ORGANIZADORES
Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Ana Luiza de Brito Portela Castro
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
João Lúcio de Azevedo

TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

10 ANOS DO PBA

CAPES UEM pimenta cultural

ORGANIZADORES
Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Ana Luiza de Brito Portela Castro
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
João Lúcio de Azevedo

TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

10 ANOS DO PBA

CAPES UEM | São Paulo | 2024 | pimenta cultural

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

T674

Tópicos Especiais em Biotecnologia Ambiental: 10 Anos do PBA / Organização Veronica Elisa Pimenta Vicentini... [et al.]. – São Paulo: Pimenta Cultural, 2024.

Demais organizadores: Ana Luiza de Brito Portela Castro, Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki, João Lúcio de Azevedo.

Livro em PDF

ISBN 978-85-7221-275-5
DOI 10.31560/pimentacultural/978-85-7221-275-5

1. Biotecnologia Ambiental. 2. Biodiversidade, Biocatálise e Biotransformação. 3. Bioprospecção e Controle Biológico. 4. Mutagênese e Monitoramento Ambiental. 5. Biotecnologia, Ambiente e Saúde. I. Vicentini, Veronica Elisa Pimenta (Org.). II. Castro, Ana Luiza de Brito Portela (Org.). III. Ruvolo-Takasusuki, Maria Claudia Colla (Org.). IV. Azevedo, João Lúcio de (Org.). V. Título.

CDD: 631.613

Índice para catálogo sistemático:
I. Biotecnologia Ambiental
II. Saúde Preventiva
Simone Sales • Bibliotecária • CRB CRB: ES-000814/O

Copyright © Pimenta Cultural, alguns direitos reservados.

Copyright do texto © 2024 os autores e as autoras.

Copyright da edição © 2024 Pimenta Cultural.

Esta obra é licenciada por uma Licença Creative Commons:
Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional - (CC BY-NC-ND 4.0).
Os termos desta licença estão disponíveis em:
<*https://creativecommons.org/licenses/*>.
Direitos para esta edição cedidos à Pimenta Cultural.
O conteúdo publicado não representa a posição oficial da Pimenta Cultural.

Direção editorial	Patricia Bieging Raul Inácio Busarello
Editora executiva	Patricia Bieging
Coordenadora editorial	Landressa Rita Schiefelbein
Assistente editorial	Júlia Marra Torres
Estagiária editorial	Ana Flávia Pivisan Kobata
Diretor de criação	Raul Inácio Busarello
Assistente de arte	Naiara Von Groll
Editoração eletrônica	Andressa Karina Voltolini Milena Pereira Mota
Estagiárias em editoração	Raquel de Paula Miranda Stela Tiemi Hashimoto Kanada
Imagens da capa	alidrian, rawpixel.com, rost9 - Freepik.com
Tipografias	Acumin, Calibri, Malaga Narrow OTCE
Revisão	Os autores e os organizadores
Organizador	Veronica Elisa Pimenta Vicentini Ana Luiza de Brito Portela Castro Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki João Lúcio de Azevedo

PIMENTA CULTURAL
São Paulo • SP
+55 (11) 96766 2200
livro@pimentacultural.com
www.pimentacultural.com

2024

CONSELHO EDITORIAL CIENTÍFICO

Doutores e Doutoras

Adilson Cristiano Habowski
Universidade La Salle, Brasil

Adriana Flávia Neu
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Adriana Regina Vettorazzi Schmitt
Instituto Federal de Santa Catarina, Brasil

Aguimario Pimentel Silva
Instituto Federal de Alagoas, Brasil

Alaim Passos Bispo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

Alaim Souza Neto
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Alessandra Knoll
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Alessandra Regina Müller Germani
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Aline Corso
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brasil

Aline Wendpap Nunes de Siqueira
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil

Ana Rosangela Colares Lavand
Universidade Federal do Pará, Brasil

André Gobbo
Universidade Federal da Paraíba, Brasil

Andressa Wiebusch
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Andreza Regina Lopes da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Angela Maria Farah
Universidade de São Paulo, Brasil

Anísio Batista Pereira
Universidade do Estado do Amapá, Brasil

Antonio Edson Alves da Silva
Universidade Estadual do Ceará, Brasil

Antonio Henrique Coutelo de Moraes
Universidade Federal de Rondonópolis, Brasil

Arthur Vianna Ferreira
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Ary Albuquerque Cavalcanti Junior
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil

Asterlindo Bandeira de Oliveira Júnior
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Bárbara Amaral da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

Bernadétte Beber
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Bruna Carolina de Lima Siqueira dos Santos
Universidade do Vale do Itajaí, Brasil

Bruno Rafael Silva Nogueira Barbosa
Universidade Federal da Paraíba, Brasil

Caio Cesar Portella Santos
Instituto Municipal de Ensino Superior de São Manuel, Brasil

Carla Wanessa do Amaral Caffagni
Universidade de São Paulo, Brasil

Carlos Adriano Martins
Universidade Cruzeiro do Sul, Brasil

Carlos Jordan Lapa Alves
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil

Caroline Chioquetta Lorenset
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Cássio Michel dos Santos Camargo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Faced, Brasil

Christiano Martino Otero Avila
Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Cláudia Samuel Kessler
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Cristiana Barcelos da Silva.
Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

Cristiane Silva Fontes
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

Daniela Susana Segre Guertzenstein
Universidade de São Paulo, Brasil

Daniele Cristine Rodrigues
Universidade de São Paulo, Brasil

Dayse Centurion da Silva
Universidade Anhanguera, Brasil

Dayse Sampaio Lopes Borges
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil

Diego Pizarro
Instituto Federal de Brasília, Brasil

Dorama de Miranda Carvalho
Escola Superior de Propaganda e Marketing, Brasil

Edson da Silva
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

Elena Maria Mallmann
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Eleonora das Neves Simões
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Eliane Silva Souza
Universidade do Estado da Bahia, Brasil

Elvira Rodrigues de Santana
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Éverly Pegoraro
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Fábio Santos de Andrade
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil

Fabrícia Lopes Pinheiro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Felipe Henrique Monteiro Oliveira
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Fernando Vieira da Cruz
Universidade Estadual de Campinas, Brasil

Gabriella Eldereti Machado
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Germano Ehlert Pollnow
Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Geymeesson Brito da Silva
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Giovanna Ofretorio de Oliveira Martin Franchi
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Handherson Leyltton Costa Damasceno
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Hebert Elias Lobo Sosa
Universidad de Los Andes, Venezuela

Helciclever Barros da Silva Sales
Instituto Nacional de Estudos
e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira, Brasil

Helena Azevedo Paulo de Almeida
Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

Hendy Barbosa Santos
Faculdade de Artes do Paraná, Brasil

Humberto Costa
Universidade Federal do Paraná, Brasil

Igor Alexandre Barcelos Graciano Borges
Universidade de Brasília, Brasil

Inara Antunes Vieira Willerding
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Jaziel Vasconcelos Dorneles
Universidade de Coimbra, Portugal

Jean Carlos Gonçalves
Universidade Federal do Paraná, Brasil

Jocimara Rodrigues de Sousa
Universidade de São Paulo, Brasil

Joelson Alves Onofre
Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil

Jónata Ferreira de Moura
Universidade São Francisco, Brasil

Jorge Eschriqui Vieira Pinto
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil

Jorge Luís de Oliveira Pinto Filho
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

Juliana de Oliveira Vicentini
Universidade de São Paulo, Brasil

Julierme Sebastião Morais Souza
Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

Junior César Ferreira de Castro
Universidade de Brasília, Brasil

Katia Bruginski Mulik
Universidade de São Paulo, Brasil

Laionel Vieira da Silva
Universidade Federal da Paraíba, Brasil

Leonardo Pinheiro Mozdzenski
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Lucila Romano Tragtenberg
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Brasil

Lucimara Rett
Universidade Metodista de São Paulo, Brasil

Manoel Augusto Polastreli Barbosa
Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil

Marcelo Nicomedes dos Reis Silva Filho
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

Marcio Bernardino Sirino
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Marcos Pereira dos Santos
Universidad Internacional Iberoamericana del Mexico, México

Marcos Uzel Pereira da Silva
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Maria Aparecida da Silva Santandel
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

Maria Cristina Giorgi
Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Brasil

Maria Edith Maroca de Avelar
Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

Marina Bezerra da Silva
Instituto Federal do Piauí, Brasil

Mauricio José de Souza Neto
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Michele Marcelo Silva Bortolai
Universidade de São Paulo, Brasil

Mônica Tavares Orsini
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Nara Oliveira Salles
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Neli Maria Mengalli
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Brasil

Patricia Bieging
Universidade de São Paulo, Brasil

Patricia Flavia Mota
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Raul Inácio Busarello
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Raymundo Carlos Machado Ferreira Filho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Roberta Rodrigues Ponciano
Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

Robson Teles Gomes
Universidade Católica de Pernambuco, Brasil

Rodiney Marcelo Braga dos Santos
Universidade Federal de Roraima, Brasil

Rodrigo Amancio de Assis
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil

Rodrigo Sarruge Molina
Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil

Rogério Rauber
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil

Rosane de Fatima Antunes Obregon
Universidade Federal do Maranhão, Brasil

Samuel André Pompeo
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil

Sebastião Silva Soares
Universidade Federal do Tocantins, Brasil

Silmar José Spinardi Franchi
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Simone Alves de Carvalho
Universidade de São Paulo, Brasil

Simoni Urnau Bonfiglio
Universidade Federal da Paraíba, Brasil

Stela Maris Vaucher Farias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Tadeu João Ribeiro Baptista
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

Taíza da Silva Gama
Universidade de São Paulo, Brasil

Tania Micheline Miorando
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Tarcísio Vanzin
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Tascieli Feltrin
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Tayson Ribeiro Teles
Universidade Federal do Acre, Brasil

Thiago Barbosa Soares
Universidade Federal do Tocantins, Brasil

Thiago Camargo Iwamoto
Universidade Estadual de Goiás, Brasil

Thiago Medeiros Barros
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

Tiago Mendes de Oliveira
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil

Vanessa Elisabete Raue Rodrigues
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil

Vania Ribas Ulbricht
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Wellington Furtado Ramos
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

Wellton da Silva de Fatima
Instituto Federal de Alagoas, Brasil

Yan Masetto Nicolai
Universidade Federal de São Carlos, Brasil

PARECERISTAS E REVISORES(AS) POR PARES

Avaliadores e avaliadoras Ad-Hoc

Alessandra Figueiró Thornton
Universidade Luterana do Brasil, Brasil

Alexandre João Appio
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brasil

Bianka de Abreu Severo
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Carlos Eduardo Damian Leite
Universidade de São Paulo, Brasil

Catarina Prestes de Carvalho
Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, Brasil

Elisiene Borges Leal
Universidade Federal do Piauí, Brasil

Elizabete de Paula Pacheco
Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

Elton Simomukay
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil

Francisco Geová Goveia Silva Júnior
Universidade Potiguar, Brasil

Indiamaris Pereira
Universidade do Vale do Itajaí, Brasil

Jacqueline de Castro Rimá
Universidade Federal da Paraíba, Brasil

Lucimar Romeu Fernandes
Instituto Politécnico de Bragança, Brasil

Marcos de Souza Machado
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Michele de Oliveira Sampaio
Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil

Pedro Augusto Paula do Carmo
Universidade Paulista, Brasil

Samara Castro da Silva
Universidade de Caxias do Sul, Brasil

Thais Karina Souza do Nascimento
Instituto de Ciências das Artes, Brasil

Viviane Gil da Silva Oliveira
Universidade Federal do Amazonas, Brasil

Weyber Rodrigues de Souza
Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brasil

William Roslindo Paranhos
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Parecer e revisão por pares

Os textos que compõem esta obra foram submetidos para avaliação do Conselho Editorial da Pimenta Cultural, bem como revisados por pares, sendo indicados para a publicação.

APRESENTAÇÃO DO LIVRO

O presente Livro intitulado "Tópicos Especiais em Biotecnologia Ambiental: 10 Anos do PBA", objetiva apresentar o desenvolvimento do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental (PBA) do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em nível de Mestrado e Doutorado.

Consideramos este Livro uma singela homenagem ao nosso amado Prof. Dr. João Alencar Pamphile, que nos deixou em 17 de março de 2021, e foi dar suas risadas e alegrar em outras "nuvens"! Consideramos o Prof. Pamphile *Hors concours* para o PBA, pois foi graças ao seu empenho que completamos os 10 anos com este Livro.

Além disso, essa publicação objetiva apresentar o desenvolvimento das pesquisas dos docentes e discentes do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental nestes 10 anos. De um Mestrado iniciado em 2013 e um Doutorado com início em 2016. A luta foi árdua, com caminhos tortuosos, mas, o grande labor e esforço do grupo do PBA, permitiu que chegássemos a este compilado. Esta obra representa a pesquisa passada, presente e futura, e o empenho e união deste grupo, em consolidar e agora focar na melhoria da qualificação do programa. De igual importância e relevância estão os docentes do PBA ligados a outros departamentos da UEM e de outras Universidades. E principalmente, agradecemos os discentes do PBA pela dedicação no desenvolvimento de seus trabalhos.

A ideia inicial para a construção deste Livro seria de um compilado dos trabalhos, resultados das pesquisas dos docentes ligados ao PBA. Depois que todos encaminharam os seus capítulos, mostrando empenho e dedicação na redação dos mesmos, verificamos

que este Livro superou as expectativas iniciais. E se tornou um Livro didático para uso na Academia, em nível de Graduação, nas áreas biotecnológicas, biológicas e da saúde, e de Pós-graduação, *Lato* e *Stricto sensu*, e em trabalhos de cunho científico, com conteúdo básico, clássico e de aplicação, exemplificado pela literatura científica relevante e atualizada da área, e pelos trabalhos e artigos desenvolvidos nos laboratórios de pesquisa, usando metodologias atualizadas e de aceitação internacional, dos pesquisadores afetos ao PBA. Portanto, atingimos, além das expectativas, os três pilares que são ensino, pesquisa e extensão, pensando sempre na prevenção, manutenção e preservação da saúde e qualidade de vida de todos os organismos vivos e do meio ambiente.

O presente Livro está dividido de acordo com seus enfoques, em quatro seções, cada uma com dois a cinco capítulos, seguidos pelos seus autores correspondentes segundo as suas expertises em pesquisa.

Na primeira seção de Biotecnologia Ambiental estão apresentados: um breve histórico sobre o processo de construção do PBA; as normas a serem seguidas em relação a biossegurança e bioética no trabalho; e também, a importância das ômicas para a exploração sustentável de recursos ambientais.

Na segunda seção de Biodiversidade, Biocatálise e Biotransformação estão enfocados organismos, vegetal e animal, com destaque para a produção de compostos de interesse biotecnológico a partir de culturas vegetais *in situ* e *in vitro*; e a biotecnologia aplicada à conservação das abelhas.

Na terceira seção de Bioprospecção e Controle Biológico em biotecnologia destacando a prospecção biotecnológica dos microrganismos endofíticos; a biorremediação microbiana, explicando a prospecção enzimática e genética e suas aplicações; os insetos e o desenvolvimento sustentável; e também, a aplicação

de nanomateriais e nanopartículas na biotecnologia; e a química de produtos naturais e prospecção na agricultura, alimentos, saúde e meio ambiente.

Na quarta seção de Mutagênese e Monitoramento Ambiental são tratados os assuntos sobre a toxicogenética na investigação do potencial biotecnológico de compostos aplicados a saúde; a bioprospecção aplicada ao monitoramento ambiental; a prospecção de materiais bioadsorventes para fins de tratamento de efluentes; e sobre a ecogenotoxicidade em peixes e perspectivas para o monitoramento ambiental.

Esperamos que leiam este Livro com a satisfação e a alegria que este compilado, resultado dos 10 anos do PBA, nos proporcionou ao o redigir. E agradecemos a todos que direta ou indiretamente participaram desta realização!

Profa Dra Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental

PREFÁCIO

Vivemos numa era em que todos clamam por um mundo mais seguro e sustentável. Hoje, mais do que nunca, devemos nos perguntar o que realmente pode contribuir para a criação de um futuro que concilie segurança e sustentabilidade. Essa é uma reflexão essencial que precisa ocupar nossas mentes e guiar nossas ações.

Sem dúvida, uma possível resposta para essa questão está centrada no conhecimento científico gerado por pesquisas realizadas nas universidades, por meio do trabalho de professores e técnicos. O avanço da ciência, especialmente em áreas como a biotecnologia ambiental, tem o potencial de fornecer soluções inovadoras e eficazes para os desafios ambientais do século XXI.

Socializar os resultados dessas pesquisas, especificamente na área ambiental, pode desempenhar um papel crucial na formulação, implementação e avaliação de políticas públicas voltadas à proteção do meio ambiente. Isso demanda que o governo, o setor produtivo e a população em geral sejam alertados e tomem ações responsáveis em relação ao planeta, promovendo o desenvolvimento sustentável. Para além do ambiente acadêmico, onde esse conhecimento é inicialmente desenvolvido, é fundamental que suas aplicações cheguem a toda a sociedade.

A biotecnologia ambiental, em particular, concentra-se na aplicação de técnicas biotecnológicas que têm o potencial de enfrentar os grandes desafios ambientais do século XXI. Essa área não apenas promove a preservação dos recursos naturais, como também oferece soluções para a recuperação de ecossistemas degradados, destacando-se como uma importante aliada na busca por um futuro sustentável.

Sabemos que a disseminação dos resultados das pesquisas pode ser facilitada pela virtualidade, especialmente com os avanços tecnológicos que permitem o acesso a informações de maneira rápida e eficaz. No entanto, também é preciso reconhecer que a virtualidade tem seus limites. É nesse contexto que a publicação de livros físicos mantém seu valor. Com essa perspectiva, os organizadores disponibilizam esta obra de forma didática e aprofundada, compartilhando o desenvolvimento das pesquisas realizadas por docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental (PBA) nos últimos dez anos.

O lançamento do livro "Tópicos Especiais em Biotecnologia Ambiental: 10 anos do PBA" não apenas celebra os dez anos do Programa, mas também torna acessível a produção científica nele desenvolvida. Ao compilar essas pesquisas, a obra contribui para uma sociedade mais bem informada e consciente, permitindo que o conhecimento gerado nas universidades seja utilizado em prol do bem comum.

Deixo aqui meus cumprimentos aos professores, alunos e ex-alunos do PBA, bem como a todos que contribuíram para o sucesso do Programa ao longo desses dez anos. Recomendo fortemente a leitura e o estudo desta obra, que certamente proporcionará uma base sólida em biotecnologia ambiental e incentivará a criatividade e o desenvolvimento de novos trabalhos científicos. É através dessa contínua troca de conhecimentos e descobertas que o progresso científico se dá.

Por fim, destaco que este material é indispensável na estante de todos aqueles que se preocupam com o meio ambiente e com o avanço da biotecnologia ambiental, pois ele oferece uma visão valiosa sobre o estado atual das pesquisas e os caminhos futuros para a sustentabilidade.

Prof Dr Décio Sperandio
Ex-Reitor da Universidade Estadual de Maringá
(1990 – 1994 e 2006 – 2010)

SUMÁRIO

PARTE 1

BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL 17

CAPÍTULO 1.1

Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Ana Luiza de Brito Portela Castro
Claudete Aparecida Mangolim
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
João Lúcio de Azevedo

Introdução ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Ambiental: um breve histórico 18

CAPÍTULO 1.2

Eliane Papa Ambrosio Albuquerque
Esperança Edna Alexandre Chibite
Igor Vivian de Almeida
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Biossegurança e bioética em biotecnologia ambiental 28

CAPÍTULO 1.3

Eliane Papa Ambrosio Albuquerque
Adrieli Rodrigues da Costa Nunes
Alessandra Valéria de Oliveira

Ômicas e sua importância para a exploração sustentável de recursos ambientais 58

PARTE 2

BIODIVERSIDADE, BIOCATÁLISE
E BIOTRANSFORMAÇÃO..... 83

CAPÍTULO 2.1

Maria de Fátima Pires da Silva Machado
Arildo José Braz de Oliveira
Jesieli Beraldo Borrazzo
Claudete Aparecida Mangolim

Produção de compostos de interesse biotecnológico a partir de culturas vegetais *in situ* e *in vitro* 84

CAPÍTULO 2.2

Daiani Rodrigues Moreira
Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli
Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki

Biotecnologia aplicada à conservação das abelhas..... 120

PARTE 3

BIOPROSPECÇÃO
E CONTROLE BIOLÓGICO 158

CAPÍTULO 3.1

Julio Cesar Polonio
João Arthur dos Santos Oliveira
Andressa Domingos Polli
João Alencar Pamphile (in memoriam)
João Lúcio de Azevedo

Prospecção biotecnológica de microrganismos endofíticos 159

CAPÍTULO 3.2

Luis Felipe Oliva dos Santos
Josiane Rodrigues Rocha da Silva
Julio Cesar Polonio
Rosane Marina Peralta

Biorremediação microbiana:
prospecção enzimática e genética e suas aplicações..... 208

CAPÍTULO **3.3**

Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli
Bruno Vinícius Daquila
Helio Conte

Biotecnologia de insetos e o desenvolvimento sustentável 239

CAPÍTULO **3.4**

Andressa Domingos Polli
Elisa Parcero Hernandes
Luiz Fernando Cótica

Desenvolvimento e aplicação de nanomateriais e nanopartículas na biotecnologia 295

CAPÍTULO **3.5**

Layon Zafra Lemos
Arildo José Braz de Oliveira
Eduardo César Meurer
Raquel Guttierres Gomes

Biotecnologia e química de produtos naturais e prospecção na agricultura, alimentos, saúde e meio ambiente 330

PARTE **4**

MUTAGÊNESE E MONITORAMENTO AMBIENTAL..... 369

CAPÍTULO **4.1**

Igor Vivian de Almeida
Mariane Aparecida Franco de Godoy
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Toxicogenética na investigação do potencial biotecnológico de compostos aplicados à saúde 370

CAPÍTULO **4.2**

Michele Cristina Heck
Julio Cesar Polonio
Débora Elisa Antunes de Mendonça
Mariane Aparecida Franco de Godoy
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Monitoramento ambiental e bioprospecção 412

CAPÍTULO **4.3**

Anna Carla Ribeiro
Mariana Fernandes Rocha
Rosângela Bergamasco
Raquel Guttierres Gomes

Prospecção de materiais bioadsorventes para fins de tratamento de efluentes 460

CAPÍTULO **4.4**

Ana Luiza de Brito Portela Castro
Carlos Alexandre Fernandes
Diane Marques Magnoni
Michele Cristina Heck
Luciana Andréia Borin de Carvalho

Ecogenotoxicidade em peixes e perspectivas para o monitoramento ambiental..... 499

Apresentação dos autores do livro – docentes do PBA 545

Apresentação dos demais autores do livro 550

Parte 1

BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

1.1

Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Ana Luiza de Brito Portela Castro
Claudete Aparecida Mangolim
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
João Lúcio de Azevedo

INTRODUÇÃO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL:

UM BREVE HISTÓRICO

SUMÁRIO

Este capitulo tem por objetivo fazer um relato breve sobre a história do surgimento da área de Biotecnologia como base para um novo caminho a ser percorrido pelos docentes do DBC, empenhados nesta nova jornada.

Este caminho foi longo, iniciando em 2003, completando 20 anos, com cursos de Especialização, Graduação, Mestrado e Doutorado, o penúltimo com 10 anos.

Com o desenvolvimento dos cursos de Biotecnologia do DBC da UEM, iniciando na Especialização, passando pela Graduação e chegando ao Mestrado e Doutorado, nos deu um embasamento para continuarmos com o Ensino, Pesquisa e Extensão nesta área.

Estes Cursos foram capitaneados pelo Departamento de Biologia Celular e Genética, que em 07 de maio de 2012 (Resolução 005/2012-COU) passou a se chamar Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC), mostrando a condução deste departamento para a área de trabalho em Biotecnologia.

Este objetivo Biotecnológico partiu, em princípio, dos "sonhos" e ideais do Prof. Dr. João Alencar Pamphile, e que encantou e envolveu grande parte de docentes do DBC. E com isso fomos abrindo as portas apresentando, discutindo e defendendo o Projeto em todas as instâncias. E formamos um grupo (membros da Comissão listados acima) com muita garra e disposição para a concretização do Projeto, que foi aumentando com o passar do tempo e realizações. Para o sucesso desta jornada e no trilhar deste caminho tivemos a presença de duas figuras importantes, o Prof. Dr. João Lucio de Azevedo, orientador do Prof. Pamphile, pesquisador de renome nesta área, e o Prof. Dr. Décio Sperandio, Reitor da UEM, que trouxe a ajuda da própria administração e da SETI. E com a ajuda e empenho de todos fomos ultrapassando as barreiras e concretizando os nossos ideais, e agora comemorando os 10 anos do PBA!

Iniciamos os nossos trabalhos considerando os **Objetivos** dos cursos de Biotecnologia:

- Formar recursos humanos qualificados capazes de gerar e disseminar conhecimentos científicos e tecnológicos voltados à Biotecnologia, com uma visão integrada das perspectivas socioambientais e econômicas;
- Preparar profissionais multidisciplinares para atuarem em pesquisas biotecnológicas e no desenvolvimento de experimentos ou fabricação de produtos, abrangendo áreas da biologia celular e molecular, genética, mutagênese, bioinformática, diagnósticos moleculares em saúde, agropecuária e meio ambiente;
- Promover a qualificação de profissionais no uso de organismos para a produção de compostos e processos de interesse industrial com o uso racional do ambiente e conservação do mesmo;
- Incentivar o desenvolvimento de tecnologias para a preservação, conservação, monitoramento e tratamento do ambiente.

Considerando sempre, o respeito às características inerentes aos seres vivos e ao meio ambiente, preservando a saúde dos organismos, e a qualidade, segurança e manutenção da vida, seguindo os preceitos da ética e do direito.

No cumprimento destes objetivos relatamos de forma resumida o **Histórico** da Biotecnologia, dos cursos ofertados nesta área e os períodos, bem como o número de turmas até 2023, no DBC/UEM:

- 2004: Especialização em Biotecnologia com Ênfase em Meio Ambiente e Saúde
- 2005: Especialização em Biotecnologia com Ênfase em Agroindústria

- 2006: Especialização em Biotecnologia Aplicada a Agroindústria
- 2010: Especialização em Biotecnologia (07 TURMAS)
- 2011: Especialização em Biotecnologia e Bioprocessos – EAD (05 TURMAS)
- 2011: Especialização em Biotecnologia - EAD (10 TURMAS)
- 2011: Graduação - Tecnologia em Biotecnologia
- 2013: PPG - Mestrado em Biotecnologia Ambiental - PBA
- 2016: PPG - Doutorado em Biotecnologia Ambiental - PBA
- 2020: Graduação - Bacharelado em Biotecnologia

Após a implantação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental – PBA alguns **Paralelos Iniciais** foram traçados.

Objetivos do PBA:

Preparar profissionais com sólida formação científica e tecnológica, capacitados para desenvolver atividades em projetos de desenvolvimento industrial, pesquisa, docência de nível superior e em pós-graduação em Biotecnologia, com ênfase na área ambiental, considerando suas áreas embasadoras de genética, biologia molecular e bioprocessos.

Estrutura **Inicial** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, em seu início, com suas Linhas de Pesquisa e Número de Docentes:

Mutagênese e Monitoramento Ambiental (04 docentes):

- Estudo dos efeitos dos poluentes ambientais sobre os organismos vivos, como a presença de resíduos em alimentos, no ar, solo e água, abordando os princípios básicos de toxicologia e mutagênese e também, indicando um caminho para a restauração ambiental e a prevenção de contaminação.

