



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA DE LIMA SILVA

**Actinobactérias nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga)  
produtoras de substâncias biossurfactantes**

**Santarém, Pará**

**Junho de 2019**

AMANDA DE LIMA SILVA

**Actinobactérias nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans  
(macacaporanga) produtoras de substâncias biossurfactantes**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de graduação em  
Biotecnologia, para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Universidade Federal do Oeste do Pará,  
Instituto de Biodiversidade e Florestas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Katrine  
Silva Escher

**Santarém, Pará**

**Junho de 2019**

AMANDA DE LIMA SILVA

**Actinobactérias nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn  
Fragans (macacaporanga) produtoras de substâncias  
biossurfactantes**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de graduação em  
Biotecnologia, para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Universidade Federal do Oeste do Pará,  
Instituto de Biodiversidade e Florestas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Katrine  
Silva Escher

Conceito:

Data de aprovação: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Orientador:

Instituição:

---

Membro I:

Instituição:

---

Membro II:

Instituição:

A Luísa, Eduarda e Isabelle. Que, no auge das suas infâncias, não fazem ideia do quanto me fizeram e fazem mais forte cada dia um pouco mais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus Orixás, às entidades que me guiam e fizeram a minha cabeça seguir firme nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelo dom da vida e por me darem sempre o melhor que puderam, sem pestanejar, fazendo todos os esforços necessários para que eu tenha uma vida maravilhosa.

À Danielle, Fernanda e Rui. Nossos sangues não são a única coisa que nos fazem irmãos, a energia que temos juntos é indescritível. Obrigada por estarem sempre comigo me apoiando em tudo.

À Altivo e Zilda Mumberger, meus sogros e segundos pais, por todo o apoio de sempre, e por abrirem as portas da sua casa para que essa jornada fosse mais tranquila.

A Gean Mumberger, meu companheiro de vida e que sempre esteve do meu lado, nunca duvidou da minha capacidade de chegar até aqui. Obrigada por todo o apoio e por todo o esforço que você fez e faz por mim. Obrigada por todos os momentos que você me sacudiu e me fez acreditar de novo.

À minha orientadora acadêmica e de vida, Katrine, por ter me acalmado quando eu achava que nada ia dar certo, seja com uma conversa simples ou com uma metodologia nova. Obrigada por abrir os meus caminhos na pesquisa e por ser a melhor orientadora que eu poderia ter.

Ao beija-flor que me acompanhou desde o começo dessa pesquisa, que chorou, riu, comeu marmitta (e no shopping), sempre do meu lado. Por tudo o que passamos nessa experiência, obrigada. Obrigada por estar comigo sempre e por me ensinar tanto sobre o mundo e a vida (eu protegi o teu nome por amor – em um codinome: “beija-flor”).

Aos meus amigos de fora, que nem sabem o que eu pesquiso e a importância disso, mas sempre acharam o máximo e me apoiaram em cada brownie ou brigadeiro vendido para ir a um congresso.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia, em especial ao técnico Jeosafá e a Sara Freitas, por todos os momentos de risadas e choros, de experimentos dando certo e errado, e por fazerem essa jornada mais leve.

A AIESEC em Santarém e todo o seu corpo de Alumni, em especial ao corpo executivo do ano de 2018, que hoje já não existe mais, mas que foi onde eu descobri a maioria das coisas que sei sobre mim mesma e sobre as pessoas.

Queira!  
Basta ser sincero  
E desejar profundo  
Você será capaz  
De sacudir o mundo  
Vai, tente outra vez!

Raul Seixas

## RESUMO

### **Actinobactérias nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga) produtoras de substâncias biossurfactantes**

Cresce a procura por fontes naturais de produtos para os mais diversos usos, como indústrias e métodos de biorremediação, visto que os bioprodutos apresentam vantagens como menor toxicidade e geração de resíduo. Dentre os microrganismos geradores de bioprodutos estão as actinobactérias, reconhecidas por produzirem uma diversidade de moléculas bioativas, como antibióticos, antitumorais, enzimas e biossurfactantes. Neste estudo foi verificado a capacidade de cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans, em produzir substâncias biossurfactantes, avaliando sua ação emulsificante em substratos lipídicos e fósseis. As cepas bacterianas foram isoladas e identificadas através de dados morfológicos, bioquímicos e moleculares. Posteriormente, foi realizado a seleção das cepas produtoras das enzimas lipase, esterase e hemolisina, sendo selecionadas as cepas com maiores índices enzimáticos para os testes de produção de biossurfactante em meio líquido. As 11 cepas isoladas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp., e os valores de índice de emulsificação encontrados são promissores quando comparadas a estudos com o gênero *Bacillus*. A maior ação emulsificante foi registrada para o líquido do cultivo bacteriano das cepas *Streptomyces* sp. MPO2 e *Streptomyces* sp. MPO11, indicando que a ação biossurfactante seja resultante de moléculas associadas à biomassa bacteriana.

**Palavras-chave:** *Streptomyces* sp., emulsão, óleos vegetais, biossurfactante.

## ABSTRACT

### **Native actinobacteria from rhizosphere of *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga) producing biosurfactants**

There is a growing demand for natural sources of products for the most diverse uses, such as industries and bioremediation methods, since bioproducts have advantages such as less toxicity and waste generation. Among the bioproducing microorganisms are actinobacteria, recognized for producing a variety of bioactive molecules, such as antibiotics, antitumorals, enzymes and biosurfactants. In this study, the ability of strains of actinobacteria isolated from the rhizosphere of *Aniba parviflora* Syn *Fragans* to produce biosurfactant substances was evaluated, evaluating their emulsifying action on lipid and fossil substrates. The bacterial strains were isolated and identified through morphological, biochemical and molecular data. Subsequently, the selection of the strains producing the lipase, esterase and hemolysin enzymes was carried out, and the strains with the highest enzymatic indexes were selected for the tests of biosurfactant production in liquid medium. The 11 strains isolated were identified as belonging to the genus *Streptomyces* sp., And the values of emulsification index found are promising when compared to studies with the genus *Bacillus*. The highest emulsifying action was recorded for the bacterial culture liquid of *Streptomyces* sp. MPO2 and *Streptomyces* sp. MPO11, indicating that the biosurfactant action is the result of molecules associated with bacterial biomass.

