2023). O pH do meio de cultivo emerge como um fator crítico que influencia diretamente na produção enzimática, uma vez que a variação deste parâmetro pode afetar a expressão de informações e a atividade da enzima (Pinheiro et al., 2005; Fleuri & Sato, 2008).

Pesquisas anteriores demonstraram o impacto que as condições de cultura, dentre elas o pH, exercem na produção enzimática (Fleuri & Sato, 2008); e, principalmente, na produção de esterase por espécies de *Bacillus*, como em Bhardwaj et al., (2020), cujo trabalho utilizou mais de dez diferentes concentrações de pH em culturas de *Bacillus lincheniformis*, a fim de encontrar um pH ótimo para produção da esterase.

No presente estudo, os resultados de atividade esterásica, expostos na Tabela 3 e Figuras 11 e 12, mostraram que *B. thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664 apresentaram os maiores índices de produção enzimática em pH 5,0, enquanto *B.sphaericus* 2362 sorotipo H5a5B apresentou maior índice de produção em pH 7,0, de modo a confirmar que a depender do microrganismo e do pH, a produção de esterase é maior ou menor.

Dentre as nove cepas, sete produziram esterase em pH 5,0, enquanto apenas quatro produziram em pH 7,0. Pode-se dizer que estes resultados estão em consonância ao apontado na literatura, uma vez que esta enzima mostrou ter melhor produção e atividade em pH ácido (Meneses, 2020; Famiglietti et al., 2023). Ademais, três cepas ( *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664, *Lysinibacillus sphaericus* CCGB148 e *B.sphaericus* 2362 sorotipo H5a5B ) foram capazes de produzir esterase nos dois valores pH, demonstrando versatilidade em biossintetizar a esterase em pH 5,0 e 7,0 e, portanto, interessantes para aplicações industriais. Vários trabalhos, apontaram para essa capacidade e versatilidade de *B.sphaericus* e *Lysinibacillus sphaericus* em

produzir esterases (Jackson et al., 1995; Saminathan et al., 2009), o que esteve de acordo com os resultados encontrados neste estudo.

A única espécie aqui presente que não apresentou nenhum tipo de produção de esterase foi *B.pumilus*, contradizendo o que dizem vários estudos a respeito da capacidade da espécie de produzir esta enzima. Acreditamos que isso muito se deve a cepa utilizada neste estudo, configurando-se como uma cepa não produtora.

Com relação a produção de esterase extracelular avaliada nos filtrados, foi observado que nenhuma atividade foi detectada, de modo que esta enzima provavelmente esteja presente intracelularmente.

Em paralelo a isso, sabe-se que uma série de atividades são conferidas aos lipopeptídeos com atividade biossurfactante, dentre elas a atividade hemolítica. Esta é uma propriedade associada com a característica anfifílica de sua estrutura química, sendo, portanto, utilizada para a seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes (Monteiro, 2002; Bueno, 2008). Testes de hemólise foram realizados visando analisar a possível produção de biossurfactantes por espécies de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*.

Os resultados para estes ensaios, expostos na Tabela 4 e Figura 13, mostrou que dentre os nove isolados, quatro apresentaram  $\beta$ -hemólise, sendo eles *Bacillus thuringiensis sub israelensis*, *Bacillus subtilis LFBM 01*, *Lysinibacillus sphaericus CCGB 664* e *Bacillus thuringiensis*, sendo *B. thuringiensis sub israelensis* a cepa que apresentou o maior halo hemolítico. *Bacillus thuringiensis* é reconhecido por ser a bactéria base de importantes inseticidas microbiológicos (Angelo et al, 2010). Deste modo, os resultados aqui encontrados apontam mais uma característica positiva para esta espécie.

A cepa *Bacillus coagulans LFBM 01* foi a única a apresentar uma  $\alpha$ -hemólise ou hemólise parcial, ou seja, quando ocorre a perda parcial de hemoglobina pelas hemácias, gerando, assim, uma zona esverdeada ao redor da colônia na placa de ágar sangue.