- Uso de sistemas-teste e parâmetros de análise da mutagenicidade de diferentes agentes químicos, biológicos e físicos ambientais e também, de componentes da dieta que possam atuar como antioxidantes e quimiopreventivos.

- Processos de monitoramento da qualidade da água e seu tratamento. Monitoramento da diversidade de espécies de peixes em rios impactados ou lagoas de inundação de usinas hidrelétricas.

Biodiversidade, Biocatálise e Biotransformação (08 docentes):

- Estudo da biodiversidade empregando ferramentas da genética, genômica, biologia molecular, biologia celular e bioinformática, como embasadores de estudos aplicados que visem a biocatálise e biotransformação, ou seja, o uso de plantas ou microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico e da biotransformação de substâncias isoladas de plantas utilizando microrganismos ou enzimas isoladas/imobilizadas.

Bioprospecção e Controle Biológico (06 docentes):

- Prospecção de microrganismos ou plantas, produtores de compostos bioativos ou metabólitos secundários, de interesse biotecnológico no controle de pragas agrícolas ou no controle de organismos causadores de doenças nos seres humanos.

- Estudo e prospecção de microrganismos e animais (insetos) controladores de pragas da agricultura. Estudo da interação praga-controlador natural.

- Prospecção de microrganismos degradadores/biorremediadores de herbicidas ou outros xenobióticos.

Passados **10 anos** - Estrutura **Atual** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, com Linhas de Pesquisa e corpo Docente de professores doutores:

MUTAGÊNESE E MONITORAMENTO AMBIENTAL

- Investigação ecogenotoxicológica para o monitoramento ambiental e a formulação de estratégias de mitigação dos impactos de agentes poluentes, e avaliação da atividade mutagênica, antimutagênica e radioprotetora de produtos naturais, sintéticos e moléculas bioativas, em modelos *in vivo* e *in vitro*.
  - Veronica Elisa Pimenta Vicentini (UEM/ Coordenadora)
  - Daisy Maria Fávero Salvadori (UNESP - Botucatu)
  - Igor Vivian de Almeida (UFRA - PA)
- Utilização de produtos biológicos para fins de tratamento e obtenção de água potável e para a despoluição.
  - Raquel Guttierres Gomes
  - Rosângela Bergamasco
- Citogenética e Mutagênese em Peixes atuando nos seguintes temas: evolução cariotípica, citogenética e genética molecular e citotaxonomia para estimativa da biodiversidade; estudos de genotoxicidade (*in vivo*) e citotoxicidade em peixes no biomonitoramento ambiental.
  - Ana Luiza de Brito Portela Castro
  - Luciana Andréia Borin de Carvalho
  - Carlos Alexandre Fernandes

BIODIVERSIDADE, BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO

- Exploração genômica de várias espécies vegetais, incluindo cactáceas, e cultivo de células vegetais para aplicação biotecnológica.
  - Claudete Aparecida Mangolim
  - Maria de Fátima Pires da Silva Machado
- Exploração de produtos naturais e sintéticos para fins farmacêuticos, e caracterização e produção destes compostos.
  - Arildo José Braz de Oliveira
- Obtenção de cultivares transgênicas e estudos genômicos de vegetais.
  - Alexandre Lima Nepomuceno (Embrapa-soja)
- Estudos genéticos e zootécnicos de insetos, principalmente abelhas (nativas ou não), e insetos de interesse agrícola.
  - Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki
  - Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
- Estudos de diversidade e caracterização molecular de populações naturais.
  - Alessandra Valéria de Oliveira

BIOPROSPECÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO

- Desenvolvimento de nanomateriais e nanopartículas e sua aplicação nas áreas da Física, Ciências Biológicas e Biotecnologia.
  - Luiz Fernando Cótica

- Identificação, seleção e avaliação de controladores biológicos de insetos utilizando análises morfo-histopatológicas e ultraestruturais.
  - Helio Conte
- Seleção de bactérias com potencial biorremediador de pesticidas agrícolas, e mecanismos de degradação e estresse oxidativo.
  - Marcos Pileggi (UEPG)
- Bioprospecção e caracterização química de produtos naturais de interesse na agricultura, saúde e meio ambiente.
  - Eduardo Cesar Meurer (UFPR - Jandaia do Sul)
- Bioprospecção de compostos bioativos de microrganismos endofíticos, e avaliação do potencial biotecnológico na agricultura e na saúde.
  - João Alencar Pamphile *In memoriam*
  - João Lúcio de Azevedo (USP/ESALQ Piracicaba)
  - Julio Cesar Polonio
  - Spartaco Astolfi Filho (UFAM AM)
- Bioprospecção de microrganismos, com ênfase em basidiomicetos, como produtores de enzimas, e de seus compostos bioativos com potencial biotecnológico na agricultura, saúde e ambiente.
  - Rosane Marina Peralta

Registramos aqui o **Número de Acadêmicos** com grau em Biotecnologia Ambiental (Pós-graduação *Stricto-sensu*), até 2023:

- Mestrado – 74 (1ª Defesa em 2015) e Doutorado – 23 (1ª Defesa em 2019).
- Estágio Pós-doutoral – 09 doutores.

Do ano de 2004 a 2023 ocorreu a formação de cerca de 170 Especialistas em Biotecnologia (Pós-graduação *Lato-sensu*).

Abrimos aqui um destaque para a Secretária do PBA, Esp. Edenir Ferreira Policiano Antonio, pois a mesma cuida da nossa retaguarda e faz com que a estrutura administrativa do programa ocorra de forma segura e competente, desde o início e até o momento presente.

Nestes 10 anos de PBA tivemos uma história de sucesso, mas temos muitas metas a serem transpostas e objetivos a serem alcançados, além de desafios a serem superados para conseguirmos os resultados almejados.

Desafios:

✓ Ampliar algumas Ações como: "o PBA possui, mas ainda em pequeno número, ações importantes na formação dos alunos voltadas para o empreendedorismo, criação de *startups*, e inserção de egressos em empresas";

✓ Expandir as Parcerias: "o PBA tem parcerias entre docentes e o setor privado como a Forquímica Agrociência Ltda., Purific, Industria Missiato de Bebidas (Jamel)";

✓ Planejar o desenvolvimento de Patentes: "o PBA tem 15 patentes no total, concedidas e em andamento, sendo 3 com participação de discentes e egressos, e sendo 7 com participação de docentes";

✓ Desenvolver Programas e Processos ligados ao desenvolvimento Biotecnológico;

✓ Desenvolver Produtos ligados com as diferentes Áreas e Linhas de Pesquisa do PBA;

✓ Concorrer a Editais objetivando o aumento de verbas de financiamento para o desenvolvimento de Projetos de Pesquisa e de bolsas de Mestrado, Doutorado, Pós-doutorado, e de Professor Visitante, para o reforço da área do Programa.

Agradecemos e dedicamos
Aos Docentes,
Aos Acadêmicos,
Aos Funcionários,
Pela União na Luta para alcançarmos
um Objetivo comum...
Os 10 Anos do PBA!
E vamos em frente para mais 10...

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo financiamento da presente obra. E também pelos financiamentos e bolsas recebidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos financiamentos e auxílios recebidos.

À Fundação Araucária Paraná pelos financiamentos e auxílios recebidos.

À Universidade Estadual de Maringá por todo apoio.

1.2

Eliane Papa Ambrosio Albuquerque
Esperança Edna Alexandre Chibite
Igor Vivian de Almeida
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

BIOSSEGURANÇA E BIOÉTICA EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um campo de conhecimento multidisciplinar, cujo objetivo principal é desenvolver bioprocessos e bioprodutos por meio do uso de materiais biológicos. Faz parte da história natural do homem adaptar o meio em que vive. Há milhares de anos, o mesmo aprendeu a domesticar, selecionar, cruzar animais e plantas e a utilizar microrganismos para a sua sobrevivência, como na fabricação de alimentos e roupas. A biotecnologia atual levanta questões que, para muitos, são inéditas, tais como segurança biológica e a transmutação dos valores morais e éticos. A biossegurança o faz quantificando e ponderando riscos e benefícios, ao passo que a bioética analisa os argumentos racionais que justificam ou não tais riscos.

A interface entre biossegurança e bioética pode ser visualizada quando, por exemplo, ambos saberes se referem a alguma forma de controle das práticas de biotecnologias, devido a uma real ou suposta periculosidade, presente ou futura, de seus processos e produtos. Se, por um lado, a biossegurança preocupa-se com a legitimidade, a bioética preocupa-se com a justificação normativa.

O surgimento de novas tecnologias, como ocorreu ao longo do tempo com as diferentes metodologias de sequenciamento, uso de bancos de dados, construção de organismos geneticamente modificados (OGM), métodos de edição gênica, etc., pode levar ao surgimento de novos riscos ocupacionais. É fato que todo progresso traz mudanças e influencia a sociedade de maneira geral, além de gerar conflitos acadêmico-científicos, éticos, religiosos, econômicos, entre outros. O desenvolvimento biotecnológico pode tanto ser uma fonte de benefícios, como pode estar repleto de riscos, implicando desta forma, a necessidade de se conhecer amplamente as questões que envolvem a biossegurança atrelada a essas tecnologias.

O objetivo primordial do conceito de biossegurança e sua aplicação é equipar os profissionais e as instituições com ferramentas para conduzir atividades com um nível adequado de segurança, tanto para os profissionais, pesquisadores e trabalhadores, quanto para o meio ambiente e a comunidade em geral. Nesse contexto, a biossegurança pode ser definida como a condição de segurança alcançada por meio de um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar os perigos inerentes às atividades que possam colocar em risco a saúde humana, animal, vegetal e o meio ambiente. Para tanto, um conjunto de leis e normativas são estabelecidas na regulamentação de pesquisas e processos biotecnológicos.

Levando-se em conta que o perigo é fonte tanto de riscos como de incertezas, é preciso compreender a diferença entre eles: risco é quando não se sabe exatamente o que irá acontecer, mas se conhece as chances do que irá acontecer, porque existe conhecimento disponível. Neste caso as chances são subjetivas, pois pode não acontecer, e incerteza, é quando não se conhece nem mesmo as chances do que pode acontecer, porque não se tem conhecimento disponível. O advento da biotecnologia como área de inovação representa um grande potencial e, ao mesmo tempo, um grande desafio para os governos e as agências reguladoras mundiais, porque os novos produtos e processos gerados por essa tecnologia, também, podem favorecer o aparecimento de novos riscos.

Além dos riscos e dilemas conhecidos, a bioética parte dos saberes da própria ética filosófica, aplicando os conceitos às situações que vão sendo construídas. Sua abrangência foi sendo ampliada à medida que os seus problemas relacionados ao desenvolvimento tecnológico e biotecnológico foram surgindo, razão pela qual ela se apresenta como um espaço de reflexão e de ação interdisciplinar, que envolve obrigatoriamente a noção de complexidade frente aos avanços biotecnológicos, e o limite muitas vezes não é mais técnico e sim, ético, como a inserção de OGM na alimentação e edição de embriões para modificação de características.

Neste capítulo, serão apresentados conceitos e aplicações de biossegurança e bioética no contexto da biotecnologia.

2. BIOSSEGURANÇA APLICADA À BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Biossegurança refere-se à condição a ser alcançada por meio de um conjunto de ações e medidas destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar os riscos associados às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços. Tais medidas visam proteger tanto a saúde humana quanto o meio ambiente, além de assegurar a qualidade das atividades realizadas. Os procedimentos adotados em laboratórios ou durante a condução de experimentos devem ser cuidadosamente planejados, orientados e executados de acordo com as normas de biossegurança, respeitando os princípios da bioética no tratamento com os indivíduos e os direitos dos organismos (biodireito). É fundamental que todo o pessoal envolvido nessas atividades possua conhecimento técnico adequado e receba treinamento apropriado para minimizar os riscos inerentes aos procedimentos realizados. Portanto, é essencial a aplicação das diretrizes de biossegurança e a estrita conformidade com as normas, regulamentações e legislações vigentes.

2.1 EVOLUÇÃO HISTÓRICA DO CONCEITO DE BIOSSEGURANÇA

A biossegurança é um processo progressivo, que vem evoluindo com o tempo, pois não inclui conclusão em sua terminologia e deve ser sempre atualizado e supervisionado, face às exigências de respostas imediatas ao surgimento de novas tecnologias, produtos e processos. Preocupações sobre biossegurança datam de 1862,

com os experimentos de Pasteur, o que mais tarde levou ao desenvolvimento de protocolos de segurança para contenção de microrganismos. Mas, o conceito de biossegurança só começou a ser mais fortemente construído na década de 1970, com o surgimento da engenharia genética, por meio da transferência e expressão do gene da insulina humana para a bactéria *Escherichia coli*. Este feito provocou forte reação da comunidade científica mundial, o que culminou com a realização da Conferência de Asilomar, na Califórnia, em 1974, onde questões sobre riscos das técnicas de engenharia genética e segurança dos espaços laboratoriais estiveram no centro das abordagens, abrindo espaço para a construção do conceito de biossegurança. Adicionalmente, foram elaboradas novas normas de biossegurança do *National Institute of Health* (NIH), dos Estados Unidos, o que estimulou a necessidade da criação de legislações específicas para a regulação das atividades que utilizavam a engenharia genética, pela comunidade internacional.

Em 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) trouxe o primeiro conceito de biossegurança, incluindo as práticas de prevenção de riscos em ambientes laboratoriais que utilizam agentes biológicos patogênicos, além da classificação dos riscos, buscando a preservação da saúde do profissional em qualquer atividade que este realiza. Assim, o conceito de biossegurança, ao longo do tempo, foi sendo ampliado, com a inclusão de aspectos como ética em pesquisa, e a preservação da biodiversidade e do meio ambiente. A biossegurança pode ser definida como a condição a ser alcançada por um conjunto de ações e medidas que buscam prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes as atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e de prestação de serviços, que possam comprometer a saúde e o meio ambiente, ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

Como descrito, a história da biossegurança teve seu início em pesquisas envolvendo laboratórios e engenharia genética, e esta ganha força à medida que esses elementos transcendem os

espaços fechados (laboratórios) e passam a impactar a sociedade. Recentemente, a pandemia da COVID-19 ressaltou bastante a importância da implementação das medidas de biossegurança na garantia de saúde e bem-estar individual e coletivo da população. Assim, é notório que os maiores fatores para estimular as práticas de biossegurança são o medo de infecções e de acidentes que podem ser causados pelos diferentes perigos, e a divulgação dos riscos e procedimentos para se evitar ou minimizar os efeitos adversos associados a eles. No entanto, 'falar' de biossegurança é um processo funcional e operacional de fundamental importância para a preservação da vida e do meio ambiente.

2.2 LEI DE BIOSSEGURANÇA

A história da institucionalização da biossegurança no Brasil remonta à década de 1980, quando o país participou do Programa de Treinamento Internacional em Biossegurança, conduzido pela Organização Mundial da Saúde. Em 1985, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) organizou o primeiro curso nacional de biossegurança e começou a implementar medidas de segurança como parte integrante das Boas Práticas em Laboratórios. Uma década mais tarde, em um marco significativo, foi promulgada a primeira lei de biossegurança, a Lei N° 8.974, de 5 de janeiro de 1995. Contudo, essa lei entrava em conflito com a legislação ambiental vigente, criando uma incerteza jurídica que desencorajava a pesquisa e o avanço da biotecnologia no país. Posteriormente, esta lei foi substituída pela Lei N° 11.105, de 24 de março de 2005, que continua em vigor até a presente data. A atual 'Lei de Biossegurança' trouxe harmonia ao ambiente institucional e hoje é amplamente reconhecida internacionalmente como uma das mais abrangentes e rigorosas do mundo.

Em seu artigo primeiro, a Lei de Biossegurança estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência,

a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de OGMs e seus derivados. Além disso, regulamenta as tecnologias envolvendo a manipulação de DNA/RNA, natural e/ou recombinante, clonagem e pesquisas envolvendo embriões e células-tronco humanas. Tais diretrizes visam o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.

2.3 RISCO EM AMBIENTES DE TRABALHO

Pela natureza da atividade desenvolvida, o trabalhador pode estar sujeito a diferentes tipos de **riscos**, seja pela execução da sua tarefa, pela exposição a agentes químicos, físicos ou biológicos, pelas relações interpessoais do ambiente de trabalho, por situações de deficiência ergonômica ou por riscos de acidentes. Em se tratando do trabalho em laboratórios de pesquisa e/ou em biotecnologia, muitos desses riscos podem ser potencializados. Desta forma, é imprescindível conhecer o ambiente laboral na atividade exercida. O Ministério do Trabalho e Emprego do Brasil, por meio das Normas Regulamentadoras NR-9, NR-12, NR-32 e da Portaria N° 25, de 29 de dezembro de 1994, classifica os riscos ocupacionais em cinco tipos: Físico, Químico, Biológico, Ergonômico e de Acidente. Cada um deles é representado por uma cor ao se elaborar o mapa de risco da empresa/instituição, facilitando a sinalização para a segurança do profissional.

Risco Físico: corresponde às diversas formas de energia que os profissionais estão expostos, podendo ser originadas de equipamentos ou de outras fontes. São os ruídos, vibrações, temperaturas extremas, radiações ionizantes e não ionizantes, ultrassom, e materiais cortantes e pontiagudos que possam ferir o operador. Esses riscos são sinalizados pela cor verde.

Risco Químico: corresponde aos riscos associados às substâncias, compostos ou qualquer produto nas formas de gases, vapores, poeiras, fumaças, fumos, névoas ou neblinas, que possam penetrar no organismo por diferentes vias e que podem prejudicar a saúde e a integridade do trabalhador. Esses riscos são sinalizados pela cor vermelha.

Risco Biológico: compreende todos os organismos e materiais biológicos infectados que possuem a capacidade de produzir efeitos nocivos ao ser humano. Esse risco abrange a manipulação dos agentes e materiais biológicos. São considerados agentes biológicos: vírus, bactérias, fungos, parasitas, príons, OGMs, animais peçonhentos, além das amostras biológicas provenientes das plantas, dos animais e dos seres humanos (sangue, urina, fezes, tecidos, entre outras). Esses riscos são sinalizados pela cor marrom.

Risco Ergonômico: são riscos associados à realização de tarefas que possam envolver esforço físico intenso ou ainda utilizar mobiliário inadequado, ou qualquer outro fator que possa interferir nas características psicofisiológicas do profissional, causando desconforto ou até mesmo, afetar a sua saúde. Esses riscos são sinalizados pela cor amarela.

Risco de Acidente: qualquer fator relacionado a situações de perigo que possam afetar a integridade e o bem-estar físico e moral do profissional. São exemplos de riscos de acidentes: uso de equipamentos sem proteção adequada, armazenamento ou descarte impróprio de substâncias químicas, iluminação inadequada, instalações elétricas com fios expostos ou com sobrecarga, risco de incêndio e explosão, dentre outros. Esses riscos são sinalizados pela cor azul.

Vale ressaltar também que existe um outro tipo de risco que só começou a ser percebido e debatido recentemente, classificado como **risco psicossocial**. Esse risco consiste nos problemas causados pela exigência de resultados, pressão para cumprir prazos e

o estresse associado, sendo essas situações bastante comuns em laboratórios de pesquisa acadêmica. Os riscos psicossociais se refletem, principalmente, em danos à saúde mental do trabalhador, como angústia, agressividade, ansiedade e depressão, mas que também podem ser refletidos em sintomas físicos como cansaço, irritabilidade, dificuldade de concentração e distúrbios do sono. Os laboratórios de pesquisa seguem cronogramas eventualmente pouco flexíveis, sendo que qualquer atraso na realização das atividades pode resultar em maior intensidade do trabalho e aumento do estresse. Apesar de estar mais relacionado aos aspectos pessoais (personalidade) e as relações de poder e hierarquia dentro do laboratório, os riscos psicossociais podem trazer consequências graves à integridade do pesquisador e da pesquisa e não podem ser negligenciados.

2.4 CONTENÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS

Os agentes biológicos que representam riscos à saúde dos seres humanos, animais e plantas são classificados em diferentes **Classes de Risco Biológico**, considerando critérios como a severidade da infecção, sua capacidade de disseminação no ambiente, a disponibilidade de medidas profiláticas (como vacinas) e a existência de tratamentos eficazes. Os agentes biológicos estão assim distribuídos em quatro classes de risco:

Classe de risco 1 (baixo risco individual e para a comunidade): inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças no homem ou nos animais adultos sadios. Exemplo: *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, bifidobactérias e fungos comestíveis. Nessa classe, também estão incluídos os OGMs que contenham sequências de DNA/RNA que não causem agravos à saúde humana e animal e/ou efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplo: linhagens enteropatogênicas de *Escherichia coli*, *Tenia*, *Toxocara*, vírus da hepatite e do herpes, além de OGM cuja sequência de DNA/RNA inserido apresenta moderado risco de agravo à saúde humana e animal, com baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos nos vegetais e no meio ambiente.

Classe de risco 3 (alto risco individual e moderado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que podem ser transmitidos por via respiratória e que causam patologias humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplo: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da febre amarela, bem como os OGMs que contenham sequências de DNA/RNA, com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo ou moderado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Classe de risco 4 (alto risco individual e para a comunidade): inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento, não há nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra infecções ocasionadas por estes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Exemplo: vírus Ebola, vírus Lassa e OGMs que contenham sequências de DNA/RNA com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenham elevado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Por sua vez, o conceito de **Nível de Biossegurança** diz respeito ao grau de contenção requerido para conduzir de maneira segura trabalhos envolvendo sistemas biológicos, visando proteger seres humanos, animais e o ambiente. Esse conceito compreende um conjunto de boas práticas laboratoriais, técnicas apropriadas, equipamentos de segurança e infraestrutura. Os Níveis de Biossegurança são classificados em quatro categorias, cada uma indicando um aumento progressivo no grau de contenção e na complexidade das medidas de proteção:

Nível de Biossegurança 1 (NB-1): é o nível de contenção laboratorial que se aplica aos laboratórios de ensino básico, onde são manipulados os microrganismos pertencentes à classe de risco 1. Com um bom planejamento espacial e funcional e a adoção de boas práticas laboratoriais, não requer maiores complexidades estruturais.

Nível de Biossegurança 2 (NB-2): diz respeito ao laboratório em contenção, onde são manipulados microrganismos da classe de risco 2. Se aplica aos laboratórios clínicos ou hospitalares de níveis primários de diagnóstico, sendo necessário, além da adoção das boas práticas, o uso de barreiras físicas primárias (cabine de segurança biológica e equipamentos de proteção individual) e secundárias (estrutura física e organização do laboratório).

Nível de Biossegurança 3 (NB-3): é destinado ao trabalho com microrganismos da classe de risco 3 ou para manipulação de grandes volumes e altas concentrações de microrganismos da classe de risco 2. Para este nível de contenção são requeridos além dos itens referidos no nível 2, desenho e construção laboratoriais especiais. Deve ser mantido controle rígido quanto a operação, inspeção e manutenção das instalações e equipamentos e o pessoal técnico deve receber treinamento específico sobre procedimentos de segurança para a manipulação destes microrganismos.

Nível de Biossegurança 4 (NB-4): é um laboratório de contenção máxima destinado a manipulação de microrganismos da classe de risco 4, onde há o mais alto nível de contenção, além de representar uma unidade geográfica e funcionalmente independente de outras áreas. Esses laboratórios requerem, além dos requisitos físicos e operacionais dos níveis de contenção 1, 2 e 3, barreiras de contenção (instalações, desenho, equipamentos de proteção) e procedimentos especiais de segurança.

Os equipamentos de proteção, sejam individuais ou coletivos, são fundamentais para a realização das atividades em segurança, além de ser um atendimento à legislação. Deste modo, é definido como **Equipamento de Proteção Individual (EPI)** todo dispositivo ou produto, de uso individual, utilizado pelo trabalhador, destinado à proteção contra riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde deste no ambiente de trabalho (Norma Regulamentadora 6 da Portaria 3.214 do Ministério do Trabalho e Previdência). Os principais EPIs fornecem proteção auditiva (protetores auriculares, abafadores de ruídos), proteção de olhos e face (óculos, *face shield*), proteção da cabeça (capacete, touca para cabelos), proteção respiratória (máscaras e respiradores, acoplados ou não à cartuchos especiais para poeiras, vapores, fumos, névoas e radionuclídeos), proteção das mãos (luvas, luvas de procedimentos, luvas para manipulação de materiais quentes ou frios), proteção dos pés (sapatos, botas, propé), proteção de tronco e corpo inteiro (avental, jaleco, guarda-pó, macacão), e radioproteção (aventais plumbíferos, óculos de vidro, protetor de tireoide, protetor de gônadas, dosímetros individuais).

Outrossim, é definido como **Equipamento de Proteção Coletiva (EPC)** todo dispositivo de uso coletivo, destinado a proteger a integridade dos trabalhadores no exercício de suas funções. É importante que esses equipamentos sejam instalados em locais bem sinalizados e de fácil acesso para uso e manutenção. O uso dos EPCs é mencionado nas Normas Regulamentadoras NR-4 e NR-9 do Ministério do Trabalho e Previdência. São exemplos de EPCs:

cabines de segurança biológica, cujas especificidade e complexidade aumentam de acordo com a classe de risco do material manipulado; capelas de exaustão ou cabines de segurança química, para a manipulação de substâncias que liberam gases tóxicos, irritantes, corrosivos e vapores; chuveiro de emergência e lava olhos, em se tratando de derramamento ou respingos de material sobre o profissional; autoclaves, para a descontaminação de material; além de extintores de incêndios.

A utilização de forma correta dos EPIs e EPCs traz benefícios a todos, pois eles promovem a saúde e segurança do colaborador, evitando doenças ocupacionais, acidentes e até mesmo óbitos, e também, resguardam a empresa do ponto de vista legal. Todos os cuidados e atenção em relação à saúde e segurança devem ser tomados de forma prioritária. Os colaboradores devem ser treinados para a utilização dos EPIs e EPCs e a participação no treinamento deve ser registrada.

2.5 BIOSSEGURANÇA EM BIOTÉRIOS

No Brasil, em 2008, foi aprovada a Lei Nº 11.794, também conhecida como 'Lei Arouca'. Essa lei regulamenta o uso científico de animais no país e estabelece normas para garantir o bem-estar dos animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa científica. A lei recebeu esse nome em homenagem ao médico e sanitarista Sérgio Arouca, que foi um grande defensor dos direitos dos animais e da ética na pesquisa científica. Como principais destaques, a lei institui o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a composição da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nas instituições que realizam atividades de ensino e pesquisa científica com animais, bem como o estabelecimento de normas para o uso de animais em atividades de pesquisa e ensino, dentre outras providências.

Conforme publicado no portal do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, compete ao CONCEA: formular normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica; credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica; monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa; estabelecer normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, as condições de trabalho em tais instalações e a administração do cadastro de protocolos experimentais ou pedagógicos.

De acordo com a Resolução Normativa N° 30 do CONCEA, de 2 de fevereiro de 2016, **biotério** é a instalação na qual são produzidos, mantidos ou utilizados animais para atividades de ensino ou de pesquisa científica. A instalação deve possuir infraestrutura adequada para atender aos requisitos ambientais, sanitários e de bem-estar animal para a espécie utilizada. São exemplos: instalações de roedores e lagomorfos, fazendas experimentais, canil, pocilga, baia, piquete, curral, galpão, granja, tanque para peixes, entre outros, sendo classificados em três tipos:

Instalações de produção: aquelas que oferecem ambientes e condições adequadas necessárias à manutenção do bem-estar animal, compatíveis com as atividades a serem desenvolvidas na reprodução e criação de espécies animais para fins de ensino ou de pesquisa científica;

Instalações de manutenção: as quais oferecem ambientes e condições adequadas necessárias para a manutenção do bem-estar animal, desde a sua saída da instalação de produção até o momento da destinação prevista;

Instalações de utilização: aquelas que oferecem ambientes e condições adequados para a realização dos protocolos requeridos nos projetos e que contemplem os cuidados necessários para a manutenção do bem-estar animal até a finalização das atividades de ensino ou da pesquisa científica.