**Keywords:** *Streptomyces* sp., emulsion, vegetable oils, biosurfactant.

## SUMÁRIO

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Resumo.....             | 7  |
| Abstract.....           | 8  |
| Introdução.....         | 10 |
| Material e métodos..... | 11 |
| Resultados.....         | 12 |
| Discussão.....          | 15 |
| Conclusão.....          | 16 |
| Referências.....        | 16 |
| Anexo.....              | 19 |

1 Artigo

## 2 **Actinobactérias nativas da rizosfera de *Aniba*** 3 ***parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga) produtoras** 4 **de substâncias biossurfactantes**

5 Amanda de Lima Silva<sup>1,\*</sup>

6 <sup>1</sup> Universidade Federal do Oeste do Pará; aamanda.limas@hotmail.com

7 \* Correspondência: aamanda.limas@hotmail.com; Tel.: +55 93 991866094

8 **Resumo:** Cresce a procura por fontes naturais de produtos para os mais diversos usos, como  
9 indústrias e métodos de biorremediação, visto que os bioprodutos apresentam vantagens como  
10 menor toxicidade e geração de resíduo. Dentre os microrganismos geradores de bioprodutos estão  
11 as actinobactérias, reconhecidas por produzirem uma diversidade de moléculas bioativas, como  
12 antibióticos, antitumorais, enzimas e biossurfactantes. Neste estudo foi verificado a capacidade de  
13 cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans*, em produzir  
14 substâncias biossurfactantes, avaliando sua ação emulsificante em substratos lipídicos e fósseis. As  
15 cepas bacterianas foram isoladas e identificadas através de dados morfológicos, bioquímicos e  
16 moleculares. Posteriormente, foi realizado a seleção das cepas produtoras das enzimas lipase,  
17 esterase e hemolisina, sendo selecionadas as cepas com maiores índices enzimáticos para os testes  
18 de produção de biossurfactante em meio líquido. As 11 cepas isoladas foram identificadas como  
19 pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp., e os valores de índice de emulsificação encontrados são  
20 promissores quando comparadas a estudos com o gênero *Bacillus*. A maior ação emulsificante foi  
21 registrada para o líquido do cultivo bacteriano das cepas *Streptomyces* sp. MPO2 e *Streptomyces* sp.  
22 MPO11, indicando que a ação biossurfactante seja resultante de moléculas associadas à biomassa  
23 bacteriana.

24 **Palavras-chave:** *Streptomyces* sp., emulsão, óleos vegetais, biossurfactante.

---

### 26 1. Introdução

27 A Amazônia constitui-se de um enorme conjunto de ecossistemas de diferentes dimensões e  
28 complexidades nas interações ambientais. Dessa forma, torna-se uma grande contribuinte para a  
29 regulação da dinâmica ambiental global [1]. A região amazônica é apontada como detentora de uma  
30 importante biodiversidade, o que desperta o interesse da indústria farmacêutica na prospecção de  
31 substâncias bioativas aplicáveis em processos industriais nos mais diversos setores produtivos [2].

32 A obtenção de bioprodutos de microrganismos potencialmente exploráveis tem possibilitado o  
33 desenvolvimento de tecnologias de grande aplicação em diversos ramos da indústria, como por  
34 exemplo, a produção de compostos químicos como álcool, ácido acético, biogás; bioinseticidas,  
35 inoculantes agrícolas, enzimas como lipase, amilase, proteases, biossurfactantes, antibióticos, anti-  
36 inflamatórios e antiparasitários [3, 4].

37 Entre as substâncias microbianas de interesse, destacam-se moléculas biossurfactantes, que  
38 apresentam caráter anfipático. Estas moléculas despertam grande interesse devido sua aplicação na  
39 redução da tensão superficial e interfacial, formando microemulsões onde hidrocarbonetos podem  
40 ser solubilizados. Moléculas surfactantes podem ser obtidas de origem sintética, a partir de sínteses  
41 químicas, ou biológicas, classificadas como biossurfactantes.

42 Os biossurfactantes apresentam grande capacidade de detergência, emulsificação e formação de  
43 espuma, tornando-se de grande interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica [5], além de  
44 sua aplicação em diversos processos, diferentemente dos surfactantes sintéticos. São descritas  
45 aplicações de biossurfactantes na proteção ambiental [6], biodegradabilidade [7] e formação de

46 espuma em ampla faixa de temperatura e pH [8]. Além disso, os biossurfactantes são utilizados como  
 47 antimicrobianos por possuir ação desestabilizante da parede celular de alguns microrganismos [9].

48 Biossurfactantes de origem microbiana possuem algumas vantagens quando comparados  
 49 àqueles de origem química, como maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução  
 50 da tensão superficial, estabilidade térmica, estabilidade quando submetidos a valores extremos de  
 51 pH. Além disso, são produzidos a partir de substratos renováveis e passíveis de modificação  
 52 estrutural através da engenharia genética ou de técnicas bioquímicas [10].

53 Muitos microrganismos são capazes de produzir moléculas biossurfactantes com ação  
 54 bactericida, fungicida e herbicida, além de apresentar alta capacidade de detergência. Dentre eles,  
 55 estão as actinobactérias, que são microrganismos de grande interesse biotecnológico devido sua  
 56 versatilidade metabólica, de onde são obtidos diversos metabólitos secundários de estrutura química  
 57 e ação biológica variada. Actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas, com grande  
 58 distribuição no solo, onde exercem papel fundamental na ciclagem de nutrientes através da ação de  
 59 suas diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas sobre a matéria orgânica [11].

60 Dos 23.000 metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos cerca de 10.000  
 61 são metabólitos bioativos produzidos por Actinobactérias, sendo que o gênero *Streptomyces* é  
 62 responsável pela produção de mais de 70% destes compostos [12, 13].

63 Dentre os mais de 130 gêneros de actinobactérias, o gênero *Streptomyces* sp. se destaca na  
 64 produção de diversas moléculas bioativas como antibióticos [14, 15], antitumorais, antiparasitários,  
 65 vitaminas, biossurfactantes e enzimas de interesse industrial como lipases, pectinases, amilases [16].

66 É crescente a preocupação com a prospecção e desenvolvimento de novos produtos de origem  
 67 biológica, visto as vantagens que estes apresentam sobre os sintéticos. Assim, a microbiota amazônica  
 68 vem sendo cada vez mais explorada e tem demonstrado ser uma inestimável fonte de moléculas  
 69 bioativas com as mais diversas aplicações.

