



## **Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico**

Januário Gama dos Santos<sup>1</sup>, Raimundo Felipe Cruz Filho<sup>2\*</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>3</sup>

*Submetido 18/11/2015 – Aceito 02/04/2016 – Publicado on-line 25/04/2015*

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi isolar micro-organismo de amostras de solo amazônico contaminado com petróleo para selecionar espécies produtoras de proteases com potencial fibrinolítico. Para o isolamento e seleção das bactérias, um grama de solo foi transferido para água peptonada 1% (p/v), em tubo de ensaio. Essas diluições foram submetidas a choque térmico a 80 °C por 12 minutos, seguido de banho de gelo por 5 minutos. Do sobrenadante foi retirado 100 µL e semeado na superfície de ágar gelatina leite. Os cultivos foram mantidos a 37 °C por 24 horas. Das 30 colônias isoladas foi identificado *Bacillus subtilis* (21%), *B. circulans* (13%), *B. licheniformis* (10%), *B. stearothermophilus* (10%), *B. thurigiensis* (8%), *B. coagulans* (7%) e *Bacillus* sp. (31 %). *Bacillus* spp B28 expressou a máxima atividade de protease (7,073U/mL), demonstrando atividade ótima a 45 °C e pH 8,4. E a atividade fibrinolítica foi determinada em *Bacillus* spp. B16.

**Palavras-Chave:** Solo Amazônico, *Bacillus*, Proteases fibrinolíticas

**Production and characterization of proteases from bacilli of the Amazon region with fibrinolytic potential.** The aim of this study was to isolate bacteria producing protease with fibrinolytic activity from soil samples from Amazon region contaminated with petroleum. For the isolation and selection of bacteria, one gram of soil was transferred to peptone water (1% w/v) in a test tube, subjected to heat shock at 80 °C for 12 minutes and then ice bath for 5 minutes. The supernatant was seeded on gelatin milk agar and plates were maintained at 37 °C for 24 hours. Out of the 30 isolated colonies were identified *Bacillus subtilis* (21%), *B. circulans* (13%), *B. licheniformis* (10%), *B. stearothermophilus* (10%), *B. thurigiensis* (8%), *B. coagulans* (7%) e *Bacillus* sp. (31 %). The maximum protease activity (7.073 U/mL) was determined in *Bacillus* spp B28 with optimal activity at 45 °C and pH 8.4. Among the isolated *Bacillus*, *Bacillus* spp. B16 showed fibrinolytic protease activity.

**Key-words:** Amazon Soil, *Bacillus*, fibrinolytic proteases

<sup>1</sup> <sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus-Amazonas-Brasil

<sup>2</sup> <sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus-Amazonas-Brasil, Autor correspondência: rfilho@ufam.edu.br

<sup>3</sup> <sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus-Amazonas-Brasil

## 1. Introdução

As proteases de origem microbiana, entre as enzimas hidrolíticas são produzidas por diferentes micro-organismo e têm sido bastante relatada na literatura, especialmente por fermentação submersa. A grande diversidade de proteases tem despertado a atenção mundial, essencialmente devido ao reconhecimento do importante papel que elas desempenham nos processos metabólicos celulares, mas também pelo valor e aplicação biotecnológica (GUPTA, 2002; LORENZ et al., 2002; IBRAHIM et al., 2007; LADEIRA et al., 2012).

Nos processos industriais, as proteases têm aplicação na indústria alimentícia humana e animal, na síntese de peptídeos, no processamento de couro, em gestão de resíduos, indústria fotográfica e detergente. Na indústria farmacêutica são utilizadas como princípio ativo de diferentes tipos de medicamento (SHARMIN; RAHMAN, 2007; LADEIRA et al., 2012)

Entre os micro-organismo produtores de proteases, *Bacillus* spp. são reconhecidos como importantes fontes de proteases alcalinas devido o potencial de secretar grande quantidade de enzimas com alta atividade (KUMAR; TAKAGI, 1999; CHAUD et al., 2007).