No entanto, sendo os biotérios instalações onde são manipulados animais vivos, é necessária a observância de critérios de biossegurança, comparáveis aos demais laboratórios com risco biológico, principalmente quando a pesquisa envolve a inoculação de agentes patogênicos. Em biotérios, podem ser encontrados riscos biológicos (patógenos e agentes zoonóticos), químicos (uso de substâncias químicas injetadas em animais, carcinógenos químicos, anestésicos, etc.), físicos (calor, frio, radiações), riscos ergonômicos (manipulação de objetos pesados, movimentos repetitivos), além dos alérgenos gerados pelos animais e poeira no ambiente inerentes às atividades de limpeza. Não obstante, riscos inerentes ao uso de materiais perfurocortantes, como agulhas, lâminas de bisturi e tesouras, também podem ser encontrados nos biotérios, associados aos procedimentos experimentais; por isso, o uso de EPIs é exigido.

2.6 GESTÃO DE RESÍDUOS BIOTECNOLÓGICOS

A reciclagem de resíduos biotecnológicos possui uma longa tradição, por exemplo, no uso de 'grãos de cervejaria' como alimentação animal rica em proteínas, e na aplicação de esgoto ou de outras matérias orgânicas em áreas agrícolas. Esta última prática está cada vez mais sujeita ao monitoramento e avaliação de risco, uma vez que pode impactar diretamente na quantidade de metais pesados presentes no solo, por exemplo. Já foi igualmente reconhecido que o uso de água residual, inadequadamente tratada na irrigação agrícola, pode transmitir doenças infecciosas ou parasitárias, especialmente por meio do consumo de folhagens e hortaliças produzidas nessas condições.

Os resíduos provenientes de laboratórios e processos industriais biotecnológicos são normalmente tratados usando uma variedade de técnicas para garantir que os microrganismos do processo sejam inativados ou capturados antes da liberação dos líquidos,

gases ou sólidos no meio ambiente. Os gases liberados a partir de tanques de fermentação podem ser tratados por um processo de etapa única ou, mais comumente, por uma combinação de processos, como filtragem ou, em casos especiais (por exemplo, a fermentação de organismos altamente patogênicos), por tratamento térmico.

Os resíduos fluidos normalmente são inativados por tratamento químico ou térmico. O tratamento químico é comumente usado em escala laboratorial para esterilizar fluidos, enquanto que desinfetantes são eficazes para inativar microrganismos em pequenos volumes de resíduos líquidos. No entanto, o custo muitas vezes impede seu uso em larga escala. Assim, o tratamento térmico é o método mais comumente usado para esterilizar efluentes líquidos, sólidos ou semissólidos, especialmente em operações em grande escala. O tratamento térmico tem a vantagem de ser fácil de controlar e validar, e não envolve a liberação de produtos químicos tóxicos no meio ambiente. Existem várias rotas de disposição ou reciclagem para a biomassa tratada termicamente (por exemplo, alimentos, ração, fertilizante, recuperação de solos, aterros sanitários e incineração) com diferentes graus de impacto no meio ambiente. Portanto, a composição da biomassa e as regulamentações locais que regem a reciclagem ou disposição dos resíduos devem ser levadas em consideração.

Em laboratórios, plantas de fermentação industrial, fazendas ou estações de tratamento de esgoto, é comum que os operadores estejam cientes dos potenciais riscos biológicos dos organismos que manipulam. Práticas de trabalho, códigos de conduta e regulamentações formais evoluíram ao longo dos anos para manter e melhorar os níveis de segurança para a saúde humana e para o meio ambiente. No entanto, uma questão que se tornou importante com o desenvolvimento dos OGMs e suas regulamentações relacionadas, é se os processos existentes de tratamento, disposição e reciclagem de resíduos (ou subprodutos) são adequados para garantir a segurança de materiais contendo DNA modificado.

Desde o uso de OGM em processos de produção biotecnológica, os possíveis riscos associados ao DNA recombinante presente em resíduos, têm sido discutidos pelo público e pelas autoridades reguladoras. Como os procedimentos tradicionais de inativação (por exemplo, autoclavagem) não quebram o DNA até o nível de monômeros, a discussão tem se centrado na possível transferência (e subsequente expressão) de características genéticas indesejadas (por exemplo, resistência a antibióticos) ou até mesmo patogênicas desses OGMs para outros organismos, sejam outros microrganismos ou formas de vida mais complexas como os humanos. Além disso, tais transformações poderiam, teoricamente, resultar em um desequilíbrio nos sistemas ecológicos, resultando na necessidade de um monitoramento ambiental constante.

2.7 ANÁLISE DE RISCO EM BIOSSEGURANÇA AMBIENTAL

Um OGM, seja ele uma planta, um microrganismo ou um animal, pode impactar o ambiente no qual é introduzido. Entretanto, quaisquer que sejam os impactos imaginados, eles devem ser sempre comparados com os advindos da presença, em condições semelhantes, da espécie não modificada. Por exemplo, não seria pertinente comparar uma planta geneticamente modificada cultivada em grandes extensões, características do agronegócio, com a mesma planta não modificada cultivada em condições orgânicas. Aceita tal premissa, a análise de risco procede em três etapas interdependentes: a avaliação de risco, a gestão de risco e a comunicação de risco.

A *avaliação de risco* apresenta-se subdividida em três etapas: I) a formulação do problema, que envolve a contextualização e a definição de um conjunto de riscos e danos associados; II) a caracterização do risco, que envolve a definição da probabilidade da exposição e um estudo das consequências da exposição no contexto previamente definido; e III) a mensuração do risco, uma vez que os

binômios probabilidade de exposição/danos foram estabelecidos para os vários riscos listados, resta ainda categorizar os riscos por relevância aos alvos de proteção. Danos sérios ou irremediáveis são prioritários, desde que a probabilidade de ocorrência seja real.

A *gestão de risco* inclui, primordialmente, uma avaliação prévia das múltiplas opções para a mitigação de danos ambientais, a tomada de ações mitigatórias, caso danos ocorram, e o monitoramento. Este deve ser dirigido à identificação de danos não previstos na análise de risco, o que implica no estabelecimento de um sistema de monitoramento geral, além de um monitoramento caso-específico. É nesta fase que o biomonitoramento exerce sua função, avaliando possíveis riscos à integridade genética dos organismos no ambiente.

A *comunicação de risco* é um processo interativo de troca de informações e opiniões entre indivíduos, grupos e instituições, envolvendo a troca de múltiplas mensagens sobre a natureza do risco, as preocupações, as opiniões ou as reações às mensagens de risco ou à forma como a gestão de risco é conduzida. Assim, é um processo que auxilia a gestão de risco e consolida a avaliação de risco, corroborando a percepção de segurança e risco advindos da avaliação das partes interessadas no produto ou afetadas por ele.

A avaliação de risco pode ser retomada se: a) publicações científicas ou relatórios oficiais indicarem novos riscos ou danos efetivos ao ambiente; b) no monitoramento do produto liberado comercialmente, surgirem evidências de danos imprevistos. A gestão de riscos também pode implicar a retomada da avaliação de riscos se, por exemplo, surgirem novas informações sobre riscos ou danos no processo de comunicação de riscos.

3. BIOÉTICA E BIOTECNOLOGIA

O século XX representa o século da tecnologia, com inúmeras descobertas e o desenvolvimento de novas áreas, como a biotecnologia. Um dos grandes marcos que contribuíram para o nascimento desta área foi a proposição da teoria da hereditariedade por Gregor Mendel, em 1865, assim como, posteriormente, a descrição da estrutura tridimensional do DNA (ácido desoxirribonucleico), proposta pelos pesquisadores James Watson e Francis Crick, em 1953. Surgiram muitas técnicas de manipulação de genomas e juntamente com elas emergiram os dilemas bioéticos acerca de como e para quais propósitos utilizá-las. O desenvolvimento da biotecnologia suscita uma série de preocupações tanto para cientistas quanto para a sociedade de maneira geral.

3.1 ORIGEM DA BIOÉTICA

Em 1927, foi o alemão Fritz Jahr quem primeiro descreveu o termo bioética, como ele viria a ser empregado posteriormente. Jahr já anteviu discussões e argumentos que viriam a ser realidade no final do século XX. Contudo, nos anos 1970-71, o americano Potter cunhou a palavra 'bioética', utilizando-a em duas publicações: no artigo '*Bioethics, science of survival*' e posteriormente, na obra '*Bioethics: bridge to the future*'. Neste último, Potter apresenta a bioética como uma ponte entre a ciência biológica e a ética, sendo que *bios* representa o conhecimento biológico, a ciência dos sistemas vivos, e *ethos* o conhecimento dos valores humanos. Potter almejava criar uma disciplina em que promovesse a dinâmica e a interação entre o ser humano e o meio ambiente, ambos interagindo para um futuro consciente.

A paternidade do termo bioética é ainda compartilhada com o pesquisador holandês André Hellegers, da Universidade de Georgetown, que seis meses após o lançamento do livro de Potter, nomeou com o termo bioética um novo centro de estudos – *Joseph and Rose Kennedy Institute for the Study of Human Reproduction and Bioethics* – hoje conhecido como Instituto Kennedy de Bioética. Ele trouxe um novo enfoque, unindo medicina, filosofia e ética, e tornando-se um campo de estudo revitalizador da ética médica.

Apesar do termo bioética ter ganhado força na década de 1970, muito antes já havia mobilização popular e legislativa sobre o envolvimento indevido de seres humanos em experimentação e a necessidade da criação de códigos de conduta. Em 1947, foi criado o Código de Nuremberg, como consequência do julgamento de mesmo nome que puniu atrocidades cometidas com seres humanos em campos de concentração durante a 2ª Guerra Mundial. Dentre os preceitos éticos estabelecidos, o consentimento do participante merece destaque, porém, o código não foi capaz de sensibilizar os médicos para o respeito necessário no uso de seres humanos em pesquisas clínicas, uma vez que se compreendeu erroneamente que este se referia a uma espécie de medicina 'do mal', típica e exclusiva do nazismo, distante da prática médica de países com tradição política democrática. Dessa forma, no ano seguinte, em 1948, a Organização das Nações Unidas (ONU) publicou a Declaração Universal dos Direitos Humanos e, em 1964, foi elaborada a Declaração de Helsinki pela Assembleia Médica Mundial, assim como posteriores versões, considerado um documento isento de poderes legais ou normativos, mas que, pelo consenso conquistado, é, ainda hoje, a referência ética mais importante para a regulamentação de pesquisas médicas envolvendo seres humanos. A Declaração de Helsinki representou a tradução e a incorporação, pelas entidades médicas de todo o mundo, dos preceitos éticos instituídos pelo Código de Nuremberg, definindo uma base ética mínima necessária às pesquisas e aos testes médicos com seres humanos.

No período que compreende 1932 a 1972, três principais casos mobilizaram a opinião pública norte americana: em 1963, no Hospital Israelita de Doenças Crônicas, em Nova York, foram injetadas células cancerosas vivas em idosos doentes; entre 1950 e 1970, no Hospital Estadual de Willowbrook, em Nova York, injetaram o vírus da hepatite em crianças com deficiência mental; e em 1932, no Estado do Alabama, no que foi conhecido como o Caso Tuskegee, 400 negros com sífilis foram recrutados para participarem de uma pesquisa de história natural da doença e foram deixados sem tratamento, sendo acompanhados por quase 40 anos, mesmo existindo tratamento. A pesquisa somente foi interrompida após denúncia no *The New York Times*. Enquanto esses casos aconteciam, foi criada a 'Comissão Nacional para a Proteção de Sujeitos Humanos na Pesquisa Biomédica e Comportamental', que publicou o que ficou conhecido como Relatório Belmont (1978), um documento histórico e normativo para a bioética. Nele, foram propostos três princípios da bioética: **beneficência**, **autonomia dos pacientes** e **justiça**. Mais tarde, em 1979, no trabalho de Beauchamp e Childres, '*Principles of Biomedical Ethics*', foi acrescentado o quarto princípio, da **não-maleficência**; juntos, estes princípios éticos deveriam nortear a pesquisa biomédica com seres humanos.

O princípio da autonomia enfatiza que os seres humanos envolvidos nas pesquisas devem, em primeiro lugar, ter vontade de participar da mesma e, portanto, devem ser informados sobre o seu objetivo. Esse princípio separa pessoas com autonomia para responder por si, daquelas com autonomia diminuída, isto é, socialmente vulneráveis, necessitando terem alguém que responda por elas. Em relação à beneficência, este princípio rege que o pesquisador deve assegurar o bem-estar das pessoas envolvidas na pesquisa científica. Isso requer uma avaliação constante e sistemática sobre os métodos adotados para alcançar os objetivos científicos para repensar sempre na relação entre o risco e o benefício que a pesquisa proporcionará. Em adição, o princípio da justiça foi fundamentado

pelas teorias filosóficas que vigoravam nos Estados Unidos e ressalta que há necessidade de diferentes medidas para garantir interesses iguais. Era preciso considerar um grupo de participantes para averiguar o que seria preciso fazer durante a pesquisa, de modo que duas pessoas diferentes poderiam suscitar diferentes cuidados frente a um mesmo fato.

Esses princípios regem também as normativas estabelecidas em relação ao genoma. Em 2003, após o sequenciamento do genoma humano, foi publicada a *Declaração Internacional sobre Dados Genéticos Humanos* (IDHGD), documento que fornece orientações mais específicas sobre a coleta, processamento, armazenamento e utilização de dados genéticos. Isso engloba vários dos princípios como consentimento informado, confidencialidade, autonomia e liberdade de pesquisa, porém muitas questões foram aparecendo conforme as técnicas de manipulação do genoma foram sendo descritas. Neste conceito, a não-maleficência, adicionado em distinção à beneficência, destacaria a premissa do *primum non nocere*, traduzido como 'primeiro, não causar dano', evitando o uso indevido das sequências genéticas, e a cautela do uso de técnicas de biologia molecular que podem as modificar.

3.2 BIOÉTICA E A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No Brasil, a regulamentação ética com estudos em seres humanos data de 1996, quando foi criada a Comissão Nacional de Ética em Pesquisas (CONEP), por meio da Resolução do Conselho Nacional de Saúde N° 196, de 10 de outubro de 1996. Hoje, o Brasil também conta com inúmeros comitês de ética em pesquisa (CEPs) locais. Entre 1996 e 2012, o Sistema Nacional de Informação sobre Ética e Pesquisa (SISNEP) foi utilizado para registrar informações sobre as pesquisas envolvendo seres humanos submetidas ao Sistema CEP/CONEP. Atualmente, a Plataforma Brasil

(https://plataformabrasil.saude.gov.br/) é a base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos para todo o sistema CEP/CONEP. Ela permite que as pesquisas sejam acompanhadas em seus diferentes estágios, desde sua submissão até a aprovação final pelo CEP e, quando necessário, pela CONEP. Até janeiro/2024, estão cadastrados um total de 1.141.641 usuários na plataforma e 35.755 instituições, onde são acompanhados os projetos de pesquisa (CNS, 2024).

Toda pesquisa com seres humanos deve tramitar por um CEP, e necessariamente garantir os preceitos principialistas. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é o documento que garante a autonomia e protege o participante da pesquisa, justamente para evitar as atrocidades que ocorreram no passado. O TCLE é um documento explicativo que tem por finalidade possibilitar, aos participantes, o mais amplo esclarecimento sobre a investigação a ser realizada, seus riscos e benefícios, para que a sua manifestação de vontade no sentido de participar (ou não), seja efetivamente livre e consciente. Em adição, o documento garante que o material biológico cedido será única e exclusivamente utilizado para a finalidade descrita, ou seja, para a pesquisa na qual o TCLE é destinado. Considerando a biotecnologia e todas as suas possibilidades, essa garantia é de extrema importância, uma vez que a partir de sangue ou outros materiais biológicos, é possível a extração de DNA e o acesso ao genoma do indivíduo. Além disso, o pesquisador deve considerar, de antemão, que não existe pesquisa com risco zero e, portanto, os participantes devem ser protegidos para minimizar os impactos e as consequências desses riscos. Cabe ao Comitê de Ética, em diálogo com o pesquisador, construir o caminho mais adequado para alcançar o objetivo proposto, e as normativas devem atuar como promotores de reflexões e de discussões sobre a ética, jamais como impositores de normas rígidas e inquestionáveis de conduta.

Recentemente, em maio de 2024, foi sancionada a Lei Nº 14.874, que estabelece um marco regulatório detalhado para

pesquisas envolvendo seres humanos, e institui o Sistema Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A nova legislação visa reforçar o compromisso com a integridade científica e a proteção dos participantes das pesquisas. A lei na íntegra pode ser acessada no Diário Oficial da União (https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/L14874.htm), e destaca a inclusão das ciências humanas e sociais, prevendo que toda pesquisa envolvendo a aplicação de questionários ou entrevistas com seres humanos, implica a necessária e prévia submissão ao CEP. A nova lei trata ainda de temas relevantes, como diretrizes para pesquisas clínicas, o armazenamento de dados em biobancos para utilização em futuras pesquisas, e a importação, uso, fabricação e exportação de produtos para fins de pesquisa clínica com seres humanos. A legislação regula a proteção e o anonimato de dados pessoais dos participantes das pesquisas, e veda a remuneração do participante ou a concessão de qualquer tipo de vantagem por sua participação.

A biotecnologia além de pesquisas com seres humanos trouxe à tona diversos debates éticos em relação à manipulação do genoma. Em destaque, quando, no final dos anos 1990, foi anunciada a criação do primeiro clone de mamíferos da história, a ovelha Dolly, pelo cientista escocês Ian Wilmut, em 1996. A clonagem pode ser definida como uma população de moléculas, células ou organismos que se originaram de uma única célula, e que são idênticas à célula original e entre elas. Em 2005, a ONU proibiu qualquer tipo de clonagem em seres humanos que não tivesse finalidade terapêutica, ou seja, visando apenas a clonagem de células e órgãos. No Brasil, a clonagem humana é proibida como previsto no artigo 6º, inciso IV, da Lei Nº 11.105/2005 (Lei de Biossegurança). A mera possibilidade de gerar clones humanos já despertou inúmeros questionamentos sociais e bioéticos, sendo palco de filmes de ficção científica, porém, com ferramentas biotecnológicas reais.

A clonagem animal, por outro lado, tem maior aceitação científica. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

é pioneira nesta tecnologia: em 1984, produziu em laboratório a bezerra Vitória, o primeiro clone bovino latino-americano, a partir da transferência de uma célula embrionária pluripotente, e posteriormente, outros animais. É uma técnica cara, de reprodutibilidade baixa e controversa quanto às aplicações. Especialistas justificam seu uso pela possibilidade de reproduzir animais silvestres em risco de extinção, manutenção de animais com características específicas ou premiados, entre outros. Em 1985, foi fundada a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (no início denominada Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões), que hoje congrega mais de 500 associados e proporciona o ambiente adequado para as discussões acadêmicas e técnicas sobre os diferentes aspectos das biotécnicas de reprodução. Além disso, toda pesquisa animal precisa tramitar pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) e/ou Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que é o órgão normativo, credenciador, supervisor e controlador das atividades de pesquisa em animais, como citado previamente neste capítulo. As normativas em pesquisa e experimentação animal tiveram grande avanço desde a implementação da Lei Arouca, em 2008, que determina a obediência aos critérios nela estabelecidos para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional.

Pesquisas em seres humanos e animais sempre estiveram intimamente ligadas, uma vez que tanto no Código de Nuremberg quanto em posteriores, há a prerrogativa de que experimentos em seres humanos devem ser baseados em resultados de experimentação prévia em animais e no conhecimento da evolução da doença ou outros problemas em estudo; dessa maneira, os resultados já conhecidos justificam a condição do experimento. Ensaios clínicos para o desenvolvimento de novas moléculas, como vacinas e medicamentos, envolvem obrigatoriamente uma fase pré-clínica que valide a eficácia e segurança, sem o envolvimento de seres humanos. Modelos animais foram e são ainda utilizados para compreender a infecção causada pelo vírus Sars-CoV-2, como roedores

transgênicos infectados intranasalmente com o vírus, primatas não humanos, furões, *hamsters* e camundongos. Modelos alternativos têm sido considerados e incentivados para pesquisas em geral.

A ciência, desde sua concepção, procura gerar conhecimento e descobertas que permitam um benefício para a humanidade. A possibilidade de ter uma cura para quase qualquer doença de base genética é inegável, no entanto, como em todas as histórias, há benefícios e malefícios. Dentre as biotecnologias emergentes, a edição gênica utilizando o sistema CRISPR Cas denota um dos grandes dilemas atuais, há divergências na regulamentação em diferentes países. A acurácia e especificidade do sistema ainda requer aprimoramento, a viabilidade dos sítios-alvo que se pretendem modificar para resolver, em geral, requer estudos prévios em modelos de cultura celular e/ou em modelos animais, aguardando-se resultados favoráveis, sem a alteração de outros fatores metabólicos. Derivada do crescente interesse no uso e aplicação do CRISPR Cas para modificação genética, a comunidade científica encontra-se frequentemente em dilemas éticos, devido à divisão de ideias que, por um lado, prometem resultados encorajadores e, por outro, há a questão da transmissão hereditária de alterações geradas. O estudo em células somáticas tem tido melhor aceitação, incluindo em terapias gênicas do que a manipulação em células embrionárias, que demanda dilemas como a origem destas células.

A biotecnologia é uma área em crescente expansão, no que tange ao desenvolvimento de diferentes técnicas e aplicações, são necessários constantes debates bioéticos para equilibrar o que é possível do que é devido para manutenção e preservação da vida como um todo. Um dos mais importantes documentos bioéticos contemporâneos foi elaborado pela Unesco, em 2005, a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, e dentre os seus objetivos, está, promover o respeito da biodiversidade e, entre seus princípios fundamentais, a proteção do meio ambiente, da biosfera e da biodiversidade.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente capítulo se encerra com a perspectiva de que as discussões aqui realizadas são apenas ponto de partida para outras, uma vez que a biotecnologia é uma ciência viva em desenvolvimento.

É inegável a necessidade de se pensar as consequências da biotecnologia para a geração atual, tanto de seres humanos como dos demais seres vivos. No entanto, é necessário pensar essa realidade também em relação às futuras gerações. Como princípio ético, devemos considerar que, quando a atuação humana envolver OGM, por exemplo, teremos que levar em conta suas possíveis consequências em relação à permanência da vida na Terra, impedindo que os efeitos dessa atuação destruam a possibilidade futura dessa vida. Isso implica na impossibilidade de colocar em perigo as condições necessárias para a conservação da humanidade e da natureza, ou, dito de outra forma, as escolhas realizadas nas pesquisas biotecnológicas devem ter em perspectiva a integridade do meio ambiente e, consequentemente, da vida humana e dos demais organismos vivos.

É praticamente impossível dissociar a biossegurança com a biotecnologia; o conceito de ambas se entrelaça e se completa, a primeira completa e delineia os passos da segunda. Há de se considerar também toda a normativa jurídica existente e que pode ser modificada, de acordo com o entendimento dos legisladores e juristas. Isso ocorre, pois, a sociedade é dinâmica e os avanços científicos e tecnológicos surgem para suplantar barreiras ora inacessíveis à promoção humana.

Entende-se também, cada vez mais, a necessidade de articular a biossegurança e a bioética ao ensino, tanto na formação de professores e pesquisadores pelas pós-graduações quanto na educação básica, na construção de senso de responsabilidade e crítico, diante dos novos caminhos que possam ser percorridos em prol de pesquisas que viabilizem produtos científicos alicerçados pelas discussões éticas que os envolvem, considerando sempre o tripé biossegurança, bioética e biodireito. E sempre, almejando a prevenção e a manutenção da saúde e qualidade de vida de todos os organismos e do meio ambiente.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. B. M. Biossegurança, uma visão da história da ciência. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 18, p. 42-45, 2001.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa Nº 30, de 02 de fevereiro de 2016. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-30-de-02-de-fevereiro-de-2016.pdf/view. Acesso em: 28 abr. 2024.

BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. 2024. Disponível em: http://ctnbio.mctic.gov.br/inicio. Acesso em: 22 abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_gerais_contencao_agentes_biologicos_3ed.pdf. Acesso em: 15 abr. 2024.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Portaria 3.214, de 8 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas a Segurança e Medicina do Trabalho. Brasília, 1978.

BRASIL. Presidência da República. Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm. Acesso em: 22 abr. 2024.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. 4. ed. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 1999.

CNS. Conselho Nacional de Saúde. Histórico CNS. Disponível em: https://conselho.saude.gov.br/historico-cns/95-conselho-nacional-de-saude/comissoes/conep/plataforma-brasil-conep/649-pagina-plataforma-brasil-conep. Acesso em: 05 abr. 2024.

CPPCRA. Comissão Permanente de Prevenção e Controle de Riscos Ambientais da Universidade Federal de Alfenas. Classes de Riscos. Disponível em: https://www.unifal-mg.edu.br/riscosambientais/classesriscosbiologicos. Acesso em: 18 abr. 2024.

CUCONATO, P.; DOS SANTOS, D. M. Biossegurança, Biotecnologia e Biodireito: uma análise de discurso. **Revista Científica UBM**, v. 24, n. 46, p. 70-84, 2022.

SUMÁRIO

DINIZ, D.; CORRÊA, M. Declaração de Helsinki: relativismo e vulnerabilidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 679–688, 2001.

DOBLHOFF-DIER, O.; BACHMAYER, H.; BENNETT, A.; BRUNIUS, G.; CANTLEY, M.; COLLINS, C.; COLLARD, J.M.; CROOY, P.; ELMQVIST, A.; FRONTALI-BOTTI, C.; GASSEN, H.G.; HAVENAAR, R.; HAYMERLE, H.; LAMY, D.; LEX, M.; MAHLER, J.L.; MARTINEZ, L.; MOSGAARD, C.; OLSEN, L.; PAZLAROVA, J.; RUDAN, F.; SARVAS, M.; STEPANKOVA, H.; TZOTZOS, G.; WAGNER, K.; WERNER, R. Safe biotechnology 10: DNA content of biotechnological process waste. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 141-146, 2000.

FERREIRA, M. S.; RUIZ, R. C.; MATTARAIA, V. G. M. **Fundamentos para Gestão de Resíduos de Serviços de Saúde**. 1. ed. São Paulo: MKX Editorial, 2022. Disponível em: https://butantan.gov.br/assets/arquivos/Index/fundamentos.pdf. Acesso em: 15 abr. 2024.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Níveis de Biossegurança. Disponível em: https://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/niveis_de_bioseguranca.html Acesso em 15 abr. 2024.

GONZALEZ-AVILA, L. U.; VEGA-LÓPEZ, J. M.; PELCASTRE-RODRÍGUEZ, L. I.; CABRERO-MARTÍNEZ, O. A.; HERNÁNDEZ-CORTEZ, C.; CASTRO-ESCARPULLI, G. The Challenge of CRISPR-Cas Toward Bioethics. **Frontiers in Microbiology**, v.28, n. 12, p. 657981, 2021.

HIRATA, M. H.; MANCINI-FILHO, J.; HIRATA, R. D. C. **Manual de Biossegurança**. 3. ed. Barueri: Manole, 2017.

LIANG, H.; XIANG, X.; MA, H.; YUAN, Z. History of and suggestions for China's biosafety legislation. **Journal of Biosafety and Biosecurity**, v. 1, n. 2, p. 134-139, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2019.08.002>.

LOLAS, F. Bioethics and animal research: A personal perspective and a note on the contribution of Fritz Jahr. **Biological Research**, v. 41, n. 1, p. 119-23, 2008.