70 Tendo em vista o grande potencial amazônico e a possibilidade de obter uma diversidade de  
 71 moléculas produzidas por actinobactérias, este estudo buscou isolar actinobactérias do gênero  
 72 *Streptomyces* sp. presentes na rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga) e avaliar a  
 73 capacidade de produção de substâncias biossurfactantes.

## 74 2. Material e Métodos

### 75 Isolamento, caracterização fenotípica e identificação molecular

76 As actinobactérias foram isoladas a partir da inoculação de 100 µL de suspensões microbianas  
 77 preparadas a partir de 10 g de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga) em  
 78 tampão fosfato (PBS). A amostra de solo foi coletada em uma zona de transição de floresta ombrófila  
 79 densa e savana (Latitude 20 28' 01.28" S e Longitude 540 49' 45.32" O) na cidade de Santarém, Pará,  
 80 Brasil.

81 A suspensão microbiana foi obtida por agitação mecânica a 180 rpm por 30 minutos, e  
 82 posteriormente preparado diluições para obtenção das suspensões de semeadura nas concentrações 10<sup>-3</sup>,  
 83 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>.

84 O meio de isolamento foi Agar Asparagina Levedura (ALA) [17] suplementado com Nistatina (64  
 85 µg/mL), sendo as placas inoculadas e mantidas em estufa bacteriológica durante 21 dias a 37°C. As  
 86 colônias de actinobactérias foram previamente selecionadas através de caracteres fenotípicos das  
 87 colônias, seguindo os padrões de colônias pequenas, rígidas, opacas, com formação de micélio aéreo  
 88 compacto e rasteiro, além da produção de pigmento [18].

89 Após obtenção das culturas puras, foram realizadas análises bioquímicas [18] e morfológicas  
 90 através da técnica de Gram e microcultivo [19] seguido de microscopia de luz comum e microscopia  
 91 eletrônica de varredura (MEV), para caracterização da cadeia de esporos.

92 O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por Stirling [20] a partir de 5 ml de suspensão  
 93 celular obtida após 72h de cultivo em meio líquido ISP2. Para a reação de amplificação foram utilizados  
 94 os pares de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R seguindo os passos: 95°C (3'); 35 ciclos de 94°C (30''),  
 95 68°C (30''), 72°C (90''); extensão de 72°C (7'). E para o par fD1/rD1: 95°C (3'); 30 ciclos de 94°C (1'), 55°C  
 96 (30''), 72°C (2'); extensão de 72°C (7'). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE

97 Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor CRTM2.1-TOPO® vector utilizando o kit TOPO TA  
98 Cloning (ThermoFisherScientific 451641).

99 Para o sequenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos M13F (GTAAAACGACGGCCAGT)  
100 e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os fragmentos subclonados. O completo  
101 sequenciamento do gene 16S RNAr foi realizado com os oligonucleotídeos [21] 341-357F  
102 (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f  
103 (GCAACGAGCGCAACCC), por sequenciamento Sanger, realizado no sequenciador ABI PRISM 3730  
104 DNA ANALYZER (AppliedBiosystems/Hitashi) no Laboratório de Genômica e Elementos de  
105 Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo  
106 (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

107

### 108 **Seleção preliminar de actinobactérias produtoras de biossurfactantes**

109 Para a triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes, foi inicialmente realizada uma seleção  
110 observando a capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas. As colônias bacterianas  
111 obtidas do cultivo de 196h em meio ISP2 foram inoculadas nos meios de cultura contendo os respectivos  
112 substratos para produção das enzimas lipase, esterase [22] e hemolisinas [23]. O índice enzimático foi  
113 determinado a partir da relação entre o diâmetro do halo enzimático e o diâmetro da colônia, sendo  
114 considerado bom potencial enzimático valor superior a 1.5 [24].

115

### 116 **Avaliação da produção de biossurfactante**

117 As cepas de actinobactérias selecionadas pelo maior índice enzimático foram cultivadas sob  
118 agitação contínua de 180 rpm por 120 h a 30°C em Erlenmeyer (500 mL) contendo 180 ml do meio Caldo  
119 Nutriente (CN) aditivado com (1%) de azeite de oliva.

120 A avaliação da produção de biossurfactante foi verificada pela capacidade tanto da suspensão  
121 microbiana, quanto do líquido metabólico livre de células, em emulsionar substratos lipídicos óleo  
122 diesel (OD), óleo de motor (OM), óleo de canola (OCA), óleo de milho (OM), óleo de girassol (OG) e  
123 óleo de soja (OS). Para tanto, foi preparado uma mistura a partir de 2 mL da suspensão bacteriana e 2  
124 mL dos substratos, por agitação mecânica em vórtex durante 2 minutos. Após 24h foi verificado o índice  
125 de emulsificação (IE24), resultado da razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total,  
126 multiplicada por 100 [25].

## 127 **3. Resultados**

### 128 *3.1. Isolamento, cultivo e manutenção*

129 Foram isoladas 11 cepas de actinobactérias, apresentando variada coloração do micélio aéreo e  
130 micélio vegetativo, com desenvolvimento de colônias velutas e pulverulentas (Tabela 1). As cepas  
131 isoladas são Gram-positivas e a morfologia da cadeia de esporos variou nos padrões reta, flexuosa e  
132 *Retinaculum apertum*, padrões característicos do gênero *Streptomyces*. Esses dados foram corroborados  
133 com a análise molecular do gene RNAr 16S evidenciando similaridade acima de 96% com o gênero  
134 *Streptomyces* sp. As cepas *Streptomyces* MPO6, *Streptomyces* MPO8 produzem pigmentos difusos no  
135 meio ISP2, e a *Streptomyces* MPO11 em meio ISP4.