Além disso, *Bacillus* spp. são reconhecidos como seguros para os seres humanos, inclusive, uma protease alcalina com atividade fibrinolítica está sido utilizado como um agente trombolítico (KUMAR; TAKAGI, 1999<sup>a</sup>; MUKHERJEE; RAI, 2011).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar bactérias esporuladas de amostras de solo da Amazônia, para selecionar isolados com potencial proteolítico.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Isolamento de bactérias proteolíticas de amostras de solo

Para o isolamento e seleção das bactérias proteolíticas com potencial fibrinolítico foram analisadas 30 amostras de solo contaminado com petróleo. Um grama de cada amostra de solo, em tubo de ensaio de 16,5 mm x 150 mm, contendo água peptona 1 % (p/v) foi submetido a choque térmico, a 80 °C por 12 minutos e em banho de gelo por 5 minutos (SARAIVA et al., 2007). Posterior a agitação em vortex, 100 µL do sobrenadante foi semeado na superfície de ágar gelatina-leite, em placas de Petri (100 x15 mm). Com alça de Drigalsky, o inóculo foi espalhado por toda a

superfície do meio até a total absorção. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas (PATEL et al., 2006). Após a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi verificado a formação de halo hialino ao redor dos isolados proteolíticos. Em seguida, essas colônias foram transferidas para ágar nutritivo para classificação e identificação. A determinação da atividade enzimática (Pz) foi realizada segundo Siqueira (2008): a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quando valor de Pz = 1,0 (ausência de atividade); Pz<1,0 (atividade proteolítica positiva).

A identificação as bactérias foram realizadas com base nas características morfológicas e bioquímicas (BARROW; FELTHAM, 1999).

### 2.2. Produção de proteases em meio líquido

Todas as bactérias protease-positivas (30 isolados) foram cultivadas em caldo nutritivo, a 37 °C por 24 horas. Desses cultivos foi retirado 1000 µL para inoculação em frasco de Erlenmeyer contendo 40 mL de Solução de Manachini com gelatinas 1 %, pH 7,0 (FERNANDES, 2002). A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 120 rpm, a 37 °C por 24 horas. O sobrenadante foi separado da biomassa por filtração sob vácuo para análise enzimática.

### 2.3. Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica utilizou-se 150 µL do extrato bruto e como substrato 250 µL azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0. A reação foi mantida em câmara escura e após 60 minutos, adicionou-se 1,2 mL de Ácido Tricloroacético 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4 °C por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 1,2 mL para ser adicionado a 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 1 em 60 minutos e expressa em U/mL (LEIGTON, 1973).

### 2.4. Determinação da atividade fibrinolítica em meio sólido

Os cinco isolados bacterianos que expressaram maior atividade proteolítica quantitativa foram submetidos à determinação da atividade fibrinolítica (KO et. al., 2004). A placa de fibrina

foi formulada com solução de fibrinogênio [50 mg/mL em solução tampão Tris HCl 20 mM pH 8,0], homogeneizado com 40 ml de ágar a 75 % (p/v) em solução tampão Tris HCl 20 mM pH 8,0 e Cloreto de sódio 0,15 M. Desta solução foram retirados 8 mL para cada placa de Petri para homogeneização com 40 µL de solução de trombina [100 NIH/ml de trombina (Sigma)] dissolvida em solução tampão Tris HCl 20 mM pH 8,0. As placas foram incubadas por 30 minutos, a 25 °C para formação de coágulos de fibrina. No meio sólido, em cada cup-plate, medindo 3 mm de diâmetro foram adicionados 10 µL do extrato bruto. Como padrão foi utilizado tampão Tris HCl 20 mM. A atividade fibrinolítica foi determinada em milímetros, a 37 °C/15 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.5. Efeito do pH na atividade proteolítica e estabilidade

O efeito do pH sobre a atividade da protease foi determinado na faixa de pH 4,0 a 12,0. Para o preparo do substrato [azocaseína 1 % (p/v)] foi utilizado solução tampão citrato 0,2 M (pH de 4,0 a 6,0); solução tampão fosfato 0,2 M (pH de 7,0 a 8,0) e solução tampão Tris HCl 0,2 M (7,2 a 9,0). A estabilidade ao pH foi avaliada durante 90 minutos, medindo a atividade enzimática relativa a cada 15 minutos para cada faixa de pH (4,0-12,0), a 45 °C (CAVALCANTI et al., 2004).