MESQUITA, A. F. N.; SALES, J. F. S.; BANDEIRA, L. L.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Biotecnologia no Brasil: Normas de Biossegurança e Acreditação de Laboratórios. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 20, n. 43, p. 56, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.18677/EnciBio_2023A5.

MORI, C. M. C.; MENDES, C. M.; COGLIATI, B.; DAGLI, M. L. Z. Biossegurança em Biotérios. *In:* DAGLI, M. L. Z. **Manual de Biossegurança**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2022. p. 29-38. Disponível em: https://orcid.org/0000-0001-7031-6711.

NAGAI, H.; NAKAZAWA, E.; AKABAYASHI, A. The creation of the Belmont Report and its effect on ethical principles: a historical study. **Monash Bioethics Review**, v. 40, n. 2, p. 157-170, 2022.

PENNA, P. M. M.; AQUINO, C. F.; CASTANHEIRA, D. D.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S. R. Biossegurança: uma revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 555-565, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p5552010.

PESSINI, L. As origens da bioética: do credo bioético de Potter ao imperativo bioético de Fritz Jahr. **Revista Bioética**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2013.

PIRES, Y. M. S.; ARAÚJO, V. L. L.; MOURA, M. C. L. Saúde do trabalhador em ambiente hospitalar: mapeando riscos e principais medidas de biossegurança. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 115-123, 2019.

SANGIONI, L. A.; PEREIRA, D. I. B.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, A. S. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 91-99, 2013.

VASCONCELOS, M. S. **Modelos Animais: Da legislação à experimentação científica**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2022.

VICENTE, J. C. S.; ROCHA, D. A. M.; LIMA, F. C. G.; AUGUSTO, H. F.; SILVA, E. M. Estudo observacional dos riscos ambientais em laboratório de pesquisa em Recife/PE. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 2, p. 1-10, 2021. Disponível em: http://dx.doi.org/10.25248/reas.e5477.2021.

VICENTINI, V. E. P.; ALMEIDA, I. V.; DINIZ, N. M. Bioética e Biossegurança em Pesquisa. *In:* SALVADORI, D. M. F.; TAKAHASHI, C. S.; GRISOLIA, C. K.; SANTOS, R. A. **Da Toxicogenética à Toxicogenômica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2021.

WU, G. Laboratory biosafety in China: past, present, and future. **Biosafety and Health**, v. 1, n. 2, p. 56-58, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bsh eal.2019.10.003.

1.3

Eliane Papa Ambrosio Albuquerque
Adrieli Rodrigues da Costa Nunes
Alessandra Valéria de Oliveira

ÔMICAS E SUA IMPORTÂNCIA PARA A EXPLORAÇÃO SUSTENTÁVEL DE RECURSOS AMBIENTAIS

1. INTRODUÇÃO

A exploração sustentável dos recursos ambientais é um dos maiores desafios do nosso século. À medida que a população mundial cresce e a demanda por recursos naturais aumenta, torna-se crucial encontrar maneiras de utilizar esses recursos de forma responsável e eficiente. As ciências ômicas, que incluem a genômica, proteômica, metabolômica dentre outras disciplinas, oferecem ferramentas valiosas para entender e gerir os ecossistemas de maneira sustentável. Neste capítulo, vamos explorar como as ômicas podem contribuir para o conhecimento da biodiversidade e para a exploração sustentável dos recursos ambientais. Ao integrar dados de genômica, proteômica, metabolômica e outras ômicas, os pesquisadores podem obter uma visão holística dos sistemas biológicos e suas interações com o ambiente, ajudando a compreender de forma abrangente os ecossistemas. Os avanços das tecnologias ômicas têm potencial para mudar nossa abordagem à exploração de recursos naturais, permitindo a criação de práticas mais eficientes e sustentáveis.

O termo 'ômica' (inglês *omic*) é derivado de sufixo 'oma' (inglês *ome*) e sua primeira utilização para esta finalidade se deu em 1920 com a definição do conceito de 'genoma' por Hans Winkler. O primeiro grande avanço teve início em 1990 com o Projeto Genoma Humano, liderado inicialmente por James D. Watson que propunha sequenciar todo o genoma humano em um esforço conjunto de diversos países, com projetos paralelos de sequenciamento de animais modelo como *Arabdopsis thaliana, Drosophila melanogaster, Escherichia coli*, etc. Os dados gerados abriram espaço e forneceram bases para outros estudos de caracterização em larga escala, como a obtenção de sequências de DNA de genomas de diferentes organismos simultaneamente (metagenômica), a caracterização de transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica), interação entre metabólitos (metaboloma), dentre outras. A geração de dados

diversos permite a realização de abordagens integradas que combinam dados ômicos individuais, de forma sequencial ou simultânea, para entender a interação das moléculas. Eles ajudam a avaliar o fluxo de informações de um nível ômico para o outro e, assim, ajudam a preencher a lacuna do genótipo para o fenótipo.

2. METODOLOGIAS DE ESTUDO

A genômica é a caracterização em larga escala do conteúdo genético de um organismo, o que inclui não só as regiões de DNA codificante, mas também regiões não-codificantes, como as responsáveis pela transcrição de muitos RNAs, sequências de DNA repetitivo, regiões regulatórias, dentre outras. A metagenômica (ou 'genômica ambiental') é a subárea da genômica que estuda os 'metagenomas', conjuntos de material genético em uma determinada amostra ambiental, geralmente compreendendo múltiplos organismos.

A principal ferramenta da genômica estrutural é o sequenciamento, desde Sanger até os sequenciamentos de nova geração. O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nesta estrutura. As primeiras metodologias de sequenciamento datam de 1977-1978, o método de dideoxinucleotídeos de Sanger, o sequenciamento parcial de ribosubstituição de Barnes e o método de clivagem química de Maxan e Gilbert. Destes, destaca-se o método de Sanger, cujos primeiros projetos se concentraram na determinação de sequências para genes únicos ou genomas muito pequenos, porém o desenvolvimento de um pacote computacional por Rodger Staden, desenvolvido no *Medical Research Council* (MRC), em conjunto com o laboratório de Sanger, permitiu que o tamanho de regiões de DNA ou genomas sequenciados escalasse significativamente.

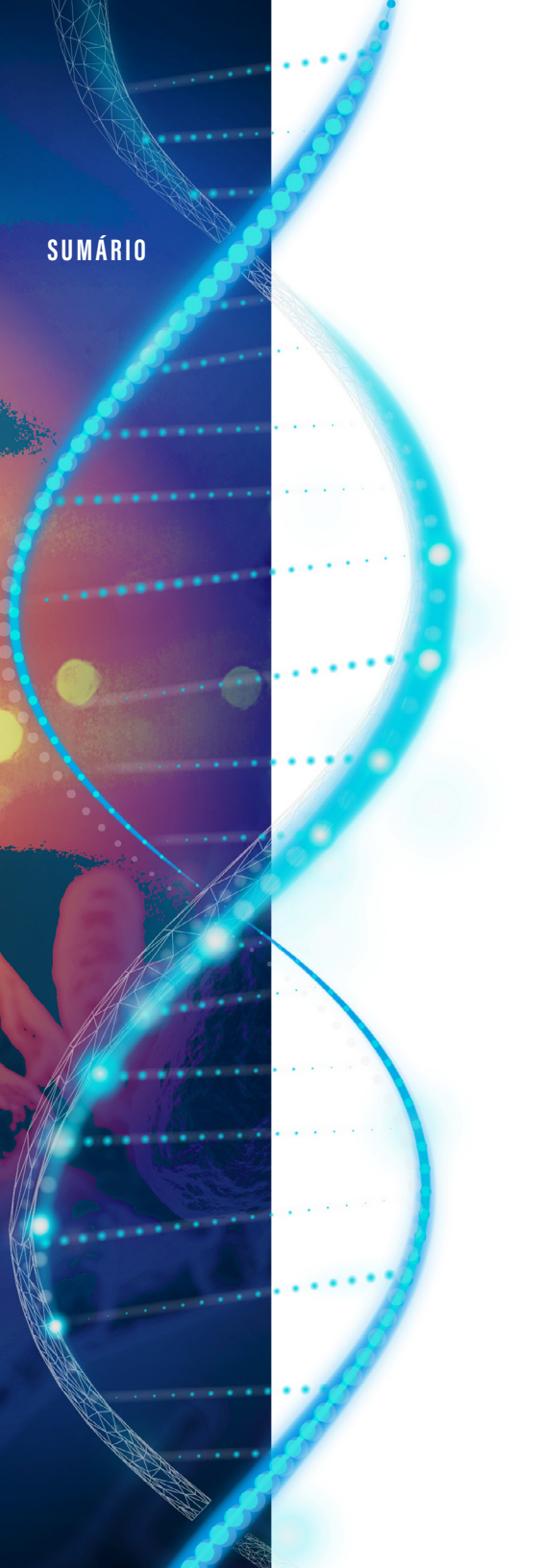
Este implemento permitiu que pequenos fragmentos de DNA de uma fonte de DNA original maior, fossem sequenciados aleatoriamente e sobrepostos computacionalmente para reformar toda a sequência da fonte de entrada original maior. Posteriormente, o Pacote Staden foi suplantado pelo conjunto phred/phrap/consed do laboratório de Phil Green, permitindo sequenciar e organizar regiões de DNA mais longas e genomas maiores, incluindo métodos baseados em clones mapeados, como o projeto genoma humano. Apesar de todos os avanços, sequenciar, montar e anotar genomas com abordagens de Sanger ainda consistia em um empreendimento significativo e caro que exigia equipamentos, experiência e infraestrutura especializadas.

Como alternativa, foram desenvolvidos os chamados 'sequenciamento de nova geração' (NGS), que foram elaborados a partir de mudanças metodológicas significativas e que permitem que dados de sequência sejam gerados a partir de dezenas de milhares a bilhões de modelos simultaneamente, em uma capacidade aprimorada de geração de dados em larga escala. No sequenciamento de Sanger, as leituras são derivadas de fragmentos subclonados, originados de um clone de DNA de inserção grande, como um cosmídeo ou um cromossomo artificial de bactéria (BAC), o que permite a montagem de leitura com base na similaridade de sequência um ou mais 'contigs'. Nas abordagens NGS, os comprimentos de leitura são mais curtos e muitas vezes não são adequados para montagem de leitura, especialmente se a biblioteca NGS foi gerada a partir de um genoma inteiro, não de um fragmento clonado desse genoma. Os dados de leitura curta são mais facilmente interpretados por seu alinhamento a um genoma de referência do que por um conjunto de leitura de novo. Como tal, o uso inicial de NGS provocou o desenvolvimento de numerosos algoritmos de alinhamento de leitura, cada um usando um dos vários princípios diferentes para combinar cada leitura curta com uma montagem de genoma existente, aumentando ainda mais a necessidade de análises de bioinformática.

Comprimentos de leitura longa oferecem vantagens significativas na montagem do genoma, comparadas às altas taxas de erro geradas das montagens obtidas de dados de plataformas de leituras curtas. Para alcançar alta qualidade e contiguidade em montagens genômicas, vários grupos exploraram diferentes abordagens que combinaram dados longos e curtos, especialmente para montagem de genomas bacterianos. A partir das sequências montadas é possível realizar comparações quantitativas entre diferentes organismos, como número de genes e tamanho de genomas, ou ainda a conservação gênica entre as diferentes espécies.

Porém, por mais avançadas que sejam as técnicas de sequenciamento, elas permitem saber apenas a ordem dos nucleotídeos no genoma do organismo estudado, contudo para entender o funcionamento e sua relação com a genética teve início a Era da Pós-Genômica, com estudos de transcritos e proteínas. A transcriptômica consiste na caracterização em larga escala dos transcritos de um organismo em uma determinada condição. Diferente do genoma que é virtualmente estático, o transcriptoma ('perfil de expressão gênica') de um organismo varia a partir da interação com o meio de seus processos regulatórios.

Uma das primeiras abordagens disponíveis para esta análise foram as *Expressed Sequence Tags* (ESTs) desenvolvido por Adams na década de 1990, uma metodologia de sequenciamento de bibliotecas de DNA derivadas de mRNA (cDNA), através da técnica de sequenciamento de Sanger. Entretanto, da mesma forma que a caracterização de genomas, o sequenciamento de mRNA com a técnica de Sanger era extremamente laborioso por conta do baixo *throughput*, além do custo. Em seguida, a abordagem de *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), desenvolvido por Velculescu et al., reduziu significativamente o custo da análise de expressão por gene, graças ao sequenciamento de apenas uma região alvo curta por cDNA (15-21pb). No entanto, o surgimento da tecnologia de microarranjos de DNA em meados da década de 1990 substituiu ambos os métodos



EST e SAGE para análise de expressão gênica, em grande parte devido à maior acessibilidade para estudos em larga escala. A análise de microarranjos de DNA é baseada na hibridização de alvos marcados com fluoróforos, que são derivados de transcritos, para sondas que são aderidas a uma superfície sólida através de impressão ou síntese *in situ*. Apesar deste método permitir a identificação de transcritos genoma-amplos, são necessárias informações prévias de genomas/transcriptomas de referência, para delineamento das sondas. Dentre as desvantagens, pode ocorrer hibridização cruzada e os ruídos de fundo frequentemente, diminuindo a especificidade/sensibilidade para alguns genes.

Após o desenvolvimento do NGS, um novo método para estudo de expressão gênica emergiu, o RNA-Seq. Em comparação com métodos baseados em microarranjos de DNA, o RNA-Seq oferece menos ruído de fundo e uma maior faixa dinâmica para detecção. Além de revelar diretamente a identidade da sequência, crucial para a análise de genes desconhecidos e novas isoformas de transcrição. Uma etapa necessária para a realização da técnica é a preparação da biblioteca de cDNA a partir do RNA, cada cDNA em uma biblioteca RNA-Seq é composto por uma inserção de cDNA de determinado tamanho flanqueada por sequências adaptadoras, conforme necessário para amplificação e sequenciamento em uma plataforma específica. O método de preparação da biblioteca de cDNA varia dependendo da espécie de RNA sob investigação, que pode diferir em tamanho, sequência, características estruturais e abundância. Devido ao limite de detecção da maioria dos sequenciadores, as bibliotecas de cDNA precisam ser amplificadas por PCR antes do sequenciamento.

Existem variações da técnica, como a expressão gênica digital (DGE)-Seq, ou Tag-Seq, que é um método de sequenciamento profundo derivado do SAGE, mais econômico do que o RNA-Seq tradicional e que pode fornecer uma faixa dinâmica mais alta de detecção quando o mesmo número de leituras é gerado. Este método tem sido

comercializado por várias empresas e é útil especialmente quando o simples perfil de expressão gênica é o objetivo ou quando o genoma completo ou transcriptoma não está disponível para o alinhamento completo das leituras de RNA-Seq.

A escolha da metodologia apropriada incide diretamente no objetivo da pesquisa, de acordo com a investigação da expressão gênica e as questões sobre os aspectos da biogênese e metabolismo do RNA em genes individuais ou em larga escala. Apesar da análise do transcriptoma permitir enxergar as partes do genoma que estão sendo expressas em um dado momento, ainda não há uma correlação direta entre os níveis de expressão de proteínas e o nível de mRNA, justificada por eventos biológicos como regulação, degradação, *splicing* alternativo, secreção, formação de complexos, dentre outros.

Desta forma, há metodologias específicas para a análise do proteoma em determinados tipos celulares e em condições específicas. Contudo, a investigação proteômica apresenta maior número de variáveis em relação a análise genômica e do transcriptoma, devido à grande diversidade química das proteínas e interconectividade destas em complexos e redes de sinalização, as quais podem variar amplamente. O estudo das proteínas requer ferramentas analíticas com alta seletividade, resolução e sensibilidade. Em suma, utilizam-se duas abordagens de análise: *Bottom-Up* (análise de peptídeos) e *Top-Down* (intacta), que permite deduzir a maior parte da estrutura primária considerando modificações pós-traducionais. Na primeira delas, há a necessidade de um processo de hidrólise proteica com peptidases seguida de análise por cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas. Por sua vez, a abordagem *top-down* não utiliza a digestão prévia das proteínas a serem analisadas, o que aparentemente parece ser uma estratégia menos complexa, porém esta técnica apresenta barreiras metodológicas e um maior custo em relação à primeira.

Os primeiros estudos proteômicos baseavam-se na separação de misturas proteicas complexas em géis 2D, a espectrometria de massa (MS) não substitui completamente os géis, mas são as metodologias mais utilizadas, onde as mudanças na abundância podem ser reconhecidas através de mudanças na intensidade do ponto. O desenvolvimento de MS *em tandem* seguida por análises de bioinformática permitiu que misturas proteicas não fracionadas fossem analisadas em uma única corrida. Esta estratégia aliada a digestão proteica (proteômica *bottom-up*) é a principal abordagem utilizada.

A proteômica é uma ciência de desafios, a identificação e quantificação de peptídeos e, em seguida, proteínas em espectros de massa, talvez seja o maior deles. Ao contrário das tecnologias de sequenciamento que leem diretamente nucleotídeos com escores de confiança, etapas adicionais são necessárias para atribuir espectros de massa de fragmentos a peptídeos e proteínas potenciais.

A proteômica está diretamente relacionada à transcriptômica, mesmo que frequentemente não haja correspondência linear. O grande diferencial da proteômica é que ela fornece informações diretas sobre os blocos de construção estruturais, sinalizadores e enzimáticos do corpo, e as proteínas compreendem a maioria dos alvos de drogas e muitas vezes de agroquímicos. Em contraste, a transcriptômica nos diz sobre a abundância de transcritos individuais, mas não diretamente sobre a abundância ou estado da proteína. As duas abordagens fornecem informações complementares e são frequentemente usadas em conjunto.

Diversas ômicas subsequentes foram sendo descritas direcionadas às áreas mais específicas do conhecimento, como toxicogenômica, farmacogenômica, filogenômica, entre outras. Novas variações com o sufixo ômica têm surgido e continuarão de acordo com as aplicações em novas áreas e desenvolvimento de ferramentas. A geração de dados em larga escala é uma consequência das ômicas e envolve diretamente o uso da bioinformática para a

triagem e análise de dados. O desenvolvimento da bioinformática está intimamente relacionado à biotecnologia desde a geração de novos dados e até o conhecimento que pode ser aplicado para o desenvolvimento de novos produtos e soluções.

3. METAGENÔMICA E O MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE

3.1 DNA AMBIENTAL

O monitoramento da biodiversidade e avaliação dos recursos genéticos de uma determinada área ou local, têm se tornado cada vez mais frequente e importante, considerando que a perda de espécies em diferentes ambientes está aumentando rapidamente e consequentemente, gerando impactos significativos em ecossistemas aquáticos e terrestres. Nesse contexto, as ferramentas moleculares são úteis para uma avaliação rápida, sensível, econômica e não invasiva da biodiversidade, em diferentes estágios de desenvolvimento dos organismos.

Nas últimas décadas, surgiu uma alternativa bastante inovadora para detecção e avaliação de espécies em ambientes aquáticos e terrestres. Essa tecnologia utiliza amostras de DNA intra ou extracelulares presentes no meio ambiente, também chamadas de DNA ambiental (do inglês, *Environmental DNA* – eDNA). O DNA ambiental pode ser isolado de amostras ambientais que consistem na mistura de materiais orgânicos e inorgânicos retirados do ambiente, podendo conter organismos vivos como microrganismos ou pequenos macrorganismos e seus restos. Assim, "eDNA" foi o termo utilizado para descrever o material genético oriundo de organismos inteiros ou parte deles presentes na água, solo ou sedimento.

A abordagem de eDNA é útil particularmente para estudar espécies aquáticas ou semi-aquáticas que liberam DNA no meio ambiente e pode ser a resposta para várias situações em que os métodos tradicionais apresentam resultados de baixa qualidade e/ou exigem um grande esforço de amostragem, principalmente em abordagem de espécies nocivas, invasivas ou ameaçadas. As principais considerações na análise de eDNA são maximizar sua captura no campo, minimizar a degradação de amostras durante o transporte e armazenamento, e obter sucesso nos processos de isolamento e amplificação, para que a detecção e quantificação de espécies, análise de dados e interpretação de resultados seja realizada de maneira satisfatória.

Três fatores principais afetam a detecção de eDNA, especialmente em ambientes aquáticos: sua produção, transporte e degradação. A produção, por exemplo, pode ter sua taxa afetada pelo tamanho, saúde, sexo, dieta, época de reprodução, volume de secreções e densidade dos organismos. Já, no processo de transporte de eDNA, é comum sua remoção por meio de processos de sedimentação ou destruição por forças físicas. Além disso, as moléculas de DNA que são adsorvidas por sedimentos, geralmente persistem em sistemas de água doce por mais tempo do que um DNA dissolvido ou suspenso, o que pode levar a detecção de uma espécie após ela ter deixado o local, ou seja, ocasionar falsos positivos. Fontes de eDNA também podem ser transportadas por processos de lixiviação do solo, fluxo a jusante e dispersão por correntes de água.

Com relação à degradação, sabe-se que ela possui uma forte influência sobre a quantidade de eDNA presente em um sistema, e é sabido que o eDNA persiste melhor em condições mais frias, secas, escuras e alcalinas. Condições anóxicas também favorecem a permanência do eDNA, e o contrário acontece em condições com oxigênio. A liberação e degradação de eDNA são influenciadas por fatores bióticos (por exemplo, interações de espécies, micróbios), condições abióticas (por exemplo, radiação UV, temperatura, salinidade)

e características da espécie como o seu tamanho. Fragmentos de eDNA altamente degradados e curtos são mais prováveis de serem detectados, porém mais suscetíveis a altas taxas de erros. Por outro lado, os fragmentos de eDNA mais longos geralmente representam informações biológicas recentes, no entanto, muitas vezes são encontrados em concentrações baixas no ambiente e são menos persistentes após sua liberação, ou seja, degradam facilmente.

Existe uma variedade de técnicas e protocolos que foram desenvolvidos individualmente para diferentes estudos de eDNA, englobando a coleta de amostras de água, extração, purificação e detecção de eDNA. Para a coleta de eDNA de amostras de água, três métodos importantes são comumente usados: método de filtração, método de precipitação com etanol e o método de centrifugação e ultrafiltração. A escolha da melhor metodologia depende do objetivo da pesquisa que está sendo realizada e das condições das amostras de água que estão sendo testadas, sempre visando o método mais adequado considerando que uma coleta mais eficiente de eDNA leva a melhores taxas de detecção de espécies-alvo.

Os métodos de filtração são muito utilizados para obter o eDNA de amostras de água, pois estudos comparativos mostraram que através da filtragem e processamento de volumes maiores de água é possível obter um maior rendimento de eDNA. Existem vários tipos de filtros para a captura do material genético sendo que sua eficiência pode variar pelo tamanho dos poros, o volume e as propriedades químicas (por exemplo, pH, partículas orgânicas e inorgânicas) da água filtrada e pelo método de extração.

A precipitação com etanol é um método adequado para o processamento de uma quantidade menor de água, quando a concentração de eDNA da espécie alvo é alta. Além do método ser útil para pesquisas realizadas em locais de difícil acesso, possui a vantagem de necessitar de pequenos volumes de água e requerer menos equipamentos comparado a outros métodos, podendo fixar

imediatamente qualquer eDNA em amostras de água. Já, a centrifugação e ultrafiltração são métodos de captura com limites de tamanho extremamente pequenos de poros. O eDNA pode ser coletado de amostras de água sem a necessidade de adicionar reagentes, e a simplicidade dessa abordagem permite testar grandes quantidades de amostras, porém o volume máximo de amostras é restrito devido ao tamanho da centrífuga, o que torna difícil sua aplicação em amostras com grande volume de água.

Em relação aos métodos de extração, purificação e amplificação de eDNA é importante a etapa de padronização, pois são procedimentos que podem afetar fortemente a detecção de eDNA. Os kits comerciais e o método de separação de fase líquida são usualmente utilizados na extração e purificação de eDNA coletados principalmente por filtração.

A detecção específica de uma espécie em uma amostra de DNA ambiental pode ser realizada por um método clássico baseado na amplificação e detecção de fragmentos curtos de DNA usando PCR com *primers* específicos da espécie alvo. Nesse caso, regiões de DNA mitocondrial, do cloroplasto ou nuclear podem ser utilizadas, sendo que o DNA mitocondrial se destaca para espécies animais por apresentar altas taxas de mutação, múltiplas cópias que podem ser encontradas em uma célula e um nível elevado de cobertura em bancos de dados genéticos.

Já, o DNA *metabarcoding* é um método de avaliação da biodiversidade baseado na utilização de uma região do DNA padronizada como um marcador para identificação rápida e precisa das espécies, consistindo em não apenas identificar uma única espécie de um espécime ou dos restos de um organismo, como também determinar a composição de espécies através de amostras ambientais. Nesse caso, utiliza-se pares de *primers* universais em amostras de eDNA de qualquer origem e ambiente para verificar a diversidade de grupos taxonômicos. E para isso, após a realização da amplificação

universal da região de código de barras alvo do eDNA, representando uma variedade de táxons, os fragmentos de DNA amplificados são sequenciados. Dessa forma, por meio de análises de bioinformática, um táxon conhecido será atribuído para cada sequência diferente de DNA resultante, pois a identificação de níveis taxonômicos exige uma comparação de sequências de eDNA com as sequências de um banco de dados, o que ressalta a importância da construção de um banco de dados de referência de espécies locais.

As aplicações do eDNA são bastante diversas e alguns exemplos podem ser destacados aqui. Na área de ecologia a detecção precoce e precisa de espécies raras, crípticas e invasoras, por exemplo, fornece a base para a adoção de ações de conservação apropriadas e para a compreensão dos padrões de distribuição e atividade das espécies. Pode-se aplicar o eDNA para documentar a chegada de espécies migratórias, avaliar o sucesso de restauração de um habitat ou repatriação de espécies em redes fluviais, e a possibilidade de estimar a abundância populacional.

Compreender a dieta e interações tróficas de espécies também é algo valioso para a pesquisa ecológica, e esses importantes processos são poucos estudados devido aos desafios metodológicos, mas o eDNA pode contribuir com esses estudos por possuir a capacidade de estimar a diversidade, composição e frequência de amostras de presas, analisando a dieta dos predadores através das amostras de suas fezes.

O estudo do eDNA de microrganismos pode fornecer informações valiosas sobre a diversidade bacteriana e a genômica funcional. O método de *metabarcoding* de eDNA, por exemplo, pode ser aplicado diretamente a microrganismos coletados que, de outra forma, precisariam de um amplo conhecimento taxonômico para serem identificados.

A respeito de ovos, a ecologia de desova é mais um assunto importante para a conservação ambiental, a identificação de áreas de desova e sua extensão espacial é essencial para o manejo e conservação eficaz das espécies. Com o uso do eDNA pode-se detectar espécies de forma não invasiva e independente do seu estágio de vida ou sexo. Geralmente, espera-se um aumento na taxa de detecção de DNA em amostras de água durante a época de reprodução e no período de desova das espécies-alvo, dessa forma, a frequência do comportamento reprodutivo e da razão sexual afeta facilmente e amplamente a concentração de eDNA na água, sendo necessário considerar a estação e horas de amostragem apropriadas para projetar o levantamento de eDNA.

Atenção especial deve ser dada para a construção de um banco de dados, que é extremamente importante na obtenção de informações que auxiliam na comparação de espécies locais para melhorar os resultados do método de *metabarcoding* de eDNA, principalmente para a identificação dos níveis taxonômicos de um organismo-alvo. À medida que as plataformas de sequenciamento evoluem, aumentam-se os dados de sequência aceitos em bancos de dados públicos para os marcadores de código de barras, o que impulsiona o seu uso pelos ecologistas e aperfeiçoa o *design* de métodos padronizados, permitindo um melhor *design* de primers 'universais'.