Mais uma vez, *B.pumilus* não foi produtor da substância em questão. Este não é um resultado que foge do esperado, uma vez que esterase e biossurfactante são substâncias semelhantemente produzidas, diferentemente da atividade antagônica. Tanto produção enzimática quanto ação hemolítica são produtos biossintetizados na qual o microrganismo teve de ser submetido a condições de estresse para que pudesse produzir substâncias que viessem a prolongar sua sobrevivência. Desse

modo, pode-se dizer que o teste de atividade hemolítica, acaba por avaliar indiretamente a produção de biossurfactantes pelas bactérias, o que não significa que estas substâncias terão atividade antimicrobiana na mesma intensidade da encontrada na hemólise, o que está de acordo com a publicação de Monteiro (2002).

Os testes de atividade antagônica, expostos na Tabela 5 e Figuras 15 e 16, mostraram inibição do crescimento de cinco microrganismos patogênicos e multi-droga resistentes. Dentre os nove microrganismos, quatro se mostraram antagonistas, a saber: *B.subtilis* LFBM 02, *Lysinibacillus sphaericus* CCGB 664, *B. sphaericus* 2362 e *B.coagulans*.

*B.coagulans* mostrou uma maior atividade antagônica inibindo cocos Gram-positivos e Bacilos Gram-negativos, sendo a única espécie capaz de inibir o crescimento dos cinco microrganismos. Contudo, a maior atividade antagônica foi observada pelo *B. sphaericus* 2362 sobre *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705.

*Acinetobacter baumannii* ATCC 33591; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 entraram, em 2017, na lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Sendo assim, os resultados aqui encontrados são animadores.

Comparando-se os resultados obtidos nos três testes, não necessariamente se observa uma correlação entre seus resultados. Trabalhos anteriores demonstram existir relação entre a produção de lipopeptídeos e inibição dos crescimentos de bactérias patogênicas (Fernandes, 2007), contudo, isto não foi observado.

*B.coagulans*, espécie de maior efetividade contra microrganismos multi-droga resistente, foi a única cepa a realizar hemólise parcial.

*B.pumilus*, espécie alvo de muitos estudos e produção de enzimas e atividades biocidas, não se mostrou ativa no nosso estudo.

O presente trabalho não teve a intenção de identificar quais bacteriocinas estão sendo produzidas, nem quais são as esterases aqui produzidas. Nosso objetivo foi selecionar microrganismos produtores de esterase e de substâncias biocidas, de forma que mais trabalhos possam ser realizados no futuro a partir dos dados aqui obtidos.

## 7. CONCLUSÃO

Dos nove isolados de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*, oito foram capazes de produzir esterase: *Bacillus thuringiensis sub Israelensis*; *Bacillus subtilis LFBM 01*; *Bacillus subtilis LFBM 02*; *Lysinibacillus sphaericus CCGB 664*; *Lysinibacillus sphaericus CCGB148*; *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus sphaericus 2362 sorotipo H5a5b*; *Bacillus coagulans LFBM 01*.

Dos nove isolados de *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus*, quatro apresentaram atividade hemolítica completa: *Bacillus thuringiensis sub Israelensis*, *Lysinibacillus sphaericus CCGB 664*, *Bacillus subtilis LFBM 01* e *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus coagulans LFBM 01* foi a única espécie a apresentar hemólise parcial.

Quatro espécies de *Bacillus sp.* (*B.subtilis LFBM 02*; *B. sphaericus 2362* e *B.coagulans*) e *Lysinibacillus sphaericus (Lysinibacillus sphaericus CCGB 664)* foram capazes de apresentar atividade antagônica contra microrganismos patogênicos e multi-droga resistentes.

*B.coagulans* foi a única espécie a apresentar atividade antagônica frente a todos os microrganismos patogênicos.

*Bacillus pumillus CCGB 0203* foi a única cepa a não apresentar nenhuma atividade nas três avaliações realizadas.