## 2.6. Efeito da temperatura na atividade proteolítica e estabilidade

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram realizados em triplicata e incubados nas temperaturas de 25 °C a 80 °C por 60 minutos. A estabilidade das enzimas foi determinada durante 90 minutos medindo a atividade enzimática relativa a cada 15 minutos na faixa de 25 °C - 80 °C (CAVALCANTI et al., 2004).

## 2.7. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e o Teste de Tukey com nível de significância 5 %, utilizando-se o software Minitab versão 16.0.

## 3. Resultados e Discussão

### 4.1 Seleção de bactérias produtoras de proteases

Das amostras de solo foram isoladas 30 bactérias, todas do gênero *Bacillus* spp. Entre as espécies identificadas, *Bacillus subtilis* (21%) e *B. circulans* (13%) foram os de maior ocorrência e, em menor frequência *B. licheniformis* (10%), *B. thurigiensis* (8%) e *B. coagulans* (7%), além de sete isolados *Bacillus* sp. (21 %) (Figura 1). Todas as espécies de *Bacillus* isoladas neste estudo são citadas como fontes de proteases para detergentes, fármacos, aditivos alimentícios ou como medicamento (JASWAL; KOCHER, 2008; KUMAR; TAKAGI, 1999; NASCIMENTO; MARTINS, 2006; PATEL et al., 2006). Estas espécies também foram isoladas por Santos et al. (2007) de 63 amostras de solo da Amazônia, pela técnica de diluição sucessiva, em ágar gelatina-leite, pH 5,0 e pH 11,0.

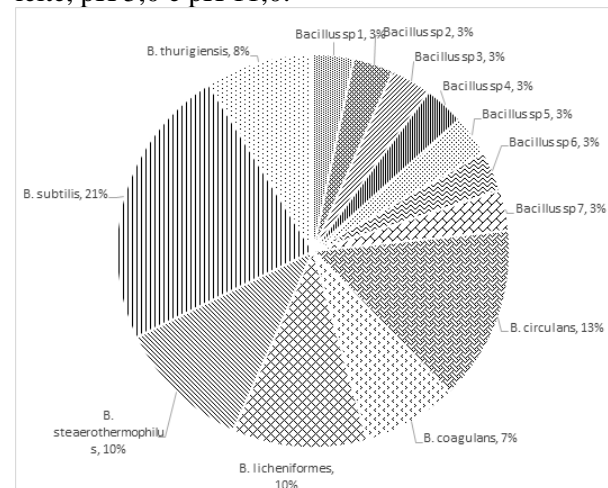


Figura 1. Porcentagem de *Bacillus* isolados de amostra de solo contaminado com petróleo.

Contudo, a função dessas enzimas ainda não está bem conhecida, mas a produção delas está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação. Uma vez que a síntese de proteases está intimamente ligada ao processo de esporulação, fatores que afetam esse processo como, condições de estresse, seja pela redução da concentração de nutrientes, tensão de oxigênio ou composição do meio, podem também influenciar a produção dessas enzimas (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

A Tabela 1 mostra que a atividade proteolítica no meio sólido foi observada na totalidade dos isolados de *Bacillus*, cuja atividade (Pz) apresentou variação de 0,015 a 1,3. Considerando os valores de Pz, a atividade proteolítica citada na tabela 1 foi classificada em: forte (valores de Pz entre 0,01 a 0,09); atividade fraca (Pz entre 0,1 a 0,9) e ausência de atividade (Pz=1,0). Com base nessa

classificação, 46,7% dos isolados bacterianos apresentaram atividade proteolítica alta. Nos

demais (50%), a atividade foi baixa ou ausente (3,33%).

Tabela 1. Atividade proteolítica qualitativa de 30 isolados de *Bacillus* sp isolados de solo Amazônico.