Por fim, é importante destacar que os métodos de eDNA apresentam aspectos positivos e negativos, pois há diversos fatores (bióticos, abióticos, moleculares, metodológicos, etc.) que podem influenciar negativamente a identificação e quantificação de espécies, análise de dados e interpretação de resultados. E por existir uma variedade de métodos e protocolos desenvolvidos individualmente para diferentes estudos de eDNA, sua escolha deve ser feita sempre visando o método mais adequado para a pesquisa a ser desenvolvida.

4. METABOLÔMICA E USO SUSTENTÁVEL DOS RECURSOS VEGETAIS

Em um mundo cada vez mais consciente dos desafios ambientais e das consequências das ações humanas sobre o planeta, a exploração sustentável dos recursos ambientais surge como uma necessidade urgente. A metabolômica está emergindo como uma valiosa ferramenta que pode ajudar a transformar a maneira como exploramos e gerenciamos os recursos vegetais. Sua utilização na exploração sustentável dos recursos vegetais vem alinhando as necessidades de preservação ambiental com o desenvolvimento econômico e inovação tecnológica. A literatura está repleta de estudos em que a metabolômica é empregada como ferramenta no melhoramento genético de espécies vegetais visando reduzir os impactos da agricultura, na caracterização de compostos bioativos, na conservação da biodiversidade e no desenvolvimento de produtos sustentáveis.

A metabolômica é uma área dinâmica e em desenvolvimento que consiste na análise abrangente de todos os metabólitos presentes em um determinado sistema (célula, tecido ou organismo) sob um determinado conjunto de condições. Por meio da metabolômica é possível identificar e quantificar de forma sistemática os metabólitos envolvidos nas interações bioquímicas dos organismos, elucidando assim interações, respostas e funções biológicas complexas. Ao contrário da genômica, transcriptômica e proteômica, a metabolômica representa as respostas mensuráveis finais (características/fenótipos bioquímicos) da função molecular de uma célula. Essas características não podem ser diretamente deduzidas por outras ômicas, devido à complexidade dos mecanismos regulatórios em níveis transcricionais. Portanto, a metabolômica é o método ômico mais preditivo, estabelecendo uma conexão mais próxima entre o genótipo e o fenótipo.

Metabólitos são pequenas moléculas que são resultantes de processos celulares em um organismo. Essas moléculas desempenham funções importantes nos fenômenos biológicos por meio do seu envolvimento direto na regulação de mecanismos fisiológicos. As plantas produzem uma ampla variedade desses compostos e estima-se, que existam mais de 200 mil metabólitos no reino vegetal. Os metabólitos vegetais podem ser classificados em dois grupos principais: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários desempenham funções estruturais, de desenvolvimento e armazenamento de energia, e são acumulados constitutivamente nas células vegetais. Por outro lado, os metabólitos secundários são essenciais para a sinalização, adaptação e sobrevivência em meio à vasta gama de interações entre o organismo e seu ambiente. Esses metabólitos são acumulados em tecidos específicos ou estágios específicos de desenvolvimento na planta. As plantas, por serem organismos sésseis, utilizam os metabólitos secundários como principal forma de defesa contra estresses bióticos e abióticos, desempenhando papel crucial na adaptação das plantas a ambientes que estão em constante alteração.

Os avanços na tecnologia e na instrumentação analítica abriram novas perspectivas para investigar a convergência entre biologia e química, proporcionando uma compreensão mais abrangente de fenômenos biológicos. Muitas ferramentas e técnicas analíticas são usadas em estudos de metabolomas. Atualmente, não há uma técnica analítica única capaz de medir todos os metabólitos em um único experimento, por isso, é necessário o acoplamento de técnicas analíticas para suprir as limitações individuais de cada método. Esse acoplamento implica em conectar duas técnicas distintas para aproveitar as vantagens de ambas, criando assim, um sistema mais eficaz ou completo. Desta forma, a maioria dos experimentos de metabolômica em plantas emprega a combinação de técnicas analíticas de separação e detecção, como a cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS)

e a cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta (CLAE-UV-DAD). Juntamente à ressonância magnética nuclear (RMN), esses são provavelmente, os métodos mais comumente aplicados aos estudos dos metabolomas. Em recentes artigos de revisão (Alawiye; Babalola, 2021; Shen *et al*., 2023), o fluxo de trabalho, metodologias analíticas e ferramentas de softwares comumente usados na pesquisa metabolômica de plantas, foram revisados. Os autores destacaram as aplicações, vantagens e desvantagens de cada plataforma analítica.

Inicialmente, as abordagens metabolômicas foram divididas em duas categorias: estudos alvos (do inglês, *targeted*) ou estudos direcionados, que focavam em metabólitos específicos ou classes de metabólitos em resposta a um estímulo, e estudos não-alvo (do inglês, *untargeted*), que analisavam todo o conjunto de substâncias de maneira menos específica. Com o tempo, surgiram subcategorias adicionais que refletem os diferentes objetivos e particularidades dos estudos metabolômicos (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação das abordagens metabolômicas

Termo	Descrição
Metabolite profiling	Identificação e quantificação de vários metabólitos, que podem fazer parte da mesma via metabólica ou pertencer à mesma classe de compostos, são realizadas. O método analítico empregado é ajustado para ser compatível com as propriedades químicas específicas das substâncias analisadas.
Metabolite target analysis	Antes da análise, os metabólitos são selecionados (direcionados) por meio de métodos como extração otimizada ou técnicas específicas de separação e detecção. A análise então se concentra exclusivamente nessas substâncias selecionadas. A escolha dos metabólitos pode ser baseada em conhecimentos prévios ou pode ser derivada de análises metabolômicas anteriores em larga escala.

As alterações nos níveis de metabólitos têm se mostrado altamente informativas em pesquisas sobre o crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas. Além disso, essa abordagem tem sido fundamental em pesquisas nos setores agrícola, alimentício, médico e farmacêutico. Assim, a metabolômica tem sido aplicada a uma ampla variedade de áreas e novas aplicações vêm sendo continuamente exploradas. No contexto do uso sustentável dos recursos vegetais, a metabolômica oferece uma série de ferramentas e abordagens que podem ser aplicadas com esse objetivo, como na identificação de metabólitos-chave envolvidos na resposta das plantas ao estresse; no melhoramento genético de plantas, visando reduzir os impactos da agricultura; na conservação da biodiversidade; e no desenvolvimento de produtos sustentáveis.

4.1 METABOLÔMICA E RESPOSTAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE

Diante dos desafios ambientais, é essencial desenvolver plantas tolerantes ao estresse biótico e abiótico, e aumentar a produtividade agrícola, visando reduzir a necessidade de cultivo de novas terras agrícolas para atender à demanda alimentar. A perda de rendimento das culturas é significativamente afetada por estresses bióticos e abióticos. Por meio da análise abrangente dos perfis metabólicos das plantas submetidas a condições de estresse hídrico, é possível identificar metabólitos-chave e compreender os mecanismos subjacentes à resposta das plantas à seca. Isso permite analisar como as plantas se desenvolvem, se adaptam e respondem defensivamente aos estresses ambientais.

Desta forma, os metabólitos estão emergindo como ferramentas confiáveis para investigar os mecanismos de tolerância e resistência ao estresse em plantas. Por exemplo, certos aminoácidos como glicina, serina, aminoácidos de cadeia ramificada, além de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, foram identificados em plantas como cevada, arroz e *Arabidopsis thaliana* sob condições de estresse. Essas informações ajudam a compreender como essas

plantas conseguem manter suas funções vitais em ambientes com escassez de água, e são essenciais para o desenvolvimento de plantas resistentes à seca. O perfil metabólico por GC-MS revelou que, variedades de arroz resistentes à ferrugem bacteriana apresentaram maiores quantidades de carboidratos, lipídios, alcaloides, acetofenona e xantofilas. A investigação metabolômica também revelou metabólitos ligados à resistência a nematoides em tomate. Essas informações direcionam o desenvolvimento de variedades de culturas menos suscetíveis a patógenos e pragas. Isso reduz a necessidade de agroquímicos, melhorando a sustentabilidade da produção.

4.2 METABOLÔMICA NO MELHORAMENTO DE ESPÉCIES VEGETAIS

O perfil metabólico é uma ferramenta poderosa para orientar o melhoramento, facilitando a identificação de características promissoras nos estágios iniciais de seleção. A combinação de abordagens metabolômicas e de mapeamento de associação revelou conexões entre regiões genômicas do milho e a composição do grão, o teor de amido na batata, e o teor de pigmento no tomate. A metabolômica juntamente com as outras ômicas permitem triagem e análise de alto rendimento, permitindo aos pesquisadores encontrarem marcadores genéticos e moleculares conectados a características de interesse como melhor rendimento, melhor qualidade da composição, e a análise do acúmulo de metabólitos nas diversas fases de desenvolvimento da planta. Portanto, as abordagens baseadas em ômicas fornecem recursos inestimáveis para o desenvolvimento de culturas resistentes a estresse biótico e abiótico, essenciais para a agricultura sustentável e a segurança alimentar.

Outros estudos metabolômicos visam comparar linhagens de plantas geneticamente modificadas com as não modificadas, ou examinar a influência de fatores genéticos e do local de cultivo e na função da planta. A integração da informação metabolômica com

dados de outras tecnologias ômicas auxiliam no desenvolvimento e análise responsável de culturas geneticamente modificadas, contribuindo para a avaliação da segurança e impacto ambiental.

4.3 METABOLÔMICA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE VEGETAL

O conjunto de ferramentas ômicas estão fazendo progressos nos desafios de conservação da biodiversidade. Nunca se teve tantas ferramentas à disposição para (re)explorar as propriedades úteis das espécies vegetais. Não é necessário explorar todas as propriedades de todas as espécies de forma aleatória. Em vez disso, pode-se utilizar as relações entre espécies, inferidas a partir de árvores filogenéticas robustas, para direcionar a exploração de características específicas. Por exemplo, pesquisas demonstraram o agrupamento filogenético de plantas medicinais, e a busca por compostos bioativos pode se beneficiar de um quadro filogenético preditivo.

Os avanços nos equipamentos analíticos e nas bases de dados espectrais de massa têm facilitado a identificação de compostos em extratos de fungos e plantas. A integração das tecnologias de metabolômica, transcriptômica e genômica aumentou a capacidade de avaliar e compreender a síntese bioquímica de compostos naturais em plantas e fungos. Junto com a modelagem *in sílico*, esses avanços otimizaram os programas de rastreamento para descoberta de medicamentos.

Além disso, houve progresso na otimização da produção desses compostos em culturas de plantas, fungos, algas e bactérias, utilizando condições de cultivo específicas e abordagens moleculares como engenharia metabólica e edição genética com CRISPR-Cas9. Assim, os avanços na análise molecular podem fornecer uma estrutura filogenética preditiva para direcionar pesquisas, acelerar a descoberta de biomoléculas úteis e aumentar a eficiência da produção dessas biomoléculas em laboratório. Isso pode orientar esforços de conservação para proteger a biodiversidade.

4.4 METABOLÔMICA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS SUSTENTÁVEIS

A metabolômica também tem sido aplicada ao aproveitamento de resíduos provenientes da agricultura e da produção industrial. Entre esses resíduos inclui-se tecidos vegetais rejeitados ou não comestíveis como poda, poda de frutas, resíduos florestais, e resíduos do processamento de alimentos como casca de arroz, palha de trigo e cascas de frutas. Normalmente, esses resíduos são descartados e acumulam-se incontrolavelmente em aterros sanitários. Adotar um modelo sistêmico e circular de 'reutilizar, reciclar e regenerar' é crucial para a sustentabilidade da indústria agrícola.

A valorização dos resíduos do setor agroalimentar baseia-se na ideia de que qualquer material residual ou subproduto pode servir como matéria-prima para extração, possibilitando a reintegração de compostos bioativos na cadeia produtiva. As abordagens baseadas na metabolômica ganharam interesse significativo por meio da identificação e/ou redescoberta de diversos compostos bioativos de alto valor, especialmente compostos fenólicos. Nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e nutracêutica, inúmeros produtos de valor agregado têm sido gerados por meio da reinserção de compostos de alto valor na cadeia produtiva, seguindo um modelo econômico circular. Exemplos incluem agentes espessantes, gelificantes e estabilizantes de alimentos de resíduos de tomate e frutas cítricas; conservantes alimentares, estabilizantes e agentes bactericidas de casca de batata; óleos essenciais de resíduos de laranja; biobutanol de casca de arroz; hidrogel de casca de durião; fonte de compostos com propriedades citotóxicas, anti-inflamatórias e anticancerígenas a partir de resíduos de processamento de erva-doce.

Embora a valorização desses subprodutos gere produtos de alto valor econômico, são necessárias mais pesquisas para tornar esse processo totalmente sustentável. A integração da metabolômica

pode aprofundar a compreensão dos perfis metabólicos desses subprodutos, aprimorando ainda mais o processo de valorização e aumentando o valor desses produtos.

Frente ao exposto, para a exploração sustentável dos recursos vegetais faz-se necessário o uso de tecnologias que combinem abordagens agrícolas inovadoras, práticas agronômicas sustentáveis a longo prazo e culturas resilientes ao clima. A metabolômica permite a utilização mais eficiente dos recursos vegetais e a reutilização de resíduos agroalimentares, além de ajudar na conservação da biodiversidade. Integrar a metabolômica com outras tecnologias ômicas complementares abre oportunidades para estudos de associação ômica, promovendo a valorização, compreensão e uso sustentável dos recursos vegetais.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento sobre as bases genéticas, expressão, vias metabólicas e os mecanismos subjacentes em diferentes organismos frente a condições adversas, pode ser amplamente complementado pelo uso das ciências ômicas supracitadas, visto a gama de dados que podem ser obtidos. Tais metodologias são capazes de identificar moléculas e permitir a caracterização de vias metabólicas com profundidade e especificidade não alcançadas por outras tecnologias até então descritas. Seu uso em conjunto tem contribuído para elucidar lacunas e interpretar interações complexas.

Em relação ao DNA ambiental e ao uso da metagenômica é necessário a continuidade de pesquisas relacionadas à obtenção de informações diversas de áreas como a biogeografia, biologia da conservação e ecologia, com o objetivo de evidenciar os fatores que influenciam na sua aplicação para o monitoramento ambiental.

Deve-se padronizar ao máximo possível as técnicas envolvidas para potencializar a captura de eDNA no campo, minimizar a degradação de amostras durante o transporte e armazenamento do eDNA, e diminuir taxas de erros em processos de isolamento e amplificação. O desenvolvimento de técnicas e protocolos mais aprimorados para diferentes espécies-alvo e ambientes são necessários, visando a avaliação e comparação de metodologias e protocolos para que as limitações existentes sejam minimizadas e tornem os métodos de eDNA ainda mais promissores e aplicáveis para o uso em estudos de monitoramento de ambientes.

Considerando a exploração sustentável dos recursos vegetais, a metabolômica poderá impulsionar avanços significativos por meio da integração de dados e bioinformática. O desenvolvimento de plataformas permitirá o armazenamento, gerenciamento e análise eficiente dos dados metabolômicos, integrando-os com dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos. Ferramentas de visualização e modelagem preditiva, poderão identificar padrões metabólicos específicos que estão associados a determinadas condições fisiológicas ou ambientais. Isso inclui a detecção de biomarcadores para resistência ao estresse, produtividade e qualidade nutricional, que poderão auxiliar no melhoramento genético. Além disso, a análise dos perfis metabólicos das plantas permitirá ajustes precisos nas práticas de manejo agrícola. A metabolômica também poderá desempenhar um papel crucial na valorização e conservação de plantas nativas e subutilizadas, identificando compostos de interesse farmacêutico, nutracêutico e industrial. Isso contribuirá para a conservação da biodiversidade e o uso sustentável dos recursos naturais. Em suma, a metabolômica se apresenta como uma importante ferramenta para a inovação e a sustentabilidade, abrindo caminho para práticas agrícolas mais eficientes e ecologicamente responsáveis.

6. REFERÊNCIAS

ALAWIYE, T. T.; BABALOLA, O. O. Metabolomics: Current application and prospects in crop production. **Biologia**, v. 76, n. 1, p. 227-239, 2021.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 17, p. 1–17, 2016.

BENG, K. C.; CORLETT, R. T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, p. 2089-2121, 2020.

CRESCENZI, M. A.; D'URSO, G.; PIACENTE, S.; MONTORO, P. LC-ESI/LTQ Orbitrap/MS metabolomic analysis of fennel waste (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a by product rich in bioactive compounds. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1893, 2021.

HARPER, L. R.; BUXTON, A. S.; REES, H. C.; BRUCE, K.; BRYS, R.; HALFMAERTEN, D.; READ, D. S.; WATSON, H. V.; SAYER, C. D.; JONES, E. P.; PRIESTLEY, V.; MÄCHLER, E.; GARCÉS-PASTOR, S.; MEDUPIN, C.; BURGESS, K.; BENSON, G.; BOONHAM, N.; GRIFFITHS, R. A.; HANDLEY, L. L.; HÄNFLING, B. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. **Hydrobiologia** v. 826, p. 25–41, 2019.

HONG, J.; YANG, L.; ZHANG, D.; SHI, J. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 767, 2016.

HRDLICKOVA R, TOLOUE M, TIAN B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 8, n. 1, p. 10.1002, 2017.

KHAKSAR, G.; SIRIJAN, M.; SUNTICHAIKAMOLKUL, N.; SIRIKANTARAMAS, S. Metabolomics for agricultural waste valorization: Shifting toward a sustainable bioeconomy. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 938480, 2022.

LOPEZ-SANCHEZ, P.; DE VOS, R. C. H.; JONKER, H. H.; MUMM, R.; HALL, R. D.; BIALEK, L.; LEENMAN, R.; STRASSBURG, K.; VREEKEN, R.; HANKEMEIER, T.; SCHUMM, S.; VAN DUYNHOVEN, J. Comprehensive metabolomics to evaluate the impact of industrial processing on the phytochemical composition of vegetable purees. **Food Chemistry**, v. 168, p. 348-355, 2015.

MCARDLE AJ, MENIKOU S. What is proteomics? **Arch Dis Child Educ Pract Ed.,** v. 106, n. 3, p. 178-181, 2021.

SUMÁRIO

MCCOMBIE, W. R.; MCPHERSON, J. D.; MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Technologies. **Cold Spring Harb Perspect Med,** v. 9, n. 11, p. A036798, 2019.

MINAMOTO, T.; NAKA, T.; MOJI, K.; MARUYAMA, A. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. **Limnology**, v. 17, p. 23–32, 2016.

MMBANDO, G. S. Omics: A new, promising technologies for boosting crop yield and stress resilience in African agriculture. **Plant Stress**, p. 100366, 2024.

NUNES, A. R. C.; MANGOLIN, C. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C.; AVINCOLA, A. S.; ALMEIDA, R. T R.; PILAU, E. J.; MACHADO, M. F. P. S. *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) as a source of natural antioxidants: Phenolic compounds and antioxidant activity of cladode extracts in two collection periods. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 984-991, 2022.

OH, S. W.; IMRAN, M.; KIM, E. H.; PARK, S. Y.; LEE, S. G.; PARK, H. M.; JUNG, J.W.; RYU, T. H. Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1192235, 2023.

RUPPERT, K. M.; KLINE, R. J.; RAHMAN, M. S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation 17**, v. 17, 2019.

SHEN, S.; ZHAN, C.; YANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. **Molecular Plant**, v. 16, n. 1, p. 43-63, 2023.

STEWART, K. A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, p. 983–1001, 2019.

SUN, W.; CHEN, Z.; HONG, J.; SHI, J. Promoting human nutrition and health through plant metabolomics: **Current Status and Challenges. Biology**, v. 10, n. 1, p. 20, 2020.

THOMSEN, P. F.; WILLERSLEV, E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, v. 183, p. 4–185, 2015.

TSUJI, S.; TAKAHARA, T.; DOI, H.; SHIBATA, N.; YAMANAKA, H. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis - A review of methods for collection, extraction, and detection. **Environmental DNA**, v. 1, p. 99–108, 2019.

Parte 2

BIODIVERSIDADE, BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO

2.1

Maria de Fátima Pires da Silva Machado
Arildo José Braz de Oliveira
Jesieli Beraldo Borrazzo
Claudete Aparecida Mangolim

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE CULTURAS VEGETAIS *IN SITU* E *IN VITRO*

1. INTRODUÇÃO

O uso etnofarmacológico histórico das plantas baseado na transferência intergeracional do conhecimento de tentativa e erro para seleção de substâncias botânicas de importância curativas, possibilitou como triagem preliminar, a descoberta de compostos medicinais a partir de fontes vegetais (Buenz *et al*., 2017). A contribuição etnofarmacológica para a bioprospecção de produtos naturais à base de plantas, permite atualmente considerá-las como ricas fontes em fitoconstituintes bioativos com alto valor medicinal, cosmético, nutracêutico e, portanto, econômico (Shahnawaz, 2021).

O potencial das plantas em fornecerem uma infinidade de compostos bioativos de importância para vida do homem, está ligada a uma característica intrínseca deste organismo, a sessilidade. Diante de diversos estressores sejam estes bióticos e abióticos, as plantas desenvolveram a capacidade de fabricar moléculas especializadas que garantam sua sobrevivência no habitat em que estão inseridas, sendo estas relacionadas a comunicação, nutrição, defesa de nicho e/ou para inibir o crescimento de competidores, ataques de animais (herbívoria e fitófagos), microrganismos patogênicos, resistência a estresse hídrico, salino, oxidativo, entre outros (Nielsen *et al*., 2019; Bhaskar *et al*., 2022). Além disso, as plantas desenvolveram capacidade de estabelecer interações heteroespecíficas em diversos níveis multitróficos do ecossistema, tais como com microbiomas ambiental, representando assim, uma unidade complexa única para a produção aprimorada de compostos bioativos (Singh *et al*., 2020).

Estas mesmas moléculas, chamadas de metabolitos especializados, conferem às plantas características relacionadas ao bem-estar humano como o exalar de aromas, a contemplação de sua diversidade de cores. Contudo, o fornecimento de compostos bioativos de importância em diversos setores como o farmacêutico,

cosmético, nutracêutico, agrário, têxtil, energético são os fatores cruciais que impactam no bem-estar humano (Weng *et al*., 2012; Thomford *et al*., 2018).

De acordo com agência *BBC research*, espera-se que o mercado global de fitoterapia aumente de US$ 169,1 bilhões em 2023 para US$ 279,8 bilhões até o final de 2028. Como exemplo, o mercado global de ingredientes para setores de usuários finais de aromas e fragrâncias deve atingir US$ 1,8 trilhão até 2024. Além disso, a diversidade química fornecida pelos produtos naturais botânicos é imprescindível para o desenvolvimento de farmacóforos essenciais para a melhoria contínua principalmente dos setores químico e medicinal. Afinal, essas moléculas têm evoluído ao longo de milhões de anos para interagir com proteínas e outras biomoléculas, o que as tornam particularmente valiosas na descoberta de novos farmacóforos (Altemimi *et al*., 2017; Newman; Cragg, 2020; Chaachouay; Zidane, 2024).

A biossíntese de metabólitos especializados geralmente é pouco abundante nas plantas, ou seja, produzida em baixa quantidade porque as plantas que estão inseridas na natureza estão sujeitas a diversos fatores que influenciam nas concentrações de seus compostos bioativos (Ralphs; Gardner, 2001; Salmore; Unter, 2001; Puricelli *et al*., 2002). Neste sentido, estratégias biotecnológicas como sistemas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* têm sido extensivamente estudadas para a produção em larga escala de exemplares vegetais de interesse e para otimizar a obtenção de compostos vegetais bioativos (Kutney, 1996; Boungard *et al*., 2001; Sato *et al*., 2001). A cultura de células vegetais *in vitro,* permite que metabólitos de interesse biotecnológico sejam obtidos em um ambiente controlado, independente de variações climáticas e infecção por patógenos de forma confiável e previsível.

No presente capítulo, serão apresentados os aspectos gerais sobre cultura de tecidos vegetais *in vitro* e a importância desta ferramenta biotecnológica para a obtenção de compostos bioativos como também a bioprospecção *in situ* de cultura vegetais de interesse.

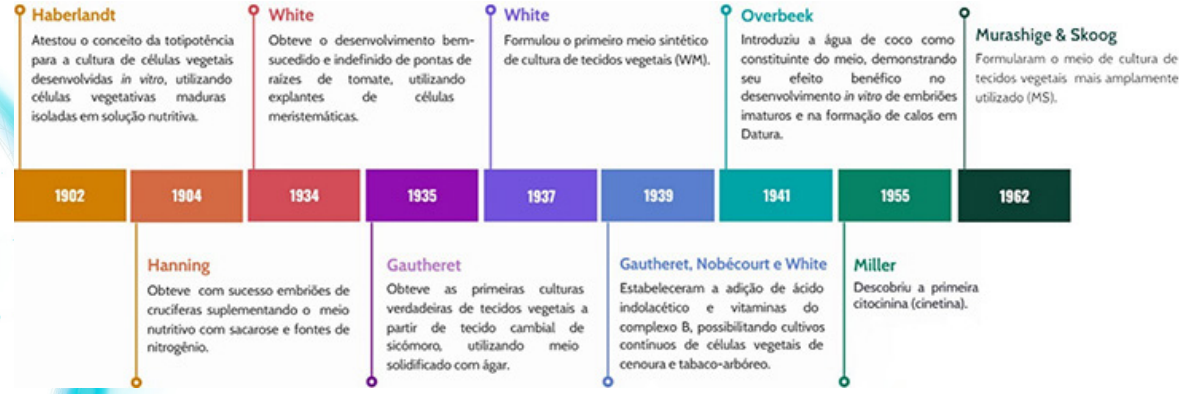
2. HISTÓRICO

A capacidade de células em expressar totipotência, permite que células vegetais desenvolvidas *in vitro* regenerem tecidos, órgãos e até plantas inteiras através de um processo de desdiferenciação celular e subsequente diferenciação (Georgiev *et al*., 2009; Barbulova *et al*., 2014). Esta teoria foi postulada por Schleiden (1938) e por Schwann (1939) que afirmaram que toda célula é autônoma e, portanto, contém o potencial necessário para originar um organismo completo, no contexto da biotecnologia vegetal, uma planta completa. A teoria da totipotencialidade foi o fundamento para o desenvolvimento da cultura *in vitro.*

Os primeiros estudos utilizando tecnologia vegetal para o desenvolvimento de culturas de tecidos in *vitro* foram iniciados em 1902 por Gottlieb Haberlandt, reconhecido como pai da cultura de tecidos vegetais por atestar o conceito da totipotencialidade para a cultura de células vegetais desenvolvidas *in vitro*. Haberlandt, indicou que seria possível cultivar com sucesso embriões artificiais a partir de células vegetativas, após não obter êxito com o desenvolvimento de células vegetais maduras isoladas em solução nutritiva. Após a contribuição pioneira de Hanberlandt, muitos outros pesquisadores também colaboraram com desenvolvimento de técnicas para o estabelecimento da cultura de tecidos vegetais *in vitro*.

Abaixo segue uma ilustração destacando os principais marcos iniciais alcançados para o estabelecimento atual da cultura de tecidos vegetais *in vitro* e a contribuição de importantes pesquisadores para a história da biotecnologia vegetal (Figura 1).

Figura 1. Principais marcos no desenvolvimento da cultura de tecidos vegetais *in vitro*



Baseado em Bhojwani e Dantu (2013) e Park (2021).