Não foi observado correlação entre os resultados dos testes de hemólise e atividade antimicrobiana.

Esses resultados podem servir de base para futuros estudos que visem otimizar tempo e recursos na produção de enzimas e biossurfactantes. Além de contribuir na pesquisa por novas substâncias biocidas contra bactérias multiresistentes.

## REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, Hikmate et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 1, p. 201-232, 2011.

AQUINO, Pedro Luiz Mota. Produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus velezensis* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Dissertação de Mestrado**. 2011.

ALANIS, Alfonso J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. **Archives of medical research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.

ALLISON, Gwen E.; KLAENHAMMER, Todd R. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 3, p. 207-226, 1998.

ALMEIDA, Grazieny Aparecida Mendes de et al. Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus sp.* e *Bacillus sp.* a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 25, p. e-12849, 2020.

AND, H. Chen; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

ANGELO, Elisângela Andrade; VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade; CASTRO-GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ARAÚJO, Rafaela Oliveira. Produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petróleo. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ARAÚJO, Thiago Fellipe de et al. Investigação dos lipopeptídeos produzidos no sobrenadante dos cultivos de *Paenibacillus elgii* AC13 em meios complexos. 2020.

Atividade Enzimática. UFRGS. Disponível em:  
<[https://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/ingredientes/ing\\_enzimas\\_atividade.htm](https://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/ingredientes/ing_enzimas_atividade.htm)>.

Acesso: 10 de ago de 2023.

Ativos Biocidas Desinfetantes e Conservantes. **POLYORGANIC**. Disponível em:  
<<https://polyorganic.com.br/ativos-biocidas-desinfetantes-e-conservantes/>>. Acesso em: 16 de ago de 2023.

BAUER, Tabea L.; BUCHHOLZ, Patrick CF; PLEISS, Jürgen. The modular structure of  $\alpha/\beta$ -hydrolases. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 5, p. 1035-1053, 2020.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409-414, 2007.

BARON, Samuel. **Medical microbiology**. 4th. 1996.

BENEDETTO TIZ, Davide; KIKELJ, Danijel; ZIDAR, Nace. Overcoming problems of poor drug penetration into bacteria: challenges and strategies for medicinal chemists. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 6, p. 497-507, 2018.

BHARDWAJ, Kamal Kumar et al. Influence of culture conditions on the production of extracellular esterase from *Bacillus licheniformis* and its characterization. **Journal of oleo science**, v. 69, n. 5, p. 467-477, 2020.

BIZANI, Delmar et al. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 125-131, 2005.

Biocidas Naturais. Universidade Federal Fluminense. 2023. Disponível em:  
<<https://www.uff.br/?q=tags/biocidas-naturais>>. Acesso em: 06 de ago de 2023.

BORNSCHEUER, Uwe T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BORRISS, Rainer. *Bacillus*. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 107-132.

BROOME, M. C.; POWELL, I. B.; LIMSOWTIN, G. K. Y. Cheese: starter cultures: specific properties. **Encyclopedia of Dairy Science**, v. 2, p. 559-566, 2011.

BUENO, Silvia Messias. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. **Tese de doutorado**. 2008.

CAMEOTRA, Swaranjit Singh; MAKKAR, Randhir S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

CARRILLO, P. G. et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 82-84, 1996.

CARVALHO, A. L. V. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Produção de lipopeptídeos e esporos. Recife, Brasil, 50p. **MSc. Dissertação. Pós Biotec. UFPE**, 2005.

CASCALES, Eric et al. Colicin biology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 1, p. 158-229, 2007.

CASTILLA, Agustín et al. A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). **Enzyme and microbial technology**, v. 98, p. 86-95, 2017.

CHANDRA, Prem et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-42, 2020.

CHERIF, A. J. A. A. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 990-1000, 2003.

CHOI, Y.-J.; LEE, B. Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, p. 59-63, 2001.