Isolado	Halo Ø (mm)	Valor do (Pz)	Isolado	Halo Ø(mm)	Valor do (Pz)	Isolado	Halo Ø (mm)	Valor do (Pz)
1	1,6	0,025	11	1,3	0,07	21	1,4	0,12
2	1,5	0,06	12	1,7	0,15	22	1,6	0,11
3	1,3	1,30	13	1,5	0,11	23	2,0	0,09
4	1,4	0,06	14	1,5	0,16	24	1,5	0,11
5	1,4	0,03	15	1,3	0,07	25	1,3	0,07
6	1,9	0,03	16	1,5	0,11	26	1,9	0,09
7	1,6	0,02	17	1,8	0,18	27	0,7	0,22
8	2,0	0,02	18	2,0	0,09	28	2,0	0,25
9	1,7	0,23	19	1,9	0,17	29	1,6	0,20
10	2,0	0,02	20	1,5	0,11	30	1,6	0,38

Ø = diâmetro do halo; Pz ≥ 1,0 (ausência de atividade), Pz entre 0,1 a 0,9 (atividade proteolítica fraca), Pz entre 0,01 a 0,09 (atividade proteolítica forte).

Na Tabela 2 está citada atividade proteolítica determinada no extrato bruto dos 30 *Bacillus* spp. Os maiores valores de atividade foram observados nos isolados, B28 (7,073 U/mL), B16 (5,766), B25 (5,183 U/mL), B5 (4,886 U/mL), B11 (4,133), apenas no extrato bruto do isolado B4 não foi determinada atividade proteolítica. A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada entre todos os

valores de atividade proteolítica dos *Bacillus* spp. Entre estes isolados, o B16 (1,02 U/mL) foi o que expressou a maior atividade proteolítica. Joo e Chang (2005), no screening realizado com *Bacillus* sp., dos 312 que isolou de lama contamina e água, apenas em um isolado identificou uma expressiva zona de hidrólise de protease alcalina.

Tabela 2. Atividade proteolítica quantitativa dos 30 *Bacillus* spp. isolados de solo Amazônico.

Item	C. I.	AP(U/mL)	Item	C. I.	AP(U/mL)
1	B 1	0,016	16	B28	7,073
2	B 4	NAP	17	B29	2,553
3	B 5	4,886	18	B31	0,113
4	B 6	1,153	19	B37	2,736
5	B 8	0,013	20	B43	1,740
6	B 9	0,553	21	B55	2,563
7	B10	0,393	22	B56	1,230
8	B11	4,133	23	B57	0,933
9	B12	2,580	24	B59	2,106
10	B14	0,486	25	B61	1,366
11	B15	1,280	26	B62	0,103
12	B19	1,356	27	B67	0,200
13	B22	1,500	28	B68	0,713
14	B16	5,766	29	B71	1,973
15	B25	5,183	30	B72	0,870

C.I. (Código do Isolado); AP (Atividade Protease).

#### 4.2 Atividade fibrinolítica *in vitro* (Método da Placa de Fibrina)

A atividade fibrinolítica está apresentada na Figura 2. Os resultados revelaram que entre os cinco *Bacillus* sp. investigados, somente em um deles (amostra B16) foi determinada a atividade fibrinolítica, halo igual a 34 mm. Estes dados confirmam a potencialidade de bactérias do gênero

*Bacillus* na produção de proteases fibrinolíticas, biocatalizador que tem aplicação no tratamento de patologias trombolíticas.

#### 4.3 Efeito do pH na atividade proteolítica e estabilidade

A Figura 3 demonstra que a atividade proteolítica se manteve estável (22 %, 26 % e 40



%) em solução tampão citrato 0,2 M, pH 4,6 e pH 7,0 e pH 7,8, respectivamente, durante 30 minutos. Embora que as proteases tenham sido ativa em uma ampla faixa de pH, as máxima atividade foi determinadas em pH 8,4 [100 % (0,876 U/mL)] durante 45 minutos de incubação. Esta característica indica tratar-se de uma protease alcalina. Kim et al. (1996); Kim e Choi (2000) mencionaram que serina proteases com atividade fibrinolítica geralmente são ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima em pH 8,0 e 10.