Deste modo, um pequeno pedaço de tecido vegetal quando cultivado em condições *in vitro*, em um meio de cultivo adequado e com uma determinada combinação de reguladores de crescimento (que simulam os efeitos dos hormônios), pode ser estimulada a crescer desenvolvendo organismos vegetais completos ou suas estruturas de interesse, dependendo da determinação das condições de manutenção das culturas e da combinação dos reguladores de crescimento utilizados. Por outro lado, também dependente das mesmas condições, algumas ou muitas células de tecido vegetal podem ser estimuladas a se dividirem indefinidamente formando assim, uma massa celular não diferenciada de células vegetais, chamada de calos (Machado *et al*., 1999).

Portanto, a partir da técnica de cultura de células e tecidos vegetais uma infinidade de processos biotecnológicos podem ser gerados, como exemplo a *i)* conservação de recursos genéticos seja por micropropagação de plantas de interesse, *ii)* preservação de germoplasma e criopreservação, *iii)* fusão de protoplastos para produção de híbridos somáticos, *iv)* produção de sementes sintéticas, *v)* mutagênese *in vitro, vi)* polinização *in vitro, vii)* produção de variantes somaclonais, *viii)* produção de vacinas e compostos

bioativos de interesse, *ix)* produção de haploides e haploides duplos, *x)* melhoramento poliploide e atualmente *xi)* o uso das novas técnicas emergentes que permitem a geração de plantas editadas por genes, além da *xii)* manipulação genética para produção de culturas transgênicas (Pathirana; Carimi, 2024).

3. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais seja primordialmente para o estabelecimento de culturas vegetais axênicas ou para a produção e obtenção de compostos vegetais bioativos é dependente de vários fatores. Como mostrado na Figura 1, muitos parâmetros nutricionais foram definidos para ser possível o desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro*. Além disso, outras condições são fundamentais para a manutenção de culturas vegetais tais como: *i) o*rganização estrutural para fornecimento de um ambiente controlado para luz e temperaturas específicas; *ii) f*ornecimento de meios de cultivos nutritivos definidos; *iii)* obtenção de explantes (tecido vegetal); *iv) e*stabelecimento de técnicas assépticas.

Em termos gerais, existem dois tipos de culturas de tecidos vegetais. O primeiro chamado de 'organizado', está atrelado ao processo de micropropagação vegetativa para obtenção de genótipos vegetais inteiros ou para o desenvolvimento de culturas de raízes, culturas brotos, cultura embrionárias e cultura de órgãos, através dos processos de embriogênese somática direta e organogênese (George *et al*., 2008; Park, 2021).

Em segundo lugar, outro tipo de cultura de tecidos vegetais é nomeado como 'desorganizado' e compreende o cultivo de células vegetais em suspensão e de estruturas chamados de calos. Calos vegetais são agregados celulares de crescimento descontrolado,

desdiferenciado que formam uma biomassa vegetal irregular a partir de tecido parenquimatosos meristemáticos. Em culturas primárias de calos provenientes de alto conteúdo de parênquima ou células meristemáticas, há apenas um número limitado de tipos de células e, portanto, existe uma maior homogeneidade histológica. Contudo, o crescimento induzido após a transferência dos explantes vegetais para fontes com suprimento de condições ideais de nutrientes e vitaminas específicas, resulta em uma estrutura desorganizada que pode eventualmente apresentar diferenciação celular, mas que agora constitui-se em grande parte de células diferentes daquelas do explante original (Neumann *et al*., 2009; Park, 2021).

A formação de uma massa irregular de tecido vegetal *in vitro* ocorre por meio de reguladores de crescimento vegetal como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, entre outros. Assim, a indução para se dividir e sofrer divisões celulares sucessivas, ocorre a partir de um pequeno pedaço de tecido vegetal (explante) excisado e esterilizado superficialmente e após plantado em meio de cultivo. Geralmente 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é a auxina mais comumente usada para induzir a formação de calos. Tais divisões celulares ocorrem a partir das extremidades cortadas e estendem-se gradualmente por toda a superfície do explante, formando assim estruturas celulares irregulares. Os calos podem ser multiplicados como tecido desorganizado por períodos de tempo ilimitado por meio de subculturas periódicas em meio fresco com indutores (Park, 2021).

A heterogeneidade celular observada em cultura de calos *in vitro,* reflete-se em características morfológicas diversas desde *i)* coloração mais clara a escura, a serem *ii)* mais friáveis ou compactos, *iii)* apresentarem maior ou menor teor de água e principalmente *iv)* apresentarem considerável variação de potencial quimiossintético. Então no que se refere a característica de friabilidade, o tecido do calo tornar-se progressivamente friável devido à realização das repetidas subculturas em meio contendo ágar, ou induzida por alterações da composição reguladora de crescimento do meio.

Os calos com friabilidade são desejáveis para formar cultura de células vegetais finas em suspensão, ou seja, em meio líquido (Pavlov e Blay, 2018; Park, 2021).

Dentre as mais importantes aplicações biotecnológicas da cultura de calos *in vitro,* destaca-se a produção de compostos vegetais bioativos. A cultura de calos *in vitro* permite que metabólitos de interesse biotecnológico sejam obtidos de forma contínua e confiável, uma vez que a manutenção da característica de plasticidade celular vegetal para a produção de metabólitos por meio de tecidos vegetais intactos, pode ser utilizada como iniciadores para estabelecimento de culturas de células vegetais em escala industrial de alto valor biológico e financeiro (Larkin; Scowcroft, 1981; Ikeuchi *et al*., 2013; Lystvan *et al*., 2018; Chandran, 2020). Grande parte destes compostos vegetais bioativos produzidos *in vitro*, possuem atividade biológica já relatadas de importância em áreas como da saúde, alimentícia e agrícola (Efferth, 2019).

3.1 *CEREUS PERUVIANUS* MILL.

Plantas de cactos da espécie *Cereus peruvianus* Mill. (sinonímia de *C. hildmannianus* K. Schumam de acordo com Assis *et al*., 2001) são popularmente conhecidas como mandacaru. Esta espécie de planta possui morfologia e adaptações peculiares como caules colunares de hipoderme suculenta e mucilaginosa, dispostas em estruturas chamadas de cladódios, compostos por 'costelas' longitudinais de número variável de 4 a 6, que podem alcançar altura superior a 10 metros. Os cladódios possuem espinhos como estruturas foliares modificadas e uma epiderme espessa recoberta por uma cutícula cerosa impermeável (Figura 2 A e B). O desenvolvimento dessas estruturas especializadas está relacionado a mecanismos de adaptação que atribuem a esta planta uma alta eficiência do uso de água, que lhes conferem capacidade de prosperar em condições

adversas com escassez de água ou com altas temperaturas, ou seja, em ecossistemas áridos e desérticos e, portanto, as categorizam como cactáceas.

Figura 2. Planta da espécie *Cereus peruvianus* apresentando a sua forma colunar (A) e cladódio de *C. peruvianus*, mostrando em detalhes as colunas com as aréolas e os espinhos (B)

Fonte: Nunes (2017).

A sua resiliência às condições de seca torna-a uma planta importante no combate à desertificação e no apoio à biodiversidade em regiões semiáridas, ao promover a melhora da qualidade do solo, retendo água e aumentando assim a produtividade agrícola em áreas áridas. No Brasil, as plantas do gênero *Cereus* possuem grande importância socioeconômica, pois são usadas como recurso alimentar pela população de regiões áridas em períodos de seca rigorosos devido seu alto teor de água e valor nutricional. Em Israel, a espécie *C. peruvianus* é utilizada em programas de melhoramento genético devido sua produção de frutos que possuem alto valor comercial em países da Europa, onde é amplamente aceito pela população como fruto exótico (Mizrahi; Nerd, 1999; Sitrit *et al*., 2012; Mizrahi, 2014).

De acordo com Santos *et al*. (2021), as propriedades farmacológicas relatadas e encontradas na espécie *C. peruvianus,* a inclui na categoria de plantas medicinais por sua utilização na medicina tradicional, e por possuir compostos bioativos relacionados a diversas atividades biológicas conhecidas, como flavonoides, alcaloides, polissacarídeos, taninos, vitamina C, entre outras. Aos referidos compostos encontrados em plantas de *C. peruvianus,* são atribuídas por exemplo atividades biológicas como ação antioxidante, anticancerígena, anti-helmíntico, antimicrobiana. Além disso, plantas de *C. peruvianus* são reconhecidas também como fonte de compostos bioativos utilizados na indústria cosmética e alimentícia (Alvarez *et al*., 1992; 1995), como nutracêuticos (Luma, 2012), e em aplicações industriais para tratamento de efluentes devido sua capacidade biossorvente por meio de polissacarídeos complexos isolados de *C. peruvianus* (Nozak *et al*., 1993; Barros; Nozaki, 2002; Souza *et al*. 2016; Freitas *et al*., 2018). Um efeito gastroprotetor inibindo lesões gástricas em ratos foi observado por Tanaka *et al*. (2010), além de propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas (Souza *et al*., 2017) e redução do peso corporal em ratos Wistar submetidos a uma dieta rica em gordura (Bernardi *et al*., 2013; ViaFarma, 2017).

3.2 MODELO DA CULTURA DE CALOS DE *CEREUS PERUVIANUS*

Muitas espécies de plantas são classificadas como suscetíveis ou ameaçadas de extinção, isto porque além do seu desenvolvimento ocorrer de forma lenta, a redução de seus habitats naturais por ações antrópicas ou sua exploração pela coleta excessiva para fins comerciais, colocam em risco a conservação de recursos genéticos importantes que representam (Giusti *et al*., 2002; Neelakandan; Wang, 2012). Grande exemplo do risco desta exploração em massa foi ao germoplasma da família Taxaceae na década de 90. Uma espécie de árvore gimnosperma perene não resinosa, economicamente valiosa pelo seu composto bioativo contra células do câncer de mama, o taxol®. As espécies de *Taxus*

baccata (Teixo Europeu ou Teixo Inglês) e *T. brevifolia* (Teixo Pacífico), foram praticamente dizimadas na Europa por empresas farmacêuticas que utilizavam grandes quantidades de material vegetal para extrair as moléculas do medicamento taxol®, sendo estas plantas praticamente extintas do seu ambiente natural (Huxtable, 1992).

Diante disso, o desenvolvimento da técnica de cultura de tecidos de calos *in vitro* de *C. peruvianus* para a obtenção de compostos de interesse econômico e industrial e também para a obtenção em larga escala de plântulas *in vitro* de *C. peruvianus,* foi implementada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese Vegetal (LCTEV), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), na década de 90 do século passado (1990), e vem sendo mantida desde então no Laboratório de Genética e Biotecnologia de Plantas da referida Instituição (Figura 3).

Figura 3. Cultura de calos *in vitro* de *Cereus peruvianus* do laboratório LCTEV-UEM. Câmara climatizada para manutenção da cultura de calos (A). Subculturas de calos (B). Calos jovens e friáveis de *C. peruvianus* (C)

A cultura de calos de *C. peruvianus* foi estabelecida pelo grupo de pesquisa LCTVE mediante tentativas de obter plântulas axênicas de *C. peruvianus*. Como o número plântulas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* foi baixo e a estrutura de botões axilares (aréolas) extraídos de plantas adultas resultou em uma alta taxa de contaminação, definiu-se que as plantas seriam obtidas a partir do estabelecimento de culturas de calos de *C. peruvianus* e mantidos em diferentes condições de cultivo [Patent number BR 102012007410–9]. Desta forma, os estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LCTEV e publicado por Oliveira *et al*. (1995), estabeleceram a forma de obtenção de plantas de *C. peruvianus* regeneradas *in vitro*. As plantas regeneradas foram obtidas a partir de calos, induzidos a partir de segmentos extraídos do hipocótilo de plântulas formadas após a germinação *in vitro* de sementes. Os calos formados foram mantidos em condições adequadas de cultivo até a regeneração de plantas que foram denominadas somaclones (Oliveira *et al*., 1995).

Os somaclones, também designados de regenerantes clonais (R_0) foram regenerados a partir da cultura de calos induzidos utilizando meio de cultura MS (Murashige; Shoog, 1962) contendo vitaminas do meio B5 (Gamborg *et al*., 1968), suplementado com sacarose 3% e diferentes combinações dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e N-(2-furanilmetil)-1H-punina-6 amina (KIN), gelificado com agar 0,8% (Oliveira *et al*., 1995). Subculturas dos calos produzidos foram realizadas em intervalos de 15 dias e após 18-20 semanas do início da cultura de um total de 23 gerações somaclonais, calos friáveis de *C. peruvianus* produziram brotos. Após período de aclimatação, no ano de 1997, as populações de somaclones foram transferidas e plantados no Jardim Botânico no campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (23º 24′12,0′′S, 51º 56′ 22.5′′ W), onde se encontram estabelecidas até os dias atuais (Figura 4). Desde então, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa com a cultura de calos, com os regenerantes clonais, como também com plantas de populações naturais de *C. peruvianus*.

Figura 4. Plantas somaclones desenvolvidas partir de cultura de calos *in vitro* de *Cereus peruvianus*. Germinação de sementes de *C. peruvianus in vitro* (A); Calos de *C. peruvianus* (B); Obtenção de plântulas somaclones de *C. peruvianus* (C); Plantas regeneradas *in vitro* estabelecidas na natureza (D)

Fonte: A, B e C: Oliveira et al. (1995); D: Autores.

Os primeiros estudos se concentraram na análise da expressão gênica no desenvolvimento das culturas de calos e das plantas regeneradas *in vitro* de *C. peruvianus* (Mangolin *et al*., 1993; 1994a, b; 1997). Isto porque o estabelecimento da cultura de tecidos vegetais *in vitro,* promove instabilidade genética mediante o estresse celular gerado às células vegetais que para formarem estruturas de calos a partir de tecido vegetal diferenciado, um processo inverso ao da diferenciação celular deve ocorrer, o de desdiferenciação. Este processo acaba por provocar um choque genômico nas células vegetais que reestruturam seus genomas gerando assim, os chamados variantes somaclonais. Estas variações ocorrem tanto em nível genético, como também em nível fenotípico. Esse processo decorre também de que diferentes tipos de tecidos vegetais (explantes) têm diferentes propensões para

variação somaclonal. Explantes mais jovens ou menos diferenciados, como embriões ou células meristemáticas, tendem a ter menos variação somaclonal. E, quanto maior o número de subculturas e o tempo de manutenção das culturas *in vitro*, maior a chance de ocorrer variação somaclonal ao longo do tempo (Ranghoo-Sanmukhiya, 2021; Sánchez-Romero, 2024). A identificação desta variabilidade genética em culturas de calos e das plantas regeneradas *in vitro* de *C. peruvianus,* foi investigado pelo grupo de pesquisa através de análises moleculares genômicas para detecção de proteínas e isozimas vegetais alterados (Mangolin *et al*., 1993; 1994a, b; 1997).

Contrastantes variações morfológicas foram observadas nas estruturas caulinares das plantas regeneradas de *C. peruvianus* atribuída a variação somaclonal. As plantas regeneradas apresentaram caules com morfologia atípica e aréolas com disposição transversal, divergentes das plantas desenvolvidas a partir de sementes que apresentam caules eretos e aréolas de disposição linear (Mangolin *et al*., 1997).

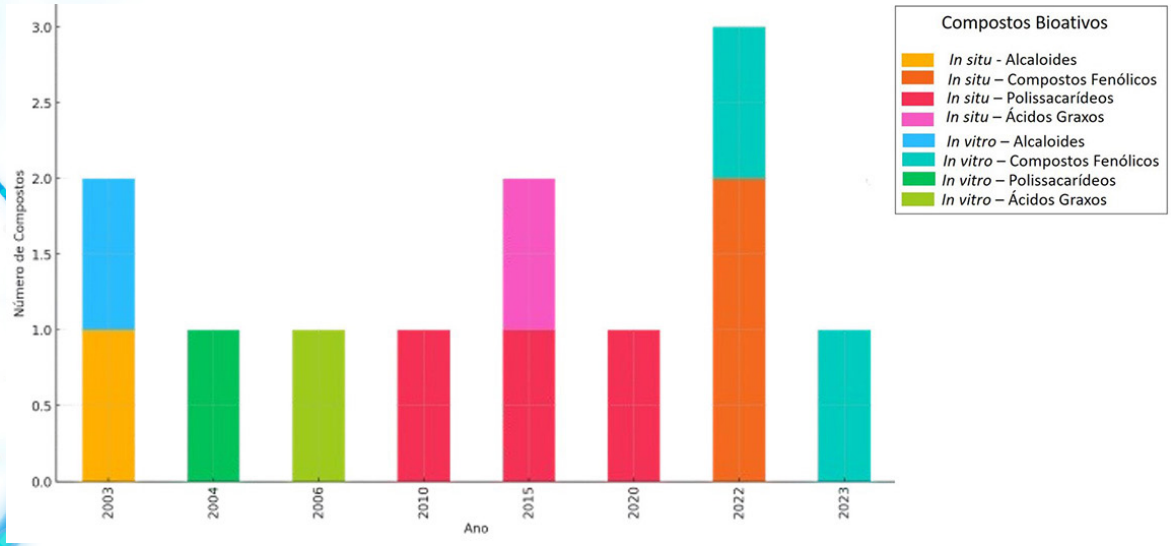
4. BIOPROSPECÇÃO PARA PLANTAS DE *CEREUS PERUVIANUS*

Dentro do amplo espectro de aplicações biotecnológicas da cultura de tecidos vegetais, a bioprospecção de compostos bioativos é uma importante estratégia da tecnologia vegetal. Bioprospecção foi inicialmente definida como o processo de exploração de substâncias produzidas no interior de organismos vivos (Moghe *et al*., 2017; Dixit *et al*., 2021). Mas, em 1993, este conceito inicial foi redefinido por Reid e colaboradores como 'prospecção da biodiversidade', sendo então, atualmente definida como atividade biotecnológica de investigação, identificação, classificação, avaliação e exploração sistemática da

diversidade de organismos existentes em determinado local, como novas fontes de compostos químicos, genes, proteínas e outros produtos que possam ter potencial para fins comerciais (Skirycz *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2020; Hussain *et al*., 2022; Marques *et al*., 2022).

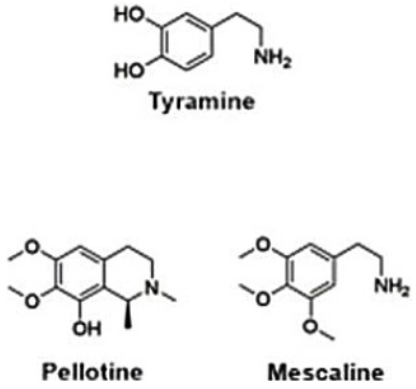
Desta maneira, a bioprospecção permite que compostos biológicos importantes biotecnologicamente sejam obtidos a partir de organismos modelos *in vitro*, mas também que espécies vegetais específicas a nichos ambientais sejam exploradas quanto sua capacidade e influência para a produção de compostos bioativos *in situ*. Os metabolitos especializados vegetais são compostos por três classes químicas principais, sendo estes alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides (Sruthi; Jayabaskaran, 2021). A Figura 5 mostra a evolução da identificação de compostos bioativos em plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* e em calos cultivados *in vitro* realizados no laboratório LCTEV.

Figura 5. Metabólitos especializados identificados em plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* e regeneradas *in vitro*



Os alcaloides são compostos orgânicos naturais encontrados em muitas espécies de plantas, e por isso, fazem naturalmente parte da dieta humana. Aos alcaloides são atribuídos importantes atividades biológicas desde atividade antidiabética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena a antimicrobiana (Gutiérrez-Grijalva, 2020; Rajput *et al*., 2022). Os calos de *C. peruvianus* têm evidente potencial para produção de alcaloides, pois segundo Oliveira e Machado (2003), os níveis de alcaloides produzidos em tecidos calosos foram duas vezes mais altos do que em plantas de *C. peruvianus*. Em recente estudo realizado por Santos *et al*. (2023), a identificação por UHPLC-ESI-QToF-MS/MS de proto-alcalóides e alcaloides em plantas de *C. peruvianus* desenvolvidas na natureza e de calos *in vitro* (Figura 6), apresentaram atividade fungistática contra espécies de *Candida glabrata* e *C. parapsilosis*, sendo que a maior atividade inibitória foi demonstrada para o extrato da cultura de calos obtido *in vitro.*

Figura 6. Estrutura química de alcaloides e proto-alcaloides isolados de plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* e de calos *in vitro*



Fonte: Santos et al. (2023).

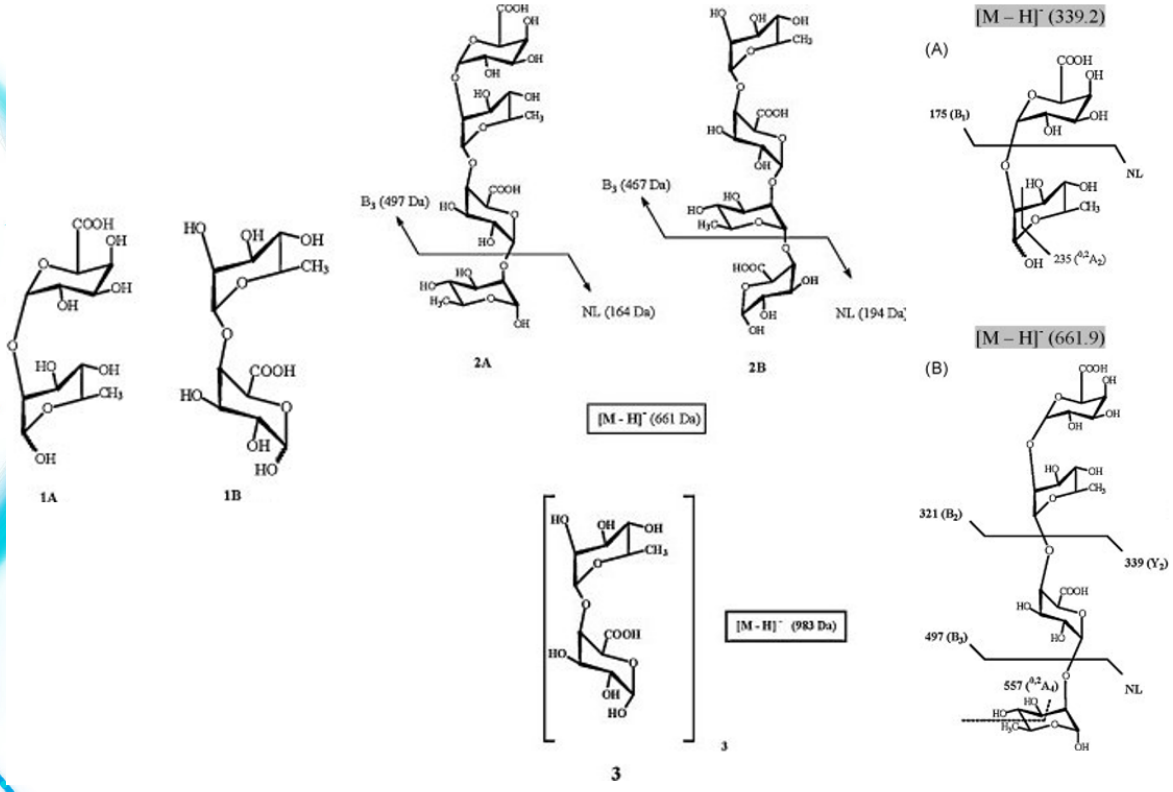
Outra classe de compostos bioativos importante de plantas e característico de *C. peruvianus* são os polissacarídeos, que atribuem a característica mucilaginosa as plantas de *C. peruvianus.*

Os polissacarídeos são polímeros de açúcar com reconhecidas atividades farmacológicas (Yarley *et al.*, 2021). A composição glicosilada de polissacarídeos de cladódios de plantas obtidas de sementes e de tecidos de calos cultivados *in vitro* de *C. peruvianus,* consistiu principalmente em galactose, arabinose e ramnose, inicialmente identificados por Machado *et al*. (2004). Em estudos posteriores, os polissacarídeos das plantas obtidas de sementes e de tecidos de calos cultivados *in vitro* apresentaram atividade aintiulcerogênica para lesões gástricas induzidas em ratos (Tanaka *et al*., 2010; Jayme *et al*., 2015).

O efeito gastroprotetor de polissacarídeos de calos alcançou 42% de inibição sendo semelhante à produzida por cimetidina (46%), medicamento de referência para o tratamento de úlceras gástricas (Jayme *et al*., 2015). A atividade ulcerogênica do polissacarídeo isolado de plantas de *C. peruvinaus* obtidas de sementes foi atribuído a um arabinogalactano (Figura 7; (Tanaka *et al*., 2010). Em pesquisa realizada por Corrêa *et al*. (2020), foi identificado que polissacarídeos de duas variantes morfológicas de somaclones de *C. peruvianus*, também produzem polissacarídeos arabinogalactano tipo I e arabinoxilana (Figura 8).

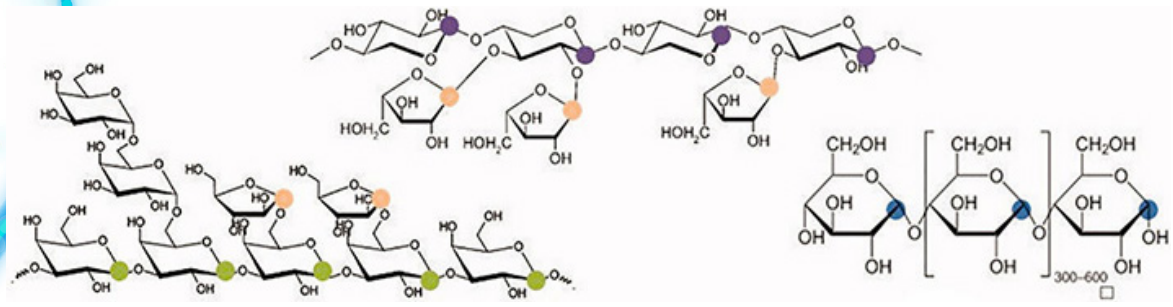
SUMÁRIO

Figura 7. Estrutura química proposta através de ionização por eletrospray (ESI-MS1 E MS2) para o polissacarídeo arabinogalactano de plantas germinadas naturalmente de *C. peruvianus*



Fonte: Tanaka et al. (2010).

Figura 8. Polissacarídeos da parede celular de somaclones de *C. peruvianus*



Fonte: Corrêa et al. (2020).

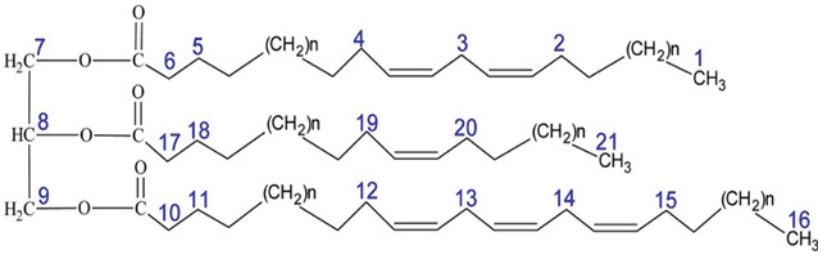
Os ácidos graxos são macromoléculas importantes que atuam como fonte de energia e em importantes processos celulares. O consumo de gorduras chamadas de monoinsaturadas e poli-insaturadas (PUFAs), são indicadas medicinalmente devido sua atividade cardioprotetora. Os PUFAs particularmente possuem papel vital na saúde e nutrição humanas por atuarem contra distúrbios do sistema nervoso, reações inflamatórias e possuírem atividade anticancerígena (Zárate *et al*., 2017; Kapoor *et al*., 2021). Lipídeos provenientes de óleos vegetais são uma importante classe de ácidos graxos pois, são isentos de colesterol, um ácido graxo prejudicial à saúde encontrado normalmente em gorduras animais, as plantas contêm os chamados fitoesteróis que devem ser incluídos na dieta humana para a promoção da saúde geral (Sabikhi e Kumar, 2012; Avato; Tava, 2022). Além disso, os lipídios provenientes de óleos vegetais são biomoléculas de importância aos setores cosmético e nutracêutico.