136

137

138

139

140

141

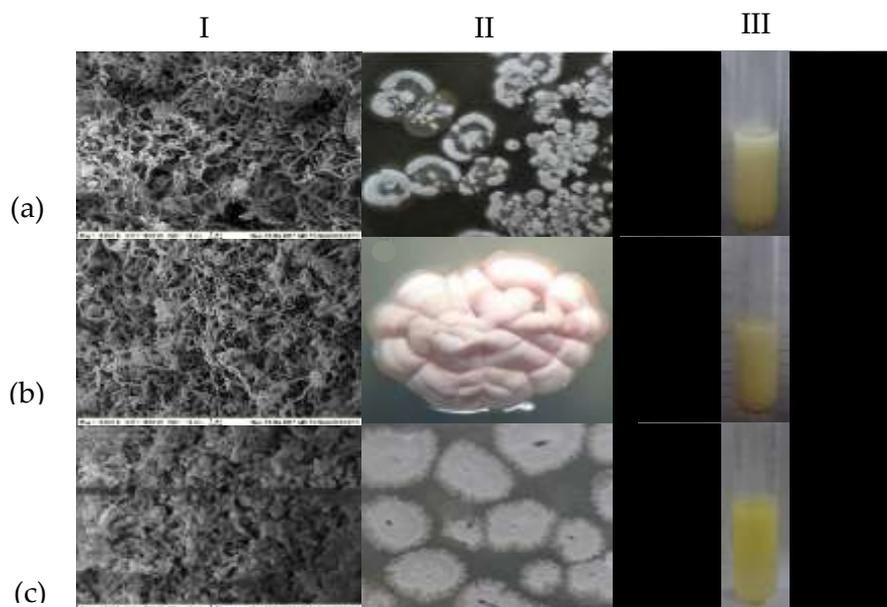
**Tabela 1.** Morfologia das colônias de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn fragans (Macacaporanga) cultivadas nos meios ISP-2.

142

| Cepa                          | Micélio aéreo/Micélio vegetativo |                          |                         |                        |                      |                        | Pigmento | Tolerância (NaCl) |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------|-------------------|
|                               | ISP1                             | ISP2                     | ISP3                    | ISP4                   | ISP5                 | ALA                    |          |                   |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO1  | +++<br>Branco / bege             | ++++<br>Branco / bege    | +++<br>Branco / incolor | ++<br>Branco / bege    | ++<br>Branco / bege  | ++++<br>Branco / bege  | -        | 5% +++            |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO2  | ++<br>Branco / bege              | +++<br>Branco / amarelo  | ++<br>Branco / amarelo  | ++<br>Branco / bege    | ++<br>Branco / bege  | ++<br>Branco / amarelo | -        | 7% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO3  | ++<br>Ausente / bege             | ++++<br>Branco / bege    | +++<br>Branco / bege    | ++<br>Branco / bege    | -                    | ++<br>Branco / incolor | -        | 8% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO4  | ++++<br>Branco / bege            | ++++<br>Branco / bege    | ++<br>Branco / bege     | ++<br>Branco / bege    | -                    | ++<br>Branco / bege    | -        | 8% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO5  | ++<br>Ausente / bege             | +++<br>Branco / amarelo  | ++<br>Branco / bege     | -                      | ++<br>Branco / bege  | ++<br>Branco / bege    | -        | 5% +++            |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO6  | -                                | +<br>Branco / amarelo    | -                       | -                      | -                    | -                      | +        | 7% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO7  | +++<br>Branco / bege             | ++++<br>Branco / bege    | ++++<br>Branco / cinza  | +++<br>Branco / bege   | +++<br>Branco / bege | ++<br>Branco / bege    | -        | 9% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO8  | +++<br>Branco / amarelo          | ++++<br>Branco / amarelo | ++<br>Branco / incolor  | ++<br>Branco / incolor | -                    | -                      | +        | 8% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO9  | +++<br>Cinza / bege              | +++<br>Branco / amarelo  | +++<br>Cinza / bege     | +++<br>Cinza / bege    | +++<br>Branco / bege | -                      | -        | 7% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO10 | -                                | +++<br>Cinza / amarelo   | ++++<br>Verde / bege    | ++<br>Cinza / bege     | ++<br>Cinza / bege   | ++<br>Cinza / cinza    | -        | 5% +              |
| <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 | +<br>Cinza / bege                | +++<br>Branco / amarelo  | +++<br>Cinza / bege     | +++<br>Branco / bege   | +++<br>Branco / bege | -                      | +        | 5% +              |

143

144



145

**Figura 1.** Morfologia bacteriana dos isolados selecionados. I. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). II. Colônias bacterianas cultivadas em meio ISP2. III. Registro da emulsão formada em óleo de soja. (a) *Streptomyces* sp. MPO 2. (b) *Streptomyces* sp. MPO6. (c) *Streptomyces* sp. MPO11.

146

147

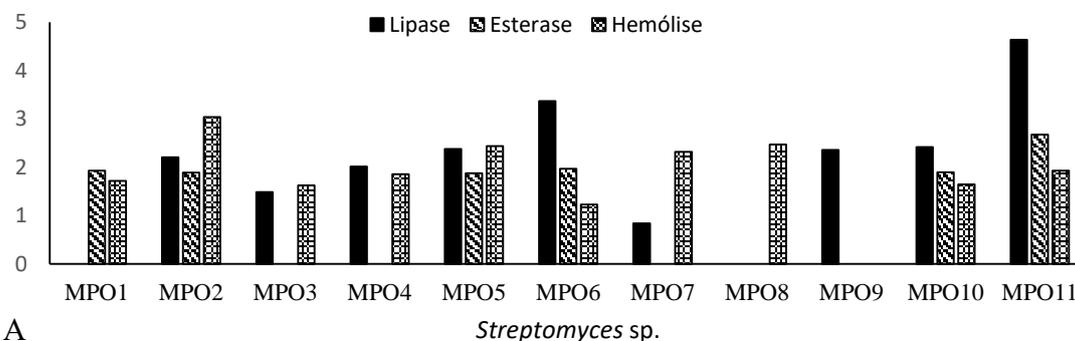
148

149

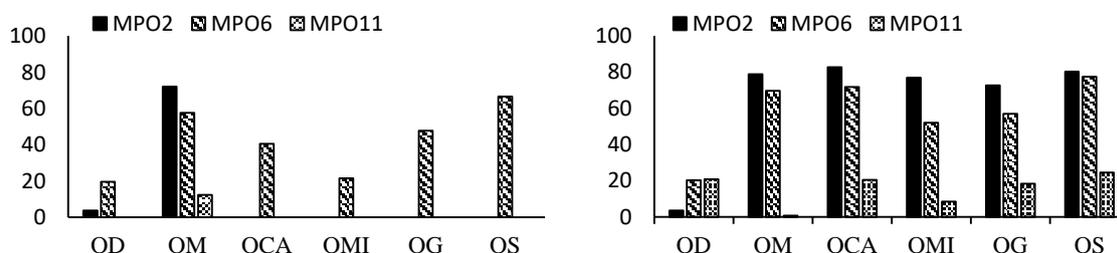
150

151

As 11 cepas de *Streptomyces* sp. produziram colônias na maior parte dos meios de cultura testados, com exceção da cepa *Streptomyces* sp. MPO6 que coloniza apenas o meio ISP2 (Tabela 1). Foi observado a tolerância dos isolados em colonizar meios contendo NaCl em concentração variando entre 5 e 9%.