CHOI, Yun-Ho et al. Purification and characterization of a new inducible thermostable extracellular lipolytic enzyme from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 11-19, 2016.

CLAS, Sophie-Dorothee; SANCHEZ, Rosa I.; NOFSINGER, Rebecca. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, p. 79-87, 2014.

CLEVELAND, Jennifer et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COKMUS, Cuhmur; YOUSTEN, Allan A. Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, n. 3, p. 323-325, 1993.

DAIHA, Karina de Godoy et al. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131624, 2015.

DA COSTA SILVA, Maria Eduarda; RODRIGUES, Renata Bazante; ULIAN, Andressa Alarice. Revisão das Propriedades Metabólicas do *Bacillus subtilis* e suas aplicações biotecnológicas favoráveis à biocenose. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 01-01, 2021.

DEGRASSI, Giuliano et al. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 2, p. 789-792, 1998.

DWORKIN, Jonathan; LOSICK, Richard. Developmental commitment in a bacterium. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 401-409, 2005.

FAMIGLIETTI, Michela et al. Enzyme assisted food processing. Editor(s): Pasquale Ferranti, **Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach**, Elsevier, p.110-128. 2023.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAM1005 a partir do suco de caju. **Dissertação de mestrado**. 2012.

FERREIRA, Vânia Ribeiro. Compostos tensoativos. InfoEscola. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/quimica/compostos-tensoativos/>>. Acesso em: 12 de ago de 2023.

FERNANDES, Paulo André Vicente. **Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2006

FERNANDES, Paulo André Vicente et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 299-310, 2008.

GHOSH, Koushik; RAY, Arun K.; RINGØ, Einar. Applications of plant ingredients for tropical and subtropical freshwater finfish: possibilities and challenges. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 793-815, 2019.

GOPALAN, N.; NAMPOOTHIRI, K. M. Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: economic considerations, commercialization potential, and

future prospects. In: **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production**. Academic Press, 2016. p. 313-330.

GUERRAND, David. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **OCL Oilseeds and fats crops and lipids**, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.

HAMADA, Yoshio. Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 8, p. 1627-1632, 2017.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Microorganisms associated with milk. Editor(s): John W. Fuquay, **Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)**, Academic Press, p. 447-457, 2011

HENKE, E.; BORNSCHEUER, U. Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, p. 320-326, 2002.

HENRIQUE PORTELLA CORRÊA DE OLIVEIRA, Fábio. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: crescimento e produção de litopeptídeos em cultivos descontínuos**. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

HERRMANN, Jennifer; RYBNIKER, Jan; MÜLLER, Rolf. Novel and revisited approaches in antituberculosis drug discovery. **Current opinion in biotechnology**, v. 48, p. 94-101, 2017.

HETRICK, Kenton J.; RAINES, Ronald T. Assessing and utilizing esterase specificity in antimicrobial prodrug development. In: **Methods in enzymology**. p. 199-220. Academic Press, 2022.

HIGERD, Thomas B.; SPIZIZEN, John. Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 114, n. 3, p. 1184-1192, 1973.

HOAGLAND, Daniel T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Advanced drug delivery reviews**, v. 102, p. 55-72, 2016.

HONG, Huynh A.; DUC, Le Hong; CUTTING, Simon M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.

ICHIMATSU, Tokio et al. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. **Current Microbiology**, v. 40, p. 217-220, 2000.

JACKSON, Michael A.; LABEDA, David P.; BECKER, Lynne A. Enantioselective hydrolysis of ethyl 2-hydroxyalkanoates by an extracellular esterase from a *Bacillus sphaericus* strain. **Enzyme and microbial technology**, v. 17, n. 2, p. 175-179, 1995.

KUMAR, Davender et al. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp. strain DVL2* and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1763-1770, 2012.

LAI, Oi Ming et al. Lipase/esterase: Properties and industrial applications. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. Elsevier, 2019. p. 158-167.