Neste contexto, lipídeos foram extraídos de cultura de calos de *C. peruvianus.* O ácido linoleico (C18:2) foi o principal componente de ácidos graxos insaturados na cultura de calos, e ácidos graxos incomuns, como ácido pentadecenoico (C15:1), ácido palmitolênico (C16:1) e ácido heptadecanoico (C17:0) também foram detectados em tecidos calosos (Machado *et al*., 2006). Do mesmo modo, lipídeos foram isolados de sementes de plantas de *C. peruvianus* cultivadas naturalmente de duas regiões brasileira (nordeste e sul) (Bevilaqua *et al*., 2015). O ácido oleico (C18:1) foi o ácido graxo mais comum encontrado nas sementes de *C. peruvianus* das duas regiões (45,5%). Ácidos graxos como palmítico (C16), esteárico (C18), linoléico (C18:2), mirístico (C14), decanóico (C10), palmitoleico (C16:1) e araquidônico (C20) também foram detectados em quantidades menores nas cactáceas.

Jacomini e colaboradores (2015), determinaram o perfil lipídico de culturas de calos de *C. peruvianus*. Por meio de análises de cromatografia gasosa e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), altas quantidades de ácidos graxos insaturados,

como ω-3, ω-6, ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico (popularmente conhecidos como ômega-3), foram identificados (Figura 9). Ensaios biológicos para investigar a potencial atividade antitumoral dos PUFAs também foram realizados, e os ácidos graxos ω-3, ω-6 apresentaram atividade antineoplásicas contra células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), evidenciando assim, que a cultura de tecidos *in vitro* de *C. peruvianus*, é uma fonte valiosa para a produção de compostos bioativos de interesse.

Figura 9. Ácido graxo poli-insaturado isolado de cultura de calos de *C. peruvianus* com ação antitumoral



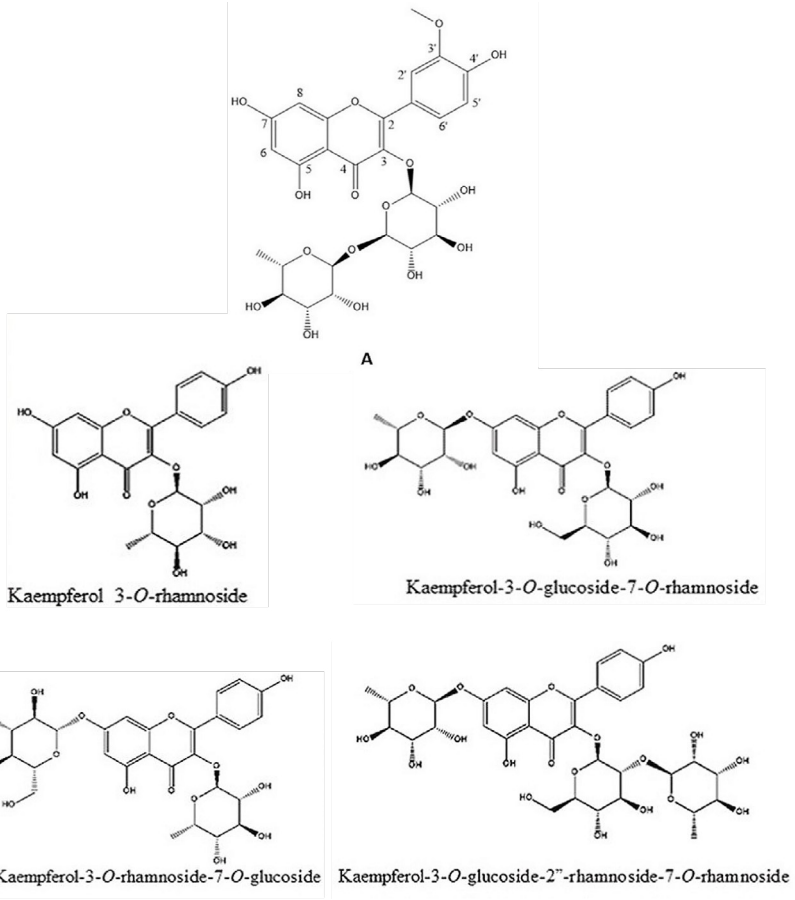
Fonte: Jacomini et al. (2015).

Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de moléculas bioativas encontradas em plantas e são responsáveis por atribuir as características de pigmentação e adstringência, além de atuarem em sua proteção contra parasitas e insetos (Albuquerque *et al*., 2021; Rahman *et al*., 2021). A principal bioatividade encontrada para essa classe de moléculas é ação antioxidante, embora outras atividades biológicas de importância farmacêutica e medicinal como atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiproliferativas, são bem relatadas (Mutha *et al*., 2021). Nunes *et al*. (2022), destacou o potencial antioxidante de compostos fenólicos encontrados em cladódios frutíferos e em cladódios vegetativos de plantas de *C. peruvianus* obtidas de sementes germinadas *in situ*.

O estudo de Nunes *et al*. (2022) apontou que o teor de flavonoides é maior em cladódios frutíferos quando comparado com cladódios vegetativos, destacando que o estágio fenológico de frutificação parece exercer influência no metabolismo secundário, induzindo alterações no conteúdo total de flavonoides de plantas de *C. peruvianus*. O estudo identificou cinco flavonoides que não haviam sido relatados anteriormente em espécies do gênero *Cereus. A autora destacou que este* é o primeiro relato de isorhamnetina 3-*O*-rutinosídeo, kaempferol 3-*O*-ramnosídeo, kaempferol-3-*O*-glicopiranosídeo-7-*O*--ramnosídeo, kaempferol-3-*O*-ramnosídeo-7-*O*-glicopiranosídeo e kaempferol-3-*O*-glicopiranosídeo-2″-ramnosídeo-7-*O*-ramnosídeo em cladódios de *C. peruvianus (Figura 10)*.

Maior atividade antioxidante foi detectada em extratos de cladódios frutíferos de *C. peruvianus* quando comparado com os cladódios vegetativos, tanto para o método DPPH (24,04 ± 0,13 μM ET·g^{-1}/ 17,08 ± 0,11 μM ET·g^{-1}), quanto para método ABTS (17,26 ± 0,11 μM ET·g^{-1}/ 8,63 ± 0,06 μM ET·g^{-1}), respectivamente, coincidindo assim com o maior teor total de compostos fenólicos encontrado nos cladódios frutíferos que foi de 14,91 ± 0,015 mg GAE·g^{-1} e em relação a 11,03 ± 0,008 mg GAE·g^{-1} encontrados nos cladódios vegetativos. Assim, os autores ressaltam que os cladódios de *C. peruvianus* podem ser uma alternativa para a indústria alimentícia como fonte de antioxidantes naturais.

Figura 10. Flavonoides relatados pela primeira vez em cladódios de *C. peruvianus*. (A) *Isorhamnetina 3-O*-rutinosídeo. (B) Kaempferol 3-*O*-rhamnosídeo (R1= Rha e R2. R1= Glc e R2= Rha. R1= Rha e R2= Glc. R1= Rha-Glc e R2= Rha)



Fonte: Nunes et al. (2022).

Santos *et al*. (2022) também investigaram a produção de compostos fenólicos a partir de partes aéreas (cladódios) de planta obtidas de sementes de C. *peruvianus* e de duas formas de cultivo (convencional e alternativo) de calos de C. *peruvianus.* A cultura alternativa foi estabelecida com calos subcultivados em placas

de Petri contendo uma fina camada de algodão (1 g) coberta com papel de filtro qualitativo (0,2 mm; poro 26 μm) e embebida com 3 mL de meio MS. Os resultados apresentados pelos autores revelam que maiores teores totais de fenólicos e flavonoides em extratos brutos foram encontrados para os cladódios, seguido pelos extratos dos tecidos de calos alternativos e tecidos de calos convencionais. A caracterização química dos compostos fenólicos resultou na identificação de trinta e quatro ácidos fenólicos e orgânicos e seus derivados, bem como doze flavonoides (oito flavonoides glicosilados), sendo alguns destes específicos ao tecido vegetal. Na planta/cladódio, esses compostos foram: ácido di-hidroxi-metoxi-butanoico, dalbergioidina, catequina, kaempferol 3-*O*-ramnopiranosídeo (1→2)-glicopiranosídeo]– 7-*O*-ramnopiranosídeo e isorhamnetina 3-*O*-ramnoside-7-*O*-(ramnosil-hexosídeo)**.**

Os compostos identificados apenas em tecidos de calos convencionais foram: ácido vanílico, ácido quínico, galato de etila e acacetina; e aqueles apenas em tecidos de calos alternativos foram ramnetina e ácido protocatecuico-hexosídeo. Em ambos os tecidos calosos foram identificados benzoato de etila, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido glucoheptônico, ácido hidroxibenzóico-hexose, kaempferol-3,7,4′-trimetil éter, éster piscídico-1-metílico do ácido 2-isoferúlico, D-xilofuranose tetradecil glicosídeo, quercetina 3-*O*-rutinosídeo (rutina), hesperidina e isorhamnetina 3-*O*-soforosídeo-7-*O*-ramnosídeo.

Os autores observaram que as culturas de calos apresentaram maior bioprodução e diversidade de compostos fenólicos em relação aos planta/cladódios. O estudo também avaliou o potencial antioxidante das culturas vegetais por meio dos métodos de DPPH, ABTS e adicionalmente FRAP, em relação ao trabalho de Nunes e colaboradores. Os resultados para ação antioxidante apontaram que o maior potencial obtido foi para cultura de calos alternativa, seguido pela cultura de calos convencional.

Atividade citotóxica para células tumorais também foi avaliada pelos pesquisadores. Os extratos de frações de cladódios e de tecidos de calos convencionais e alternativos de *C. peruvianus,* apresentaram atividade contra uma ou mais linhagens de células tumorais. Os extratos de cladódios de plantas de *C. peruvianus* obtidas de sementes apresentaram atividade contra células de câncer de mama (MCF-7), *células de* adenocarcinoma colorretal humano (CaCo2), carcinoma de células de pulmão (*NCI-H460)* e de adenocarcinoma gástrico humano *(AGS), enquanto os extratos de tecidos de calos* alternativos, apresentaram ação contra células carcinogênica *de AGS e* CaCo2. O extrato de tecido de calo convencional mostrou ação contra as *células tumorais de* CaCo2 e *NCI-H460. Além disso, os extratos não apresentaram* citotoxicidade contra células não tumorais.

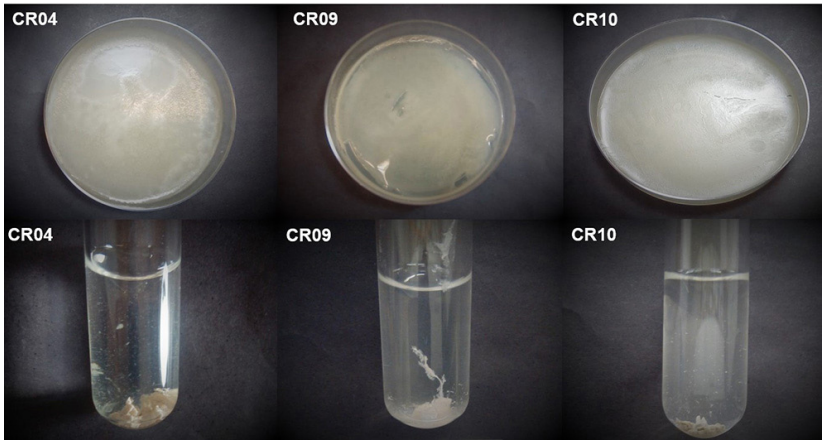
Santos *et al*. (2023), também avaliaram a melhoria na produção de compostos fenólicos sobre calos de *C. peruvianus,* elicitados por sacarose, ácido salicílico, ácido jasmônico e luz UV-C. Os autores apontam que os elicitores aturaram de forma qualitativa e quantitativamente sobre os calos de *C. peruvianus*, uma vez que aumentaram a produção de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Outro investimento relativo à bioprospecção de moléculas bioativas avaliada recentemente pelo grupo de pesquisa, foi a produção de compostos bioativos a partir de microrganismos endofiticos de exemplares de *C. peruvianus*. A associação entre plantas e microrganismos endofíticos é uma área de pesquisa com grande importância e potencial biotecnológico, uma vez que a relação entre microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira coevoluiu ao logo do tempo, estabelecendo mecanismos metabólicos específicos capazes de produzir compostos raros e exclusivos. Assim, por não causar sinais de patogenicidade ao habitar o interior de tecidos vegetais de sua planta hospedeira (Azevedo, 2000), os microrganismos endofíticos são valiosos aliados para a bioprospecção de compostos bioativos a partir de recursos vegetais importantes e de interesse.

Deste modo Beraldo-Borrazzo *et al*. (2021), avaliaram as diferenças entre as comunidades bacterinas endofiticas isoladas do interior de tecidos vegetais de plantas de *C. peruvianus* obtidas de sementes e de plantas somaclones. O estudo apontou que há uma variação da distribuição taxonômica das bactérias endofiticas entre a planta somaclone e a cultivada a partir de sementes, havendo uma predominância de proteobactérias na planta regenerada *in vitro* e de actinobactérias na planta obtida de sementes cultivada na natureza. A divergência genética entre plantas de *C. peruvianus* obtidas de sementes e regeneradas *in vitro* (somaclones), pode explicar a comunidade diferencial de bactérias endofíticas identificada na planta obtida a partir da semente e na planta regenerada *in vitro.* Tais evidências estão de acordo com o conceito de que há influência exercida pelo genótipo da planta hospedeira no recrutamento de comunidades microbianas específicas.

A investigação de compostos bioativos produzidos por bactérias endofíticas de *C. peruvianus* também foi realizada. Moléculas principalmente relacionadas ao desenvolvimento vegetal foram isoladas, tais como ácido 3-indol-acético (AIA), a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de exopolissacarídeos microbianos (EPS). Muitas linhagens endofíticas mostraram-se promissora para a bioprospecção destes compostos bioativos, com destaque para os EPS que foram produzidos a partir de espécies de *Bacillus* spp. (Figura 11), isoladas exclusivamente de plantas somaclones de *C. peruvianus*.

Figura 11. Bactérias endofíticas de espécies de *Bacillus* spp. produtoras de exopolissacarídeos isoladas de somaclone de *C. peruvianus* regenerado *in vitro* (CR)



5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O potencial biotecnológico dos somaclones de *Cereus peruvianus* tem estimulado investimentos adicionais no sentido de determinar tipos e combinações de reguladores de crescimento mais adequados para a clonagem e conservação desse germoplasma. Os somaclones correspondem a uma população de plantas inédita e exclusiva uma vez que foram regenerados a partir da cultura de calos induzidos em hipocótilos de plântulas espécie *C. peruvianus.* A micropropagação via organogênese adventícia a partir de meristemas é uma das técnicas da cultura de tecidos *in vitro* mais promissoras para a produção de mudas livres de patógenos, mantidas em condições assépticas, importante para a preservação de germoplasmas. A expectativa é induzir múltiplas brotações em meristemas axilares de plântulas de somaclones inoculadas em meio de cultura contendo combinações de auxinas e citocininas, a fim de garantir a preservação desses genótipos inéditos e atender as demandas

comerciais e industriais da população inédita dos somaclones. Frente a inexistência de estudos disponíveis na literatura sobre o potencial da mucilagem de cladódios de plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* e de somaclones regenerados *in vitro* para a produção de biofilmes, outra perspectiva é estabelecer os processos adequados para extração de mucilagem de cladódios para a produção de biofilmes com propriedades físico-químicas que possa ser útil para atender a demanda da indústria alimentícia e/ou farmacêutica. A morfologia e anatomia dos cladódios de somaclones e das plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* deverá ser elucidada em nível de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os estudos prévios da parede celular de cladódios dos somaclones que indicaram o potencial desses como promissores para a obtenção de biocombustível, tem estimulado a análise do teor de lignina da parede celular das plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in situ* e dos somaclones regenerados *in vitro,* e o desenvolvimento de processos de sacarificação dos extratos obtidos a partir dos somaclones. A relevância dos frutos de *C. peruvianus* como recurso alimentar pela população de regiões áridas em períodos de seca rigorosos devido seu alto teor de água e valor nutricional, e como foco em programas de melhoramento no Oriente Médio (Israel), também tem estimulado estudos para o conhecimento da composição nutricional dos frutos e da quantidade de compostos bioativos como fontes alternativas de substâncias de interesse para a saúde humana. O desenvolvimento de métodos sustentáveis de extração de óleos das sementes dos frutos também está programado, visando seu potencial comercial e valor nutricional. A extração dos compostos bioativos das cascas, a construção de microcápsulas, avaliação da eficiência do encapsulamento de corantes de origem natural em substituição aos corantes artificiais que podem prejudicar a saúde, e avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica dos extratos da casca e polpa dos frutos também são perspectivas no estudo da produção dos compostos de interesse biotecnológico a partir de culturas *in vitro* e *in situ* da espécie *C. peruvianus*.

6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, B.R.; HELENO, S.A.; OLIVEIRA, M.B.P.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.

ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; UTUMI, H.; HUBER, A.; BECK, R.; FONTANA, J.D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus*: structural features and potential uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34, p.283–295, 1992.

ALVAREZ, M.; COSTA, S. C.; HUBER, A.; BARON, M.; FONTANA, J.D. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as source of a home-d-galacturonan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.51, p.367–377, 1995.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.G.; LIGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.

AVATO, P.; TAVA, A. Rare fatty acids and lipids in plant oilseeds: Occurrence and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 2, p. 401-428, 2022.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, J.J.R; PEREIRA, O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40–65, 2000.

BARBULOVA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. **Cosmetics**, v. 1, p. 94-104, 2014.

BARROS, M.J.; NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Química Nova**, v. 25, p. 736-740, 2002.

BCC Research: Global Markets Reports and Industry Analysis. Wellesley, Massachusetts. Novembro, 2022. Disponível em: https://www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/herbal-medicine-market.html. Acesso em: 04/07/2024.

BCC Research: Global Markets Reports and Industry Analysis. Wellesley, Massachusetts. Novembro, 2022. Disponível em: https://www.bccresearch.com/market-research/chemicals/flavors-fragrances-markets-report.htm. Acesso em: 04/07/2024.

SUMÁRIO

BERALDO-BORRAZZO, J.; POLONIO, J.C.; SCHOFFEN, R.P.; OLIVEIRA, J.A.D.S.; POLLI, A.D.; DE ABREU FILHO, B.A.; CRUZ, E.; CORRÊA, J.L.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, 2021.

BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S.; RICCI, E.L.; SILVA, T.M.R. Preclinical study of an antiobesity phytotherapic compound obtained from Cactus *Cereus* plants in male and female rats fed with high-fat diet: comparison with sibutramine. **Journal of Health Science Institute**, v. 31, p. 320-323, 2013.

BEVILÁQUA, M.R.R.; SANTANA FILHO, A.P.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic and chemical diversity in seeds of cactus mandacaru (*Cereus* sp.) from two. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 765-776, 2015.

BHASKAR, R.; LOURETTA, S.E.X.; DHARANI, S.K.; RASHMITHA, V.; PRAVEEN, N. Biotic elicitors: A boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 149, p. 7-24, 2022.

BHOJWANI, S.S.; DANTU, P.K. **Plant tissue culture:** an introductory text. India: Springer, 2013.

BOUNGARD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839-851, 2001.

BUENZ, E.J.; VERPOORTE, R.; BAUER, B.A. The ethnopharmacologic contribution to bioprospecting natural products. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 509-530, 2018.

CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. Plant-derived natural products: a source for drug discovery and development. **Drugs and Drug Candidates**, v. 3, n. 1, p. 184-207, 2024.

CHANDRAN, H. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, v. 26, e00450, 2020.

CORREA, A.; SANTOS, E.S.; GAVIOLI, A.; SASSAKI, G.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; GONCALVES, J.E.; GONÇALVES, R.A.C.; OLIVEIRA, A.J.B. Cell wall polysaccharides from *in vitro* propagated *Cereus hildmannianus* K. Schum. plants. **Natural Products Research**, v. 34, p. 1-5, 2020.

DIXIT, S.; SHUKLA, A.; SINGH, V.; UPADHYAY, S.K. Bioprospecting of natural compounds for industrial and medical applications: Current scenario and bottleneck. *In:* UPADHYAY, S.K.; SINGH, S.P. **Bioprospecting of plant biodiversity for industrial molecules**. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, p. 53-71, 2021.

EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. **Engineering**, v. 5, p. 50-59, 2019.

FERNANDES, V.N.A.; MANGOLIN, C.A.; NEVES, A.F.; NOGUEIRA, F.C.S.; ZENI NETO, H.; MACHADO, M.F.P.S. Extraction of total protein from shoots of *Cereus* morphological variants (Cactaceae) for proteomic analysis. **Advances in Horticulturae Science**, v. 34, p. 233-240, 2020.

FREITAS, T.K.F.S.; ALMEIDA, C.A.; MANHOLER, D.D.; GERALDINO, H.C.L.; SOUZA, M.T.F.; GARCIA, J.C. Review of utilization plant-based coagulants as alternatives to textile wastewater treatment. *In*: Muthu, S.S. (Ed.), Detox Fashion. Springer, Hong Kong, pp. 27–79, 2018.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed Ed. Netherland: Springer, 2008.

GEORGIEV, M.I.; WEBER, J.; MACIUK, A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 809-823, 2009.

GIUSTI, P.; VITTI, D.; FIOCCHETTI, F.; COLLA, G.; SACCARDO, R.; TUCCI, M. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, v. 95, p. 319-332, 2002.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E.P.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.X.; CONTRERAS-ANGULO, L.A.; ELIZALDE-ROMERO, C.A.; HEREDIA, J.B. Plant alkaloids: Structures and bioactive properties. **Plant-derived bioactives: chemistry and mode of action**, p. 85-117, 2020.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Botanical Bulletin**, v. 111, p. 69-92. 1902.

HUSSAIN, N.; BAQAR, Z.; MUMTAZ, M.; EL-SAPPAH, A.H.; SHOW, P.L.; IQBAL, H.M.; VARJANI, S.; BILAL, M. Bioprospecting fungal-derived value-added bioproducts for sustainable pharmaceutical applications. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 29, e100755, 2022.

SUMÁRIO

HUXTABLE, R.J. The pharmacology of extinction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 1-11, 1992.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

JACOMINI, D.; SINZKER, R.C.; MANGOLIN, C.A.; GRANDE, P.A.; NOCCHI, S.R.; NAKAMURA, C.V.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 408-414, 2015.

JAYME, M.O.; AMES, F.Q.; BERSANI-AMADO, C.A.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; GONÇALVES, R.A.C.; OLIVEIRA, A.J.B. Primary characterization and evaluation of anti-ulcerogenic activity of an aqueous extract from callus culture of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Current Pharmaceutical Biotechnology,** v. 16, p. 462-467, 2015.

KAPOOR, B.; KAPOOR, D.; GAUTAM, S.; SINGH, R.; BHARDWAJ, S. Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Uses and potential health benefits. **Current Nutrition Reports**, v. 10, p. 232-242, 2021.

KUTNEY, J.P. Plant cell culture combined with chemistry-a powerful route to complex natural products. **Pure Applied Chemistry,** v. 68, p. 2087-2090, 1996.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LUNA, F.P. Cactus containing nutraceutical compositions and their uses. BR 2009002296, A2, CAplus, Brazil, p.31, 2012.

LUZ, G.C.; ZENI NETO, H.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Characteristics of fruits and seeds of *Cereus* plants (Cactaceae) grown in South and Northeastern Brazil. **Horticulture International Journal**, v. 4, p. 181-185, 2020.

LYSTVAN, K.; KUMORKIEWICZ, A.; SZNELER, E.; WYBRANIEC, S. Study on betalains in *Celosia cristata* Linn. callus culture and identification of new malonylated amaranthins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 3870-3879, 2018.

MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, v. 31, p. 167-172, 1993

MACHADO, F.A.; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Fatty acids production from plants and callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, v. 2, n.1, p. 368-373, 2006.

MACHADO, M. F.P.S.; COLLET, S. A. O.; MANGOLIN, C. A. **Expressão Gênica no Desenvolvimento de Tecidos Vegetais "*in vitro*"**. 1. ed. Maringá: Eduem, 1999.

MACHADO, F.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; MANGOLIN, C.A.; GOBBI FILHO, L.; MACHADO, M.F.P.S. Polysaccharide production from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 313-316, 2004.

MAGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, v. 32, n.7/8, p. 237-247, 1994.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) isozymes as markers at 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid× kinetin combinations in callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, v. 32, p. 191-200, 1994.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics,** v. 35, p. 189-204, 1997.

MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S. *In vitro* cell and tissue culture of the *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) for the conservation and management of biodiversity: Current status. **Acta Horticulturae**, v. 811, p. 249-254, 2009.

MARQUES, L.G.A.; VIEIRA NETO, J.D.B.; SALES, S.L.A.; COSTA, P.M.D.S.; GUIMARÃES, C.D.J.; MANSO, M.P.; PESSOA, C.D.Ó. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**, v. 16, n.2, p. 293-314. 2022.

MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid fruit crops. *In:* JANICK, J. **Perspectives on new crop and new uses**. Alexandria, Virginia: American Society of Horticultural Science. 1999. p. 358-366.

MIZRAHI, Y. *Cereus peruvianus* (Koubo) new cactus fruit for the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 68-78, 2014.

MOGHE, G.D.; LEONG, B.J.; HURNEY, S.M.; DANIEL JONES, A.; LAST, R.L. Evolutionary routes to biochemical innovation revealed by integrative analysis of a plant-defense related specialized metabolic pathway. **Elife**, v. 6, e28468, 2017.

SUMÁRIO

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUTHA, R.E.; TATIYA, A.U.; SURANA, S.J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-13, 2021.

NEELAKANDAN, A.K.; WANG, K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 597-620, 2012.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture:** a tool in biotechnology. Berlin: Springer, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIELSEN, E.; TEMPORITI, M.E.E.; CELLA, R. Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering. **Plant Cell Reports**, v. 38, p. 1199-1215, 2019.

NOZAKI, J.; MESSERSCHMIDT, I.; DERODRIGUEZ, D.G. Tannery wastes cleaning with natural polyelectrolytes-chemical speciation studies of chromium. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, p. 761-770, 1993.

NUNES, A.R.C. **Avalição da atividade antioxidante e caracterização de flavonoides de cladódios de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae).** 2017. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ambiental). Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Paraná, 2017.

NUNES, A.R.C.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C.; AVINCOLA, A.S.; ALMEIDA, R.T.R.; PILAU, E.J.; MACHADO, M.F.P.S. *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) as a source of natural antioxidants: phenolic compounds and antioxidant activity of cladode extracts in two collection periods. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 984-991, 2022.

OLIVEIRA, S.A.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J. *In vitro* micropropagation of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 31, p. 47-50, 1995.

SUMÁRIO

OLIVEIRA-COLLET, A.S.; MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J. Maintenance and development of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) callus tissue cultures. **Archives of Biology and Technology**, v. 39, p. 525-536, 1996.

OLIVEIRA, A.J.B.; MACHADO, M.F.P.S. Alkaloid production by callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 149-155, 2003.

PARK, S. **Plant Tissue Culture:** techniques and experiments. 4. ed. London: Academic Press, 2021.

PATHIRANA, R.; CARIMI, F. Plant Biotechnology—An Indispensable Tool for Crop Improvement. **Plants**, v. 13, n. 8, p. 1133, 2024.