A



B

C

152

153

154

155

**Figura 2.** A: Índices enzimáticos registrados na triagem em meio sólido para as cepas de *Streptomyces* sp. B: Índices de emulsificação (IE24) do líquido livre de células; C: Índices de Emulsificação (IE24) do cultivo bacteriano. OD: óleo diesel; OM: óleo de motor; OCA: óleo de canola; OMI: óleo de milho; OG: óleo de girassol; OS: óleo de soja).

### 156 3.2. Cepas produtoras de enzimas biossurfactantes

157 As cepas de *Streptomyces* sp. isoladas produzem pelo menos uma das enzimas relacionadas a  
158 ação surfactante, com destaque para a cepa *Streptomyces* sp. MPO11 que apresentou maior índice  
159 enzimático para lipase e esterase (Figura 2).

160 As cepas *Streptomyces* sp. MPO2, *Streptomyces* sp. MPO6 e *Streptomyces* sp. MPO11 selecionadas  
161 na triagem apresentaram capacidade de emulsificação de em todos os substratos lipídicos de origem  
162 vegetal e somente a cepa *Streptomyces* sp. MPO11 não emulsionou Óleo Diesel. Foi também  
163 determinado que o líquido contendo a biomassa bacteriana apresentou maior capacidade de emulsão  
164 (figura 2).

## 165 4. Discussão

166 O solo é uma importante fonte de microrganismos, os quais participam de diversas reações  
167 metabólicas, promovendo a ciclagem de nutrientes, sendo, portanto, indispensáveis na manutenção  
168 da qualidade desse ambiente. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* tem sido frequentemente  
169 isoladas a partir de amostras de solo, apresentando colônias bacterianas de aspecto variado quanto a  
170 coloração do micélio e produção de pigmentos nos meios International *Streptomyces* Project,  
171 principalmente ISP2 [26]. Oskay [27] isolou 50 cepas de *Streptomyces* de uma amostra de solo de  
172 uma fazenda na Turquia, onde as cepas apresentaram diferentes colorações de micélio aéreo e  
173 vegetativo, sendo a maioria delas produtoras de moléculas com atividade antagônica frente a  
174 microrganismos patogênicos.

175 A produção de enzimas como esterases e lipases por *Streptomyces* sp. têm sido descritas por  
176 Karanja et al. [28] que isolaram de uma amostra de solo do Quênia, quatro cepas produtoras de  
177 diversas enzimas de interesse industrial, entre elas a lipase. Malviya et al. [29] também descrevem o  
178 potencial enzimático de actinobactérias isoladas de um ambiente extremo no nordeste do Himalaia  
179 na Índia, produtoras das enzimas catalase, lipase, gelatinase e amilase.

180 Quando verificado a ação biossurfactante, tanto do cultivo bacteriano quanto do líquido  
181 metabólico livre de células das cepas *Streptomyces* sp. MPO2, *Streptomyces* sp. MPO6 e *Streptomyces*  
182 sp. MPO11, foi constatada sua ação emulsificante nos substratos lipídicos de origem vegetal e fóssil.  
183 Os substratos hidrofóbicos vegetais com maior emulsificação foram os óleos de canola e soja, a partir  
184 do cultivo bacteriano da cepa *Streptomyces* sp. MPO2, com IE24 de 82,7% e 80,3%, respectivamente.

185 O substrato óleo lubrificante de motor foi emulsificado pela mesma cepa, com IE24 de 78,8%.  
186 Estes valores são superiores quando comparados com os valores encontrados por Santos [30], que ao  
187 estudar biossurfactantes produzidos por actinobactérias isoladas de líquens da Amazônia, obteve  
188 IE24 de 35% para o óleo de canola e 60% para o óleo de soja. Elkhawaga [31] obteve um IE24 de  
189 aproximadamente 40% para óleos de milho, soja e girassol, resultados inferiores aos obtidos com a  
190 cepa *Streptomyces* sp. MPO2, que apresentou um IE24 acima de 70%.

191 Tomando como referência a ação emulsificante do gênero *Bacillus*, grupo de maior potencial na  
192 produção de biossurfactantes, a ação emulsificante de *Bacillus subtilis* observada por Rovina [32]  
193 ainda se apresenta inferior, correspondendo a IE24 de 5,56% para óleo de soja. Ao mesmo passo,  
194 Soares [33] ao estudar a mesma espécie, obteve um IE24 de 62,4% para o mesmo substrato.

195 *Streptomyces* sp. MPO2 apresentou o maior índice enzimático para hemolisinas, sendo também  
196 a cepa que apresentou maior capacidade de emulsificação para todos os óleos testados, corroborando

197 com a pesquisa de Carrillo e colaboradores [23], que sugeriram que existe uma correlação entre a  
 198 produção de hemolisinas e biossurfactantes, uma vez que ao testarem 86 bactérias (hemolíticas e não  
 199 hemolíticas) para a produção de biossurfactante, obtiveram resultados positivos para apenas cinco  
 200 bactérias, sendo todas pertencentes ao conjunto de bactérias hemolíticas.

201 Segundo Youssef e colaboradores [34], para que um microrganismo seja considerado promissor  
 202 na produção de biossurfactante, resultados de IE24 acima de 40% devem ser encontrados. Desta  
 203 forma, pode-se afirmar que as cepas de *Streptomyces* sp. isoladas neste estudo apresentam a  
 204 promissora habilidade em formar bioemulsões.

## 205 5. Conclusão

206 Nesse estudo é descrito pela primeira vez a habilidade de cepas de actinobactérias isoladas da  
 207 rizosfera de *Aniba parviflora* em produzir substâncias biossurfactantes. Os valores de índice de  
 208 emulsificação encontrados são promissores quando comparadas a estudos com o gênero *Bacillus*, e a  
 209 maior ação emulsificante foi registrada para o líquido do cultivo bacteriano das cepas *Streptomyces*  
 210 sp. MPO2 e *Streptomyces* sp. MPO11. Visto que substâncias biossurfactantes de origem microbiana  
 211 podem ser extracelulares ou constituírem a membrana celular de uma variedade de leveduras,  
 212 bactérias e fungos filamentosos, sugere-se que a ação biossurfactante aqui relatada seja resultante de  
 213 moléculas associadas à biomassa bacteriana.