LARSEN, Erik M.; JOHNSON, R. Jeremy. Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance. **Drug development research**, v. 80, n. 1, p. 33-47, 2019.

LEITE, Ana Elisa Tognoli. **Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e suas possíveis aplicações biotecnológicas**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LEITE, Giuseppe GF et al. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 262-270, 2016.

LEITE, Juliana Abigail. *Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta. 2012. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

LEITE, Oldair Donozeti; BRAGA, Valdeison Souza. Esterificação e transesterificação - Conheça as características dessas reações. **UOL**. Disponível em: <<https://educacao.uol.com.br/disciplinas/quimica/esterificacao-e-transesterificacao-conheca-as-caracteristicas-dessas-reacoes.htm>> Acesso em: 15 de ago. de 2023.

LIAW, Ren-Bao et al. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8323-8329, 2010.

LIU, S.-Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 11, p. 923-945, 2004.

LORD, Caleb C.; THOMAS, Gwynneth; BROWN, J. Mark. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 4, p. 792-802, 2013.

MAUGHAN, Heather; VAN DER AUWERA, Geraldine. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 789-797, 2011.

MEGHJI, K.; WARD, O. P.; ARAUJO, A. Production, purification, and properties of extracellular carboxyl esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3735-3740, 1990.

MENDONÇA, Analucia Longman et al. Seleção de *Bacillus spp.* para produção de esterases e melhoramento de *Bacillus cereus* (c124). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 103-114, 1998.

MENESES, Dayana Pinto de. Produção de esterases por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 utilizando glicerol residual. 2020.

MONTEIRO, Leila. Produção de Substâncias biotivas de *Bacillus spp.* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 2002. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORI, Giorgia et al. New prodrugs against tuberculosis. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 3, p. 519-525, 2017.

MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 351-358, 1998.

MOTTA, Amanda S.; CLADERA-OLIVERA, Florencia; BRANDELLI, Adriano. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 307-310, 2004.

NAGARGOJE, Shital D. et al. Enzymes in mastitis milk. In: **Enzymes Beyond Traditional Applications in Dairy Science and Technology**. Academic Press, 2023. p. 37-56.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

O SOL NASCERÁ (A Sorrir). Intérprete: Cartola. Compositores: Cartola & Elton Medeiros. Rio de Janeiro: EMI Records Brasil Ltda/Universal Music Internacional Ltda, 1974. 1 CD, faixa 6.

OESCH-BARTLOMOWICZ, B.; OESCH, F. Mechanisms of toxification and detoxification which challenge drug candidates and drugs. p.193-214. 2007.

OGAKI, Mayara Baptistucci; FURLANETO, Márcia Cristina; MAIA, Luciana Furlaneto. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, p. 267-276, 2015.

OLLIS, David L. et al. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

OLIVEIRA, Darlane Wellen Freitas de. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. **Dissertação de mestrado**. 2010.

OLIVEIRA, Talita Lacerda de. Produção de bacteriocinas em *Bacillus thuringiensis*. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)** – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2019.

OREM, Juliana Capella de. Diversidades funcional e filogenética de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo. **Dissertação**. 2019.

OSCÁRIZ, Juan Carlos; LASA, Iñigo; PISABARRO, Antonio G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 337-341, 1999.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B. S. Production and applications of esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.

PEREZ, Karla Joseane. Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus spp.* isolados de puba. **Tese de Doutorado**. 2014.

PINHEIRO, A. D. T.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra da casca de coco verde. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. 2005.

RA, SLEPECKY. The genus *Bacillus*-nonmedical. **The prokaryotes**, v. 2, p. 1663-1696, 1992.

RAO, Lang et al. A novel alkaliphilic *Bacillus* esterase belongs to the 13th bacterial lipolytic enzyme family. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60645, 2013.

RASI, Guilherme Corrêa. Estudo de atividade de peptídeos tipo bacteriocina de *Bacillus thuringiensis*. 2011.