PURICELLI, L.; INNOCENTI, G.; DELLE MONACHE, G.; CANIATO, R.; FILIPPINI, R.; CAPPELLETTI, E.M. *In vivo* and *in vitro* production of alkaloids by *Haplophyllum patavinum*. **Natural Product Letters,** v. 16, p. 95-100, 2002.

RAHMAN, M.M.; RAHAMAN, M.S.; ISLAM, M.R.; RAHMAN, F.; MITHI, F.M.; ALQAHTANI, T.; UDDIN, M.S. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 233, 2021.

RAJPUT, A.; SHARMA, R.; BHARTI, R. Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health. **Materials Today: Proceedings**, v. 48, p. 1407-1415, 2022.

RALPHS, M.H.; GARDNER, D.R. Alkaloid levels in duncecap (*Delphinium occidentale*) and tall larkspur (*D. barbeyi*) grown in reciprocal gardens: Separating genetic from environmental influence. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 117-124, 2001.

RANGHOO-SANMUKHIYA, V.M. Somaclonal variation and methods used for its detection. *In*: Siddique, I. (ed.). **Propagation and Genetic Manipulation of Plants. Springer, Singapore**, p. 1-18, 2021.

REID, W.V. **Biodiversity Prospecting: using genetic resources for sustainable development.** SA: World Resources Institute, 1993.

SABIKHI, L.; KUMAR, M.H.S. Fatty acid profile of unconventional oilseeds. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 67, p. 141-184, 2012.

SALMORE, A.K.; HUNTER, M.D. Elevational trends in defense chemistry, vegetation and reproduction in *Sanguinaria canadensis*. **Journal of Chemical Ecology,** v. 27, p. 1713-1727, 2001.

SUMÁRIO

SÁNCHEZ-ROMERO, C. Somaclonal variation: basic and practical aspects. In: Sánchez-Romero, C. (ed.) Factors Affecting Tissue Culture-induced Variations. Switzerland: Springer, 2024. p. 37-56.

SANTOS, E.S.; CABRAL, M.R.P.; SILVA, T.F.O.; OLIVEIRA, A.J.B.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; GONÇALVES, R.A.C. Improvement of phenolic compounds production in callus cultures of *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. by elicitation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 153, p. 37-51, 2023.

SANTOS, E.S.; SAVAM, A.; CABRAL, M.R.P.; CASTRO, J.C.; COLLET, S.A.O.; MANDIM, F.; CALHELHA, R.C.; BARROS, L.; MACHADO, M.F.P.S.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C. Low-cost alternative for the bioproduction of bioactive phenolic compounds of callus cultures from *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. **Journal of Biotechnology**, v. 356, p. 8-18, 2022.

SATO, F.; HASHIMOTO, T.; HACHIYA, T.; TAMURA, T.; CHOI, K.B.; TAKASHI, M.; HIDEKI, F.; YASUYUKI, Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. **Journal of the Agricultural Chemical Society**, v. 98, p. 367-372, 2001.

SCHLEIDEN, M.J. Post about Phytogenesis. **Archiv fur Anatomie Physiologie und Wissenschaftliche Medicin**. 1838.

SCHWANN, T. **Mikroscopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen**. Leipzig: W Engelmann. 1839.

SHAHNAWAZ, M. **Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites:** Recent Trends and Future Prospects**.** 1. ed. London: Taylor & Francis Group, 2021.

SINGH, B.K.; LIU, H.; TRIVEDI, P. Eco-holobiont: a new concept to identify drivers of host-associated microorganisms. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 564-567, 2020.

SITRIT, Y.; GOLAN, E.; BAR, E.; LEWINSOHN, F. Fruit quality evaluation of two new cactus crops for arid zones: *Cereus peruvianus* and *Cereus jamacaru*. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 60, p. 335-343, 2012.

SKIRYCZ, A.; KIERSZNIOWSKA, S.; MÉRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTZOS, G. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado?. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.

SUMÁRIO

SOUZA, M.T.F.; DE ALMEIDA, C.A.; AMBROSIO, E.; SANTOS, L.B.; DE SOUZA FREITAS, T.K.F.; MANHOLER, D.D.; GARCIA, J.C. Extraction and use of *Cereus peruvianus* cactus mucilage in the treatment of textile effluents. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 67, p. 174-183, 2016.

SOUZA, B.F.C.; OLIVEIRA, T.M.L.O.; FERNANDES, M.J.B.C. Atividade antimicrobiana do extrato do sanativo® sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Conidis**, v. 6, p. 1-6, 2017.

SRUTHI, D.; JAYABASKARAN, C. Plant Secondary Metabolites—The Key Drivers of Plant's Defence Mechanisms: A General Introduction *In:* Shahnawaz, M. (ed.) **Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites: Recent Trends and Future Prospects.** London: Taylor & Francis Group, 2021. p. 1-26.

TANAKA, L. Y. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; JACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.714-721, 2010.

THOMFORD, N.E.; SENTHEBANE, D.A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

VIAFARMA, 2017. Cactus *Cereus* extrato seco. https://www.dermomanipulacoes.com.br/assets/uploads/Koubo.pdf accessed 01 march 2020).

WENG, J.K.E.; PHILIPPE, R.N.; NOEL, J.P. The rise of chemodiversity in plants. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1667-1670, 2012.

YARLEY, O.P.N.; KOJO, A.B.; ZHOU, C.; YU, X.; GIDEON, A.; KWADWO, H.H.; RICHARD, O. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 2262-2271, 2021.

ZÁRATE, R.; EL JABER-VAZDEKIS, N.; TEJERA, N.; PÉREZ, J.A.; RODRÍGUEZ, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 1-19, 2017.

ZHANG, L.; SONG, J.; KONG, L.; YUAN, T.; LI, W.; ZHANG, W.; DU, G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, e107686, 2020.

2.2

Daiani Rodrigues Moreira
Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli
Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki

BIOTECNOLOGIA APLICADA À CONSERVAÇÃO DAS ABELHAS

1. INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de plantas silvestres e culturas agrícolas dependem do processo de polinização, realizado principalmente por animais (aves, morcegos, insetos) incluindo as abelhas (Hristov *et al*., 2020). A polinização favorece o incremento na fertilização de flores e reprodução de plantas, o que amplia a variabilidade genética, resistência a doenças, frutificação e produção de sementes (Pedro, 2014). Adicionalmente, a diversidade e abundância de abelhas mantém a variabilidade vegetal dos ecossistemas (Tscheulin *et al*., 2011).

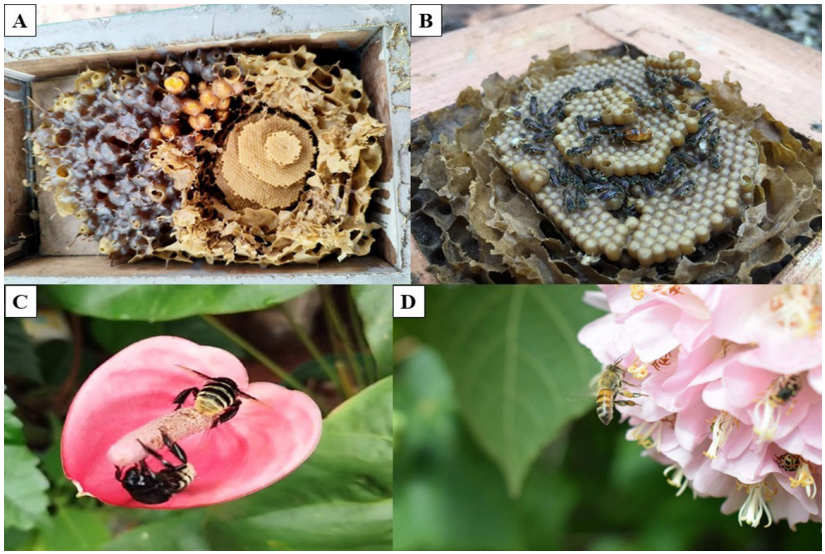
A espécie *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae) é considerada a principal espécie polinizadora em todo o mundo (Potts *et al*., 2016). Entretanto, as abelhas pertencentes à tribo Meliponini, conhecidas como abelhas sem ferrão, têm se destacado em relação à polinização de culturas agrícolas no Brasil (Giannini *et al*., 2015a; Giannini et al., 2020). No total, 101 espécies foram identificadas como visitantes florais de 107 cultivos e como polinizadoras de 52 culturas (Wolowski *et al*., 2019). Adicionalmente, aproximadamente 60% das lavouras brasileiras dependem principalmente de abelhas para polinização (Figura 1) (Giannini *et al*., 2015b).

Esses polinizadores apresentam propriedades como bioindicadores e organismos bioacumuladores passivos, o que os torna eficazes para o monitoramento de grandes áreas (Sadeghi *et al*., 2012). Adicionalmente, as abelhas fornecem produtos importantes tais como mel, geleia real, pólen, própolis, cera, entre outros, que podem ser empregados para desenvolvimento de produtos ou utilizados para produção.

No entanto, nos últimos anos, as populações de abelhas têm enfrentado ameaças significativas, incluindo o declínio devido a doenças, parasitas, uso indiscriminado de pesticidas e mudanças climáticas (Dively *et al*., 2015; Hallmann *et al*., 2017; Fisher; Rangel,

2018; Manzoor; Pervez, 2022; Moreira *et al*., 2022). O número de espécies de abelhas coletadas ou observadas ao longo do tempo tem diminuído constantemente desde a década de 1990, o que pode refletir em uma redução mundial na diversidade desses insetos (Zattara; Aizen, 2021).

Figura 1. Diversidade de abelhas. A: Colônia de *Tetragonisca angustula.* B: Colônia de *Nannotrigona testaceicornis*. C: *Eulaema* sp. em flor de Antúrio. D: *Apis mellifera* na flor de Astrapéia



Fonte: Douglas Galhardo.

Assim, vários estudos vêm sendo conduzidos no sentido de garantir a produção de rainhas de qualidade para manter e desenvolver as colônias, preservação de espécies, incremento na produtividade, e, emprego de produtos de abelhas em diferentes áreas. Nesse sentido, baseando-nos em pesquisas científicas, discutiremos estratégias promissoras que visam melhorar a saúde das colônias, aumentar a resistência às doenças e fortalecer as populações de abelhas, visando minimizar a redução das colônias e preservar esses polinizadores.

2. ESTUDOS GENÉTICOS E BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À MANUTENÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS COLÔNIAS DE ABELHAS

As modernas plataformas de sequenciamento associadas aos recursos computacionais da bioinformática modernos, favorecem a compreensão da estrutura e função dos genomas. Nessa perspectiva, inúmeros genomas de espécies de abelhas melíferas ou sem ferrão tem sido sequenciado, como *Frieseomelitta varia, Melipona quadrifasciata* e *Melipona bicolor* (Kapheim *et al*., 2015; Freitas *et al*., 2020; Araújo *et al*., 2024).

A abelha europeia (*A. melífera* L.) é usada como organismo modelo em estudos moleculares, principalmente porque seu genoma foi o primeiro a ser sequenciado, o que permitiu avanços significativos (Crozier; Crozier, 1993; Wallberg *et al*., 2019). Todavia, o genoma da grande maioria das espécies nativas ainda está em processo de estudos e sequenciamento.

Os avanços tecnológicos no sequenciamento genético, propiciaram a identificação de marcadores genéticos como mtDNA, RAPD, AFLP, microssatélites e ESTs, que têm sido empregados para investigar o comportamento migratório e reprodutivo, a taxonomia e filogenia, a biogeografia da população e outros aspectos que conduzem para ampliar a compreensão e confiabilidade de estudos genéticos em abelhas melíferas e nativas (Brito *et al*., 2009; Silva *et al*., 2014; Souza *et al*., 2014; Jaffé *et al*., 2016; Al-Ameri *et al*., 2020; Qamer *et al*., 2021).

Dentre esses marcadores, destacam-se aqueles envolvidos na detecção da resistência a doenças específicas em abelhas nativas (Meliponini) e melíferas (Gebremedhn *et al*., 2023). Pois, este é

um dos principais fatores que compromete a adaptação, diversidade genética das abelhas a longo prazo (Kraus *et al*., 2019), e, sobrevivência das colônias (Currie *et al*., 2010; Van Engelsdorp *et al*., 2010; Van Engelsdorp *et al*., 2012).

Dentre as doenças, infecções causadas pelo ácaro V*arroa destructor,* vírus de RNA (vírus da asa deformada, o vírus do Lago Sinai, o vírus da paralisia aguda das abelhas, o vírus da paralisia crônica das abelhas, o vírus da cria ensacada e o vírus da célula da rainha negra) e infecções por *Nosema ceranae,* têm sido testadas em populações de abelhas usando PCR convencional e RT-qPCR (Emtithal *et al*., 2021). Gebremedhn *et al*. (2023) avaliaram perfis de expressão de alguns marcadores moleculares envolvidos na detecção olfativa e na interferência de RNA e, destacaram-se *Dicer*, *Argonaute 2* e *OBP14* como marcadores promissores, sugerindo que ambos processos podem contribuir para a resiliência das abelhas a esses agentes infecciosos.

Além de ácaros e vírus, muitos patógenos bacterianos e fúngicos de abelhas, vêm sendo isolados, cultivados em meio de cultura e identificados. Entre eles, destacam-se *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* e *Ascosphaera apis,* que podem resultar na redução da produtividade de produtos apícolas e, até mesmo, na morte da colônia inteira. Uma das estratégias para o controle desses patógenos, é utilizar a nanotecnologia, com nanomateriais produzidos de forma ecologicamente correta por meio da síntese verde (Das *et al*., 2017).

Por exemplo, Hussain *et al*. (2023) sintetizaram nanopartículas de óxido de prata e zinco (NPs) a partir de extratos de fruta *Whitania coagulans.* Essas nanopartículas apresentaram eficiência antimicrobiana nas diferentes culturas, permitindo sugerir ser esta, uma estratégia sustentável e que pode ser utilizada no controle desses patógenos a fim de proteger a colônia e melhorar a sua produtividade.

Além das doenças, a escassez de alimentos em diferentes condições climáticas, incluindo verões muito secos ou meses de frio rigorosos, tem resultado na desnutrição e levado à perda significativa no número de colônias em todo o mundo (Wrigth; Nicholson; Shafir, 2018). Deste modo, apicultores têm investido no uso de dietas artificiais para compensar as deficiências nutricionais e diminuir o estresse causado pela redução de alimentos na natureza. Nesse sentido, análises transcriptômicas, métodos de quantificação proteica e a determinação de marcadores moleculares relacionados à nutrição, tais como, *SOD1*, *Trxr1*, *defensina2*, *JHAMT*, *TOR1* e *vg*, são fundamentais para verificar a qualidade nutricional das dietas e para avaliar o impacto da suplementação artificial na saúde, bem como, na manutenção das colônias e desenvolvimento das abelhas (Frunze *et al.,* 2024).

Dentre os nutrientes, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, naturalmente obtidos a partir do consumo do pólen, devem ser incorporados às suplementações artificiais, pois são essenciais para a manutenção da força e crescimento da colônia (Ricigliano *et al*., 2022a). Além disso, as proteínas têm importante papel na realização de importantes processos fisiológicos, incluindo a resposta imune, tolerância e sobrevivência perante infecção por parasitas, longevidade das operárias, qualidade reprodutiva dos zangões, criação de ninhadas, produção de geleia real e desenvolvimento da população (Glavinic *et al.,* 2017).

Dentre os produtos mais utilizados nas formulações de suplementações artificiais, destacam-se alimentos ricos em proteínas como a soja, ervilha, fermento, caseína, ovos e microalgas (Ricigliano *et al*., 2022a) devido a fácil aceitação pelas abelhas e o baixo custo (Saffari *et al*., 2010). Contudo, muitos estudos vêm avaliando o emprego de dietas alimentares alternativas a serem utilizadas na suplementação das colônias.

Ullah *et al*. (2021) avaliaram dietas enriquecidas com farinha de soja, amendoim moído ou pasta de tâmaras como suplemento de pólen em colônias de *A. mellifera*. Os autores verificaram que colônias alimentadas com dieta enriquecida com farinha de soja apresentaram maior consumo, maior peso e maior área da ninhada. Enquanto o melhor desenvolvimento das colônias foi observado com dieta fortificada com farinha de soja e pasta de tâmaras. Do mesmo modo, houve melhorias nas células de cera acumuladas e eficiência de forrageamento em colônias alimentadas com suplementações artificiais em relação às colônias controle. Assim, foi sugerido que dietas alternativas de pólen enriquecidas principalmente com soja, podem melhorar parâmetros fisiológicos, contribuindo com crescimento da colônia e, consequentemente, aumento da produção de mel e lucro aos produtores.

Ricigliano *et al*. (2022a) avaliaram 144 colônias de abelhas melíferas alimentadas com dietas contendo de 15 e 20% de pólen natural (Global e Homebrew), ou dietas contendo misturas de proteínas vegetais sem pólen (Global, Ultra Bee, Bulk Soft, MegaBee, AP23, Healthy Bees). O grupo controle recebeu apenas açúcar como alimento. As melhores colônias e as abelhas com maior peso foram obtidas de colônias alimentadas com as dietas contendo pólen (Global e Homebrew). Contudo, o conteúdo de macronutrientes da dieta não foi correlacionado com o tamanho da colônia ou biomarcadores de saúde, embora tivesse impactado de modo significativo a microbiota das abelhas. Os autores sugeriram que os locais dos apiários podem anular os efeitos da dieta, mas mesmo assim, avaliações em várias colônias são essenciais para verificar a eficácia das dietas, e, melhorá-las, de modo a garantir a saúde das abelhas, o crescimento e manutenção das colônias.

Ricigliano *et al*. (2022b) também avaliaram o fornecimento de dietas de microalgas usando biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis* (espirulina) para abelhas melíferas operárias em comparação ao fornecimento de dieta natural rica em pólen. Por meio de análises de metabolômica de cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) avaliaram o perfil metabólico após fornecimento da dieta. Dentre os metabólitos identificados, vinte e cinco foram influenciados pela dieta, incluindo lipídios complexos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e fitoquímicos. Diante disso, os autores sugeriram que as microalgas podem ser utilizadas como aditivos alimentares sustentáveis por contribuir com a síntese de componentes essenciais para o crescimento, bem como, levar ao aumento da expressão gênica de antioxidantes e proteínas de choque térmico, os quais, são moduladores da saúde das abelhas.

Kim *et al*. (2024), avaliaram a alimentação de colônias de *A. mellifera* com o produto comercial Megabee em relação a dietas desenvolvidas pelos autores (Teste A, Dieta 1, Dieta 2, Dieta 3 e Dieta 4 - Tabela 1). O grupo controle não recebeu alimentação suplementar. O maior consumo e impacto no crescimento populacional, na área de cria coberta, no peso da colônia, no peso das abelhas e nos níveis de vitelogenina foi obtido pelas colônias alimentadas com a Dieta 2, sendo eficiente como alimentação suplementar, uma vez que, é capaz de melhorar a manutenção e o desenvolvimento da colônia.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas

Ingredientes	Teste A	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
levedura de cerveja	39,69	39,69	39,69	39,69	39,69
Gema de ovo	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21
Pó de soja desengordurada	2.21	-	2.21	2.21	2.21
Açúcar	35,36	35,36	35,36	35,36	33,86
Água fervida	15.16	5.16	7.16	5.16	5.16
Óleo de canola	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01
Celulose	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
Farelo de trigo em pó	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
Vitaminas múltiplas	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
L-metionina	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
L-lisina	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
Ácido Cítrico	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
criança levada	-	0,00	0,00	0,00	0,00
BPF	-	0,00	0,00	0,00	0,00
Suco de tangerina	-	10.00	4,00	10.00	10.00
Pó de Soytide	-	2.21	-	-	-
suco de maçã	-	-	4,00	-	-
Pó de clorela	-	-	-	0,08	-
Pó de menta	-	-	-	-	3,00

Fonte: Adaptada de Kim et al. (2024).

Embora grande parte dos estudos em relação a suplementação com suplementações artificiais concentrem-se em abelhas *A. mellifera*, outras espécies vêm sendo avaliadas. Gekière, Michez e Vanderplanck (2022) avaliaram cinco substitutos artificiais de pólen (Megabee, Feedbee, Nutri-bombus médio, Nutri-bombus alto e Nutri-bombus em pó) e dietas baseadas em pólen natural obtidos de salgueiro (*Salix* sp. L., Salicaceae) e de Stévia (*Cistus* sp. L., Cistaceae), bem como, a mistura delas, em micro colônias de *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). Houve redução no desenvolvimento das micro colônias alimentadas com dietas quando comparadas àquelas colônias alimentadas com pólen natural, embora, não tivessem

comprometido a saúde das abelhas. Quando as colônias foram alimentadas com misturas de dietas e pólen natural, o problema do desenvolvimento reduzido foi amenizado. Assim, os autores sugeriram que a ineficácia das dietas poderia estar relacionada a conteúdos nutricionais inadequados ao desenvolvimento ou propriedades físicas que impediam a construção dos ninhos.

A influência de suplementos proteicos (fubá e extrato de soja ou fubá e levedura de cerveja), no desenvolvimento de colônias de abelhas *Melipona rufiventris* foi avaliada por Xavier de Freitas *et al*. (2023). Ambos os suplementos foram aceitos e consumidos pelas abelhas, apresentando-se como alternativas eficientes para a diversificação da alimentação dessa espécie.

Embora ainda recentes, os estudos referentes à suplementação nutricional em abelhas, são fundamentais. A dieta pode influenciar no microbioma dessas espécies, os quais parecem ter papel fundamental no desenvolvimento das colônias. Experimentos realizados por Powell *et al*. (2023) indicaram que o emprego de dieta pobre em pólen, pode impactar na redução da diversidade, uniformidade e quantidade de bactérias potencialmente benéficas associadas à colônia, bem como, resultarem em uma diminuição drástica na expressão de genes. Assim, enfatizam a necessidade de incluir em dietas, uma proporção de pólen, para garantir melhorias na diversidade do microbioma e, consequentemente, garantir perfis normais de expressão de genes centrais para o desenvolvimento e imunidade das abelhas.

Essa diversidade do microbioma, foi avaliada por Santos *et al*. (2023), em abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula*, por meio de técnicas moleculares. Neste estudo, foram encontradas bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e fungos dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota e Mortierellomycota. Além de essenciais à sobrevivência das abelhas,

esses microrganismos produzem metabólitos que podem ser bioprospectados para diferentes aplicações biotecnológicas.

Além de comprometer a diversidade microbiana, saúde e desenvolvimento das abelhas, a qualidade dos nutrientes fornecidos às colônias impacta a qualidade e quantidade de geleia real produzida pelas glândulas mandibulares e hipofaringeanas de abelhas operárias jovens de *A. mellifera*. Esta secreção apresenta alto valor comercial, uma vez que, pode ser utilizada como suplemento alimentar e produto farmacêutico e, ao ser fornecida para a larva operária comum, leva a sua transformação em uma abelha rainha com uma vida prolongada e capacidade de postura de ovos (Hu *et al*., 2019). Tendo em vista que a produção e propriedades físico-químicas da geleia real variam de acordo com as reservas alimentares na colmeia, é fundamental que as rainhas não sejam produzidas em períodos de floração limitada, ou dietas pobres em proteínas (Kanelis *et al*., 2024).

Além da disponibilidade de alimentos para a colônia e qualidade da geleia real, outros fatores como a origem e idade das larvas transferidas, número de abelhas nutrizes, podem afetar a qualidade da rainha e, consequentemente, comprometer a qualidade das colônias e o seu desenvolvimento (Mahbobi *et al*., 2012).

Assim, diferentes técnicas vêm sendo avaliadas visando a produção de rainhas de qualidade. Souza *et al.* (2023) avaliaram a produção de rainhas de abelhas *A. mellifera* africanizadas com o fornecimento de aditivos fermentados e não fermentados usando as técnicas de transferência de larvas simples e dupla, resultaram em maior consumo do suplemento quando as colônias foram estimuladas a produzir rainhas. Este consumo de suplemento não fermentado e a técnica de transferência dupla, levaram a um processo acelerado de maturidade sexual, o qual pode contribuir com a produção de rainhas de qualidade.

Outra técnica utilizada para a produção de rainhas de qualidade é a inseminação instrumental e tem sido uma ferramenta importante para a reprodução de *A. mellifera*, que visa superar os problemas que ocorrem no acasalamento natural (Pieplow *et al*., 2017; Abou-Shaara *et al*., 2021). Neste processo, a rainha é criada em laboratório e depois mantida na colônia e inseminada instrumentalmente. O sêmen é coletado de zangões selecionados (van Praagh et al., 2014), consequentemente, podem resultar em colônias com melhores características de qualidade, tais como, maior acúmulo de pólen, tolerância a patógenos e doenças e comportamento higiênico (Huang *et al*., 2009; Khan *et al*., 2021) e controle genético de abelhas (Cobey, 2016) em programas de seleção e melhoramento genético.

Esses programas de seleção são baseados no modelo estatístico BLUP - Best Linear Unbiased Prediction (Bienfeld; Ehrhardt; Reinhardt, 2007). Este modelo estima o componente genético do desempenho de uma colônia baseado no desempenho de seus pais e grau de parentesco, e, ao mesmo tempo, elimina os efeitos ambientais (não genéticos). De modo geral, programas de seleção baseados em BLUP, têm demonstrado melhoras significativas em características da colônia, como produção de mel e defensividade (Maucort *et al*., 2021).

Posteriormente, Maucort *et al*. (2023), avaliaram o comportamento higiênico e produção de mel entre colônias, utilizando o método BLUP e confirmaram que não houve ganhos genéticos em relação a essas características, entre as rainhas fertilizadas naturalmente ou via inseminação instrumental. Assim, sugeriram que, apesar da técnica de reprodução não ter sido eficiente no aumento de ganhos genéticos em apenas uma geração, pode ser uma ferramenta importante na obtenção do controle reprodutivo dentro de um programa de seleção genética ao longo de várias gerações.

3. PROSPECÇÃO DE PRODUTOS DE ABELHAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

O emprego de diferentes técnicas direcionadas às abelhas melíferas ou sem ferrão, tem permitido utilizar de produtos produzidos por essas espécies na prospecção de bioprodutos visando aplicações em diferentes áreas. Dentre esses, o mel, rico em proteínas, minerais, açúcares, pigmentos, ácidos orgânicos e muitos outros elementos (Khan *et al*., 2018), utilizado há muito tempo de forma eficaz no tratamento de várias doenças (Samarghandian *et al*., 2017), devido a inúmeras propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais, antibacterianos, antifúngicos e cicatrizante (Patel; Cichello, 2013; Meo *et al*., 2017; Miguel *et al*., 2017), vem sendo empregado no desenvolvimento de hidrogeis.

Os hidrogeis formulados a partir de mel e polímeros naturais (Hamedi *et al*., 2018), apresentam considerável biodegradabilidade, biocompatibilidade, não é tóxico para animais, apresentam baixa imunogenicidade, e, formam estruturas semelhantes a matriz extracelular (Suamte; Tirkey; Babu, 2023). Além disso, tem capacidade de absorver bactérias e encapsular materiais bioativos liberando-os na região comprometida por longo período de tempo (Kim *et al*., 2008). Devido a essas características, vêm sendo utilizados para encapsular células e medicamentos, na engenharia de tecidos, como aditivos alimentares (Francesko *et al.,* 2018; Pereira *et al*., 2018), e, como curativos cicatrizantes (Aderibigbe, 2022). Nesse processo de cicatrização, independentemente do polímero utilizado, o mel pode contribuir com a atividade antibacteriana, indução dos leucócitos e liberação de citocinas, reepitelização, proliferação de queratinócitos, ativação de fibroblastos e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Yaghoobi *et al*., 2013; Sarhan