Figura 2. Atividade fibrinolítica de *Bacillus* sp. (método da placa de fibrina). Fonte: Patente INPI: PI1107318-7

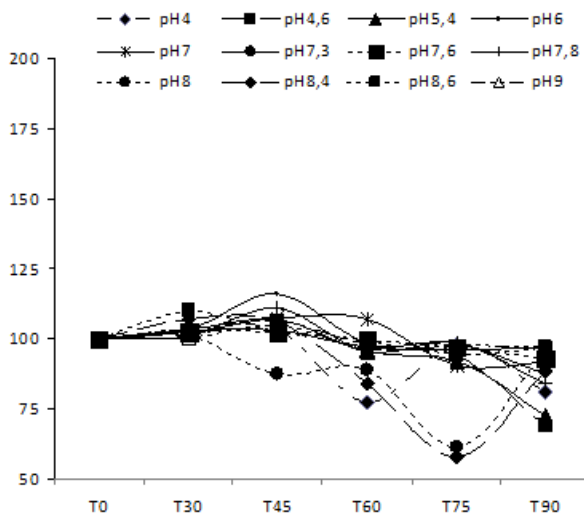


Figura 3. Efeito do pH na atividade e estabilidade de proteases secretadas por *Bacillus* sp. isolado de solo Amazônico.

#### 4.4 Efeito da temperatura na atividade proteolítica e estabilidade

A Figura 4 mostra que a atividade proteolítica foi determinada em todas as temperaturas testadas. Os maiores valores de atividade foram determinados entre 40 °C a 50 °C, exibindo ótima atividade a 45 °C. Enquanto as menores atividades

foram detectadas a partir de 55 °C até 80 °C máxima temperatura testada. A figura 4 demonstram também que as proteases apresentaram estabilidade de 75 % e 73 % durante 30 minutos de incubação de 45 °C e 50 °C, respectivamente. Estes dados são similares aos de Nascimento e Martins (2006); Peng et al. (2005); Ko et al. (2004), em trabalhos realizados com proteases de espécies de *Bacillus*.

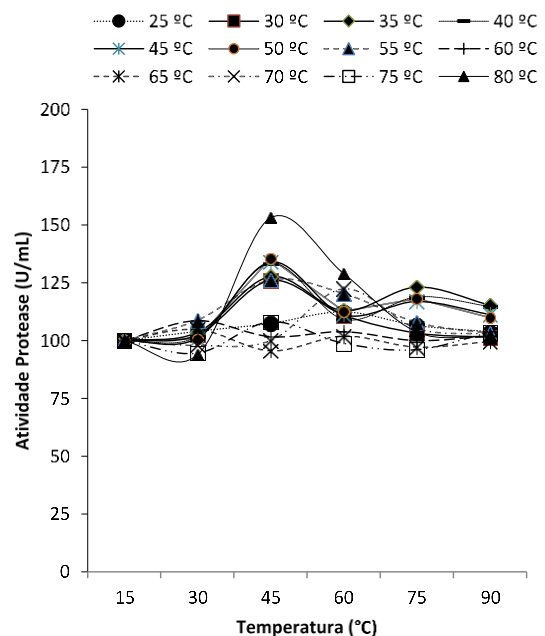
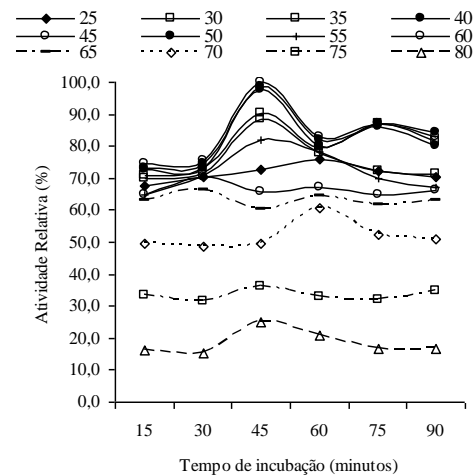


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de proteases secretadas por *Bacillus* sp. isolado de solo Amazônico.