214 **Agradecimentos:** À Universidade Federal do Oeste do Pará e à equipe de trabalho do Laboratório de  
 215 Microbiologia.

216 **Conflitos de Interesse:** Não há conflitos de interesse.

## 217 Referências

- 218 1. Miguel, L.M., *Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e*  
 219 *perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos*. 2007, Universidade de São Paulo.
- 220 2. Diniz, M.B., et al., *REGIÃO AMAZÔNICA: BIODIVERSIDADE E POSSIBILIDADES DE*  
 221 *TRANSFORMAÇÃO INDUSTRIAL*. Cadernos CEPEC, 2019. 6(1-6).
- 222 3. Barnum, S.R., *Biotechnology: an introduction*. 2005: Brooks/Cole Publishing Company.
- 223 4. Canhos, V.P. and G.P. Manfio, *Recursos microbiológicos para Biotecnologia*. URL: [http://www.](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20Vanderlei%20Fina_.pdf)  
 224 [mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias% 20\\_Vanderlei% 20Fina\\_. pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20Vanderlei%20Fina_.pdf), 2001.
- 225 5. Greek, B.F., *Detergent industry ponders products for new decade*. Chemical & Engineering News,  
 226 1990. 68(5): p. 37-&.
- 227 6. Rahman, K., et al., *Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of Pseudomonas aeruginosa*  
 228 *Using Low-Cost Raw Materials*. Biotechnology progress, 2002. 18(6): p. 1277-1281.
- 229 7. Costa, S.G., et al., *Production of Pseudomonas aeruginosa LBI rhamnolipids following growth on*  
 230 *Brazilian native oils*. Process Biochemistry, 2006. 41(2): p. 483-488.
- 231 8. Banat, I.M., *Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil*  
 232 *pollution remediation: a review*. Bioresource technology, 1995. 51(1): p. 1-12.
- 233 9. Nitschke, M. and G.M. Pastore, *Production and properties of a surfactant obtained from Bacillus*  
 234 *subtilis grown on cassava wastewater*. Bioresource technology, 2006. 97(2): p. 336-341.
- 235 10. Colla, L.M. and J.A.V. Costa, *Obtenção e aplicação de biossurfactantes*. 2003.
- 236 11. Nguyen, X.H., et al., *Antagonism of antifungal metabolites from Streptomyces griseus H7602*  
 237 *against Phytophthora capsici*. J Basic Microbiol, 2015. 55(1): p. 45-53.

- 238 12. Arasu, M.V., et al., *In vitro antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-3 isolated from Western*  
239 *Ghats rock soil (India)*. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 2009.  
240 **19**(1): p. 22-28.
- 241 13. Jorgensen, H., et al., *Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and*  
242 *comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam, ML-449*. Appl  
243 Environ Microbiol, 2010. **76**(1): p. 283-93.
- 244 14. Dastager, S.G., et al., *Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant Streptomyces gulbargensis*  
245 *sp. nov.* Curr Microbiol, 2008. **57**(6): p. 638-42.
- 246 15. Ruan, J., [*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 and the study of*  
247 *Actinomycetes systematic in China*]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2013. **53**(6): p. 521-30.
- 248 16. Manivasagan, P., et al., *Production of alpha-amylase for the biosynthesis of gold nanoparticles using*  
249 *Streptomyces sp. MBRC-82*. Int J Biol Macromol, 2015. **72**: p. 71-8.
- 250 17. Nonomura, H. and Y. Ohara, *The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture*  
251 *isolation method for Microbispora and Streptosporangium strains Part I*. J. Ferm. Technol, 1969. **47**:  
252 p. 463-469.
- 253 18. Williams, S., et al., *Numerical classification of Streptomyces and related genera*. Microbiology, 1983.  
254 **129**(6): p. 1743-1813.
- 255 19. Holt, J., et al., *Gram-positive cocci*. Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed.  
256 Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, 1994: p. 544-51.
- 257 20. Stirling, D., *DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria*. Methods Mol Biol, 2003. **226**: p. 53-  
258 4.
- 259 21. Lane, D., *16S/23S rRNA sequencing*. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 1991: p.  
260 125-175.
- 261 22. Sierra, G., *A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some*  
262 *observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates*. Antonie Van  
263 Leeuwenhoek, 1957. **23**(1): p. 15-22.
- 264 23. Carrillo, P., et al., *Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria*. World Journal of  
265 Microbiology and Biotechnology, 1996. **12**(1): p. 82-84.
- 266 24. Hankin, L. and S. Anagnostakis, *The use of solid media for detection of enzyme production by fungi*.  
267 Mycologia, 1975. **67**(3): p. 597-607.
- 268 25. Cooper, D.G. and B.G. Goldenberg, *Surface-active agents from two Bacillus species*. Appl.  
269 Environ. Microbiol., 1987. **53**(2): p. 224-229.
- 270 26. Rashad, F.M., et al., *Isolation and characterization of multifunctional Streptomyces species with*  
271 *antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt*.  
272 Microbiological research, 2015. **175**: p. 34-47.
- 273 27. Oskay, A.M., T. Üsame, and A. Cem, *Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from*  
274 *farming soils of Turkey*. African journal of Biotechnology, 2004. **3**(9): p. 441-446.
- 275 28. Karanja, E., et al., *Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of*  
276 *selected novel Streptomyces species from Kenyan soils*. 2017.
- 277 29. Malviya, M.K., et al., *Characterization and identification of actinomycetes isolated from 'fired plots'*  
278 *under shifting cultivation in northeast Himalaya, India*. Annals of microbiology, 2013. **63**(2): p.  
279 561-569.
- 280 30. Santos, E.F.d., *Produção, caracterização e aplicação biológica do biossurfactante por Streptomyces spp.*

- 281            *isolados da Região Amazônia. 2012., in Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. 2012,*  
282            *Universidade Federal Rural de Pernambuco. p. 160.*
- 283    31.    Elkhawaga, M., *Optimization and characterization of biosurfactant from Streptomyces griseoplanus*  
284            *NRRL-ISP 5009 (MS 1). Journal of applied microbiology, 2018. 124(3): p. 691-707.*
- 285    32.    Rovina, F., D.D. Ehrhardt, and E.B. Tambourgi, *Utilização do resíduo da casca de laranja para*  
286            *produção de biosurfactantes por Bacillus subtilis. Scientia Plena, 2018. 14(4).*
- 287    33.    Soares, D., *Produção e Caracterização de Biosurfactantes Obtidos por Linhagens de Bacillus sp. 2014,*  
288            *Isolados de Estações de Tratamento de Águas Residuais e de Solo de ....*
- 289    34.    Youssef, N.H., et al., *Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse*  
290            *microorganisms. Journal of microbiological methods, 2004. 56(3): p. 339-347.*
- 291



© 2019 pelo autor. Enviado para possível publicação de acesso aberto sob os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1 *Tipo de trabalho (Artigo, Revisão, Comunicação, etc.)*

## 2 **Título**

3 **Nome do autor** <sup>1,\*</sup>

4 <sup>1</sup> Afiliação 1; e-mail@e-mail.com

5 \* Correspondencie: e-mail@e-mail.com; Tel.: +xx-xxxx-xxx-xxxx (F.L.)