RAY, Arun Kumar; GHOSH, Koushik; RINGØ, E. J. A. N. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465-492, 2012.

ROCHA, Patrícia Maria. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. 2017. **Dissertação de Mestrado**. Brasil.

SAMINATHAN, M.; MUTHUKUMARESAN, K. Thirumalai; GAUTAM, Pennathur. WITHDRAWN: A strain of *Lysinibacillus sphaericus* secretes an organic solvent-stable esterase. 2009.

SAYALI, Kulkarni; SADICHHA, Patil; SUREKHA, Satpute. Microbial esterases: an overview. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 2, n. 7, p. 135-146, 2013.

SETTANNI, Luca; CORSETTI, Aldo. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International journal of food microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.

SHABBIR, Anam et al. Biochemical activation and functions of drug-metabolizing enzymes. In: **Biochemistry of Drug Metabolizing Enzymes**. Academic Press, 2022. p. 1-27.

SHAVANDI, Mahmoud et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus sp.* strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477-482, 2011.

SHLEEVA, Margarita O.; KONDRATIEVA, Daria A.; KAPRELYANTS, Arseny S. *Bacillus licheniformis*: A Producer of Antimicrobial Substances, including Antimycobacterials, Which Are Feasible for Medical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1893, 2023.

SILVA, Andreza Santos et al. Aplicação de biossurfactantes: avaliação de meios de cultivo a base de amido. **Anais do VIII SIMPROD**, 2016.

SILVA, Jéssica Caroline de Araújo. Importância das enzimas produzidas por microrganismos para a obtenção de bioetanol. Microbiologia UFRJ. Disponível em: <<https://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/317-importancia-das-enzimas-produzidas-por-microrganismos-para-a-obtencao-de-bioetanol>> Acesso: 15 de ago de 2023.

SILVER, Lynn L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

SINGH, Rajendra et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-15, 2016.

SINGH, Vinayak; MIZRAHI, Valerie. Identification and validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 3, p. 503-509, 2017.

SOLTANI, Mehdi et al. Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 27, n. 3, p. 331-379, 2019.

STEIN, Torsten. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

SU, Lingqia et al. Short-chain aliphatic ester synthesis using *Thermobifida fusca* cutinase. **Food Chemistry**, v. 206, p. 131-136, 2016.

TAGG, John R.; DAJANI, Adnan S.; WANNAMAKER, Lewis W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TALARO, Kathleen P. et al. **Foundations in microbiology**. 10th. Wm. C. Brown, 1996.

TANAKA DOS SANTOS, Lucas Makoto. Esterificação. **Todo Estudo**. Disponível em: <https://www.todoestudo.com.br/quimica/esterificacao>. Acesso em: 08 de August de 2023.

TEJERA-HERNÁNDEZ, Berto; ROJAS-BADÍA, Marcia M.; HEYDRICH-PÉREZ, Mayra. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131-138, 2011.

TESTA, Bernard. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. **Current opinion in chemical biology**, v. 13, n. 3, p. 338-344, 2009.

THAVASI, R.; SHARMA, Shilpy; JAYALAKSHMI, Singaram. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **J Pet Environ Biotechnol S**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2011.

TRIGGLE, David J.; TAYLOR, John B. (Ed.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Elsevier, 2006.

YAQOOB, Azka et al. Role of drug-metabolizing enzymes in biotransformation of drugs. In: **Biochemistry of Drug Metabolizing Enzymes**. Academic Press, 2022. p. 73-108.

VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018.

WU, Yuan-Seng et al. Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 761, 2017.

YANG, Guiqin et al. *Bacillus composti* sp. nov. and *Bacillus thermophilus* sp. nov., two thermophilic, Fe (III)-reducing bacteria isolated from compost. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt\_8, p. 3030-3036, 2013.

YOUSSEF, Noha H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of microbiological methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZARAFETA, Dimitra et al. EstDZ3: A new esterolytic enzyme exhibiting remarkable thermostability. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1779, 2016.