#### 4. Conclusão

Na totalidade das amostras de solo contaminado com petróleo foram isoladas bactérias do gênero *Bacillus* sp. Entre esses isolados predominaram *Bacillus subtilis*. A totalidade



desses micro-organismo são fontes de enzimas proteolíticas. Dentre os trinta isolados de *Bacillus* sp., somente o *Bacillus* B16 secretou proteases com atividade fibrinolítica. Nos testes *in vitro* as próteses desse isolado têm as seguintes características, pH e temperatura ótimo, 8,4 e 45 °C respectivamente.

### **Agradecimentos**

A Universidade Federal do Amazonas, a CASPES e ao CNPq.

### **Divulgação**

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

### **Referências**

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

CAVALCANTI, M.T.H.; TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardopsis* sp. *Bioresour. Technol.* v. 93, n. 1, 2004, p. 29-35.

CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. *Nucleus*, v. 4. n. 1-2, 2007, p. 87-97.

FERNANDES, O. C. F. Leveduras Isoladas de Substratos Amazônicos: Fenômeno killer, produção de protease e antibióticos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2002, Universidade de São Paulo-USP.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial Alkaline Protease: Molecular approaches and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.59, n. 1, 2002, p. 15-32.

IBRAHIM, A. S. S.; EL-SHAYEB, N. M. A.; MABROUK, S. S. Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian soda lake. *Journal of Applied Sciences Research*. v. 3, n.11, 2007, p. 1363-1368

JASWAL, R. K.; KOCHER, G. S. Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility. *The Internet Journal of Microbiology*. v. 4, n.1, 2007, Disponível em: <<http://archive.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-4-number-1/partial-characterization-of-a-crude-alkaline-protease-from-bacillus-circulans-and-its-detergent-compatibility.html#sthash.yQ3avzh1.dpbs>> Acesso em 17/05/2013.

JOO, H.; CHANG, C. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. i-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v.40, 2005, p. 1263-1270.

KIM, S. H.; CHOI, N. S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci Biotechnol Biochem.* v. 64, n. 8, 2000, p. 1722-1725.

KIM, W.; CHOI, K.; KIM, Y.; PARK, H.; CHOI, J.; LEE, Y.; OH, H.; KWON, I.; LEE, S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzymes produced from *Bacillus* sp CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Applied and Environment Microbiology*. v. 62, n. 7, 1996, p. 24-82.

KO, J.H., YAN, P. J., ZHU, L., QI, Y. P., Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 137, n. 1, 2004, p. 65-74.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advanced*. v. 17, n. 4, 1999, p. 561-594.

KUMAR, C.G; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint: *Biotechnology Advances*, v.17, n. 7, 1999, p. 561-594.

LADEIRA, Silvania Alves; DELATORRE, Andréia Boechat; ANDRADE, Marcela Vicente Vieira and MARTINS, Meire Lelis Leal. Nota Científica: utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. *Braz. J. Food Technol.* [online]. 2012, vol.15, n.1, pp. 92-98. ISSN 1981-6723.

LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, v. 76, 1973, p. 103-122.



LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource space. *Current Opinion. Biotechnology*. v.13, n. 6, 2002, p. 572 – 577.

MUKHERJEE, A. K.; RAI, S. K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I. *New Biotechnology*. v. 28, n. 2, 2011, p. 182-189.

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

PATEL, R.K. DODIA, M. S.; JOSHI, R. H.; SINGH, S. P. Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from seawater in western India. *World J. Microbiol Biotechnol* v.22, n. 4, 2006, p. 375-382.

PENG, Y., YANG, X., & ZHANG, Y. (2005). Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in

vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 69, n. 2, p. 126-132.

SANTOS, J. G.; GOMES, D. S.; BRITTO, E. N.; CRUZ FILHO, R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Caracterização da atividade proteolítica de *Bacillus* sp. da Amazônia. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007, Anais XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos SINAIFERM, Curitiba. UFP.

SARAIVA, M.; PRAÇA, L.B.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. Isolamento de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Comunicado Técnico, 164) 2007.

SHARMIN, F.; RAHMAN, M. Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* strain FS-1. *Agricultural Engineering International*. v. 9, 2007, p. 1-10.

SIQUEIRA, A. B. S. Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lectinas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2007, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. As referências deverão ser escritas no tamanho 10 e fonte Tahoma.