6 Received: date; Accepted: date; Published: date

7

8 **Resumo:** Um único parágrafo com cerca de 200 palavras no máximo. Para artigos de pesquisa, os  
9 resumos devem fornecer uma visão geral pertinente do trabalho. Nós encorajamos os autores a usar  
10 o seguinte estilo de resumos estruturados, mas sem títulos: (1) Antecedentes: Colocar a questão  
11 abordada em um contexto amplo e destacar o propósito do estudo; (2) Métodos: Descreva  
12 sucintamente os principais métodos ou tratamentos aplicados; (3) Resultados: Resumir os principais  
13 resultados do artigo; e (4) Conclusões: Indique as principais conclusões ou interpretações. O resumo  
14 deve ser uma representação objetiva do artigo, não deve conter resultados não apresentados e  
15 fundamentados no texto principal e não deve exagerar as principais conclusões.

16

17 **Palavras-chave:** palavra-chave 1; palavra-chave 2; Palavra-chave 3 (Liste três a dez palavras-chave  
18 pertinentes específicas do artigo; ainda que razoavelmente comuns dentro da disciplina do assunto.)

### 19 **1. Introdução**

20 A introdução deve colocar brevemente o estudo em um contexto amplo e destacar por que é  
21 importante. Deve definir o propósito do trabalho e seu significado. O estado atual do campo de  
22 pesquisa deve ser revisado cuidadosamente e as principais publicações citadas. Por favor, destaque  
23 hipóteses controversas e divergentes quando necessário. Por fim, mencione brevemente o objetivo  
24 principal do trabalho e destaque as principais conclusões. Tanto quanto possível, por favor,  
25 mantenha a introdução compreensível para os cientistas fora do seu campo particular de pesquisa.  
26 As referências devem ser numeradas em ordem de aparecimento e indicadas por um numeral ou  
27 números entre colchetes, por exemplo, [1] ou [2,3] ou [4-6]. Veja o final do documento para mais  
28 detalhes sobre referências.

### 29 **2. Material e Metodos**

30 Materiais e Métodos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir que outros possam  
31 replicar e basear-se nos resultados publicados. Observe que a publicação de seu manuscrito implica  
32 que você deve disponibilizar todos os materiais, dados, código de computador e protocolos  
33 associados à publicação aos leitores. Por favor, divulgue no estágio de submissão quaisquer  
34 restrições sobre a disponibilidade de materiais ou informações. Novos métodos e protocolos devem  
35 ser descritos em detalhes enquanto métodos bem estabelecidos podem ser brevemente descritos e  
36 apropriadamente citados.

37 Os manuscritos de pesquisa que relatam grandes conjuntos de dados que são depositados em um  
38 banco de dados disponível publicamente devem especificar onde os dados foram depositados e  
39 fornecer os números de acesso relevantes. Se os números de acesso ainda não tiverem sido obtidos  
40 no momento da apresentação, declare que eles serão fornecidos durante a revisão. Eles devem ser  
41 fornecidos antes da publicação.

42 Estudos intervencionais envolvendo animais ou seres humanos, e outros estudos requerem  
43 aprovação ética devem listar a autoridade que forneceu a aprovação e o código de aprovação ética  
44 correspondente.

### 45 3. Resultados

46 Esta seção pode ser dividida por subtítulos. Deve fornecer uma descrição concisa e precisa dos  
47 resultados experimentais, sua interpretação, bem como as conclusões experimentais que podem ser  
48 tiradas.

#### 49 3.1. Sub-seção

##### 50 3.1.1. Subsubsection

51 Listas com marcadores se parecem com isso:

- 52 • Primeiro Marcador
- 53 • Segundo Marcador
- 54 • Terceiro Marcador

55 Listas numeradas podem ser adicionadas da seguinte forma:

- 56 1. Primeir item
- 57 2. Segundo item
- 58 3. Terceiro item

59 O texto continua aqui.

#### 60 3.2. Figuras, tabelas e esquemas

61 Todas as figuras e tabelas devem ser citadas no texto principal como Figura 1, Tabela 1, etc..



62 **Figura 1.** Esta é uma figura, Esquemas seguem a mesma formatação. Se houver vários painéis, eles  
63 deverão ser listados como: (a) Descrição do que está contido no primeiro painel; (b) Descrição do que  
64 está contido no segundo painel. As figuras devem ser colocadas no texto principal perto da primeira  
65 vez que são citadas. Uma legenda em uma única linha deve estar centralizada.

66

67 **Tabela 1.** Esta é uma tabela. As tabelas devem ser colocadas no texto principal perto da primeira vez  
68 que são citadas.

| Title 1 | Title 2 | Title 3           |
|---------|---------|-------------------|
| entry 1 | data    | data              |
| entry 2 | data    | data <sup>1</sup> |

69 <sup>1</sup> Tabelas podem ter um rodapé.

70

71 3.3. *Formatação de Componentes Matemáticos*

72 Este é um exemplo de uma equação:

$$a = 1, \tag{1}$$

73 o texto que segue uma equação não precisa ser um novo parágrafo. Por favor, pontue equações como  
74 texto regular.75 **4. Discussão**76 Os autores devem discutir os resultados e como podem ser interpretados na perspectiva de  
77 estudos anteriores e das hipóteses de trabalho. Os resultados e suas implicações devem ser discutidos  
78 no contexto mais amplo possível. Direções de pesquisas futuras também podem ser destacadas.79 **5. Conclusão**80 Esta seção não é obrigatória, mas pode ser adicionada ao manuscrito se a discussão for  
81 incomumente longa ou complexa.82 **6. Patentes**83 Esta seção não é obrigatória, mas pode ser adicionada se houver patentes resultantes do trabalho  
84 relatado neste manuscrito.85 **Materiais Suplementares:** Os seguintes itens estão disponíveis on-line em [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figura S1:  
86 título, Tabela S1: título, Vídeo S1: título.87 **Contribuições dos autores:** Para artigos de pesquisa com vários autores, um parágrafo curto especificando suas  
88 contribuições individuais deve ser fornecido. As seguintes afirmações devem ser usadas "conceituação, X.X. e  
89 Y.Y. ; metodologia, X.X. ; software, X.X. ; validação, X.X., Y.Y. e Z.Z. ; análise formal, X.X. ; investigação, X.X. ;  
90 recursos, X.X. ; curadoria de dados, X.X. ; escrita - preparação original do rascunho, X.X. ; redação - revisão e  
91 edição, X.X. ; visualização, X.X. ; supervisão, X.X. ; administração de projetos, X.X. ; aquisição de financiamento,  
92 Y.Y. ", por favor, recorra à taxonomia do CRediT para o termo explicação. A autoria deve ser limitada àqueles  
93 que contribuíram substancialmente para o trabalho relatado.94 **Financiamento:** Por favor, adicione: "Esta pesquisa não recebeu nenhum financiamento externo" ou "Esta  
95 pesquisa foi financiada por NOME DO FUNDADOR, concessão número XXX" e "O APC foi financiado por  
96 XXX". Verifique cuidadosamente se os detalhes fornecidos são precisos e use a grafia padrão dos nomes das  
97 agências de financiamento em <https://search.crossref.org/funding>. Quaisquer erros podem afetar seu  
98 financiamento futuro.99 **Agradecimentos:** Nesta seção você pode reconhecer qualquer suporte dado que não esteja coberto pela  
100 contribuição do autor ou pelas seções de financiamento. Isso pode incluir suporte administrativo e técnico ou  
101 doações em espécie (por exemplo, materiais usados para experimentos).102 **Conflitos de Interesse:** Declarar conflitos de interesse ou estado "Os autores declaram não haver conflito de  
103 interesse." Os autores devem identificar e declarar quaisquer circunstâncias pessoais ou interesses que possam  
104 ser interpretados como influenciando inadequadamente a representação ou interpretação dos resultados de  
105 pesquisa relatados. Qualquer papel dos financiadores na concepção do estudo; na coleta, análise ou  
106 interpretação de dados; na redação do manuscrito, ou na decisão de publicar os resultados devem ser declarados  
107 nesta seção. Se não houver nenhum papel, por favor declare "Os financiadores não tiveram nenhum papel no  
108 desenho do estudo; na coleta, análise ou interpretação de dados; na redação do manuscrito, ou na decisão de  
109 publicar os resultados "".110 **Apêndice A**111 O apêndice é uma seção opcional que pode conter detalhes e dados complementares ao texto  
112 principal. Por exemplo, explicações de detalhes experimentais que perturbariam o fluxo do texto  
113 principal, mas que, no entanto, permanecem cruciais para compreender e reproduzir a pesquisa  
114 mostrada; figuras de réplicas para experimentos cujos dados representativos são mostrados no texto

115 principal podem ser adicionados aqui, se breves, ou como dados suplementares. Provas matemáticas  
 116 de resultados não centrais para o papel podem ser adicionadas como um apêndice.

### 117 **Apêndice B**

118 Todas as seções do apêndice devem ser citadas no texto principal. Nos apêndices, Figuras,  
 119 Tabelas, etc. devem ser rotulados começando com "A", por exemplo, Figura A1, Figura A2, etc..

### 120 **Referências**

121 As referências devem ser numeradas em ordem de aparecimento no texto (incluindo citações em tabelas e  
 122 legendas) e listadas individualmente no final do manuscrito. Recomendamos preparar as referências com  
 123 um pacote de software de bibliografia, como EndNote, ReferenceManager ou Zotero, para evitar erros de  
 124 digitação e referências duplicadas. Inclua o identificador de objeto digital (DOI) para todas as referências,  
 125 quando disponíveis.

126  
 127 Citações e referências em arquivos suplementares são permitidas, desde que também apareçam na lista de  
 128 referências aqui.

129  
 130 No texto, os números de referência devem ser colocados entre colchetes [] e colocados antes da pontuação;  
 131 por exemplo [1], [1–3] ou [1,3]. Para citações incorporadas no texto com paginação, use os parênteses e  
 132 colchetes para indicar o número de referência e os números das páginas; por exemplo [5] (p. 10), ou [6] (pp.  
 133 101–105).

- 134
- 135 1. Autor 1, A.B. ; Autor 2, C.D. Título do artigo. Nome do periódico abreviado Ano, Volume, Intervalo de  
 136 páginas.
- 137 2. Autor 1, A. ; Autor 2, B. Título do capítulo. No título do livro, 2 ed. ; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds. ; Editora:  
 138 Editora Local, País, 2007; Volume 3, pp. 154-196.
- 139 3. Autor 1, A. ; Autor 2, B. Título do Livro, 3a ed. ; Editora: Editora Local, País, 2008; pp. 154-196.
- 140 4. Autor 1, A.B. ; Autor 2, C. Título do trabalho não publicado. Fase abreviada do nome do periódico da  
 141 publicação (em revisão; aceita; no prelo).
- 142 5. Autor 1, A.B. (Universidade, cidade, estado, país); Autor 2, C. (Instituto, Cidade, Estado, País).  
 143 Comunicação pessoal, 2012.
- 144 6. Autor 1, A.B. ; Autor 2, C.D. ; Autor 3, E.F. Título da Apresentação. Em Título da Obra Coletada (se  
 145 disponível), Anais do Nome da Conferência, Localização da Conferência, País, Data da Conferência; Editor  
 146 1, Editor 2, Eds. (se disponível); Editora: Cidade, País, Ano (se disponível); Número abstrato (opcional),  
 147 Paginação (opcional).
- 148 7. Autor 1, A.B. Título da Tese. Nível de Tese, Universidade de Graduação, Localização da Universidade,  
 149 Data de Conclusão.
- 150 8. Título do Site. Disponível on-line: URL (acessado no dia do ano do mês).



© 2019 pelos autores. Enviado para possível publicação de acesso aberto sob os termos e  
 condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY)  
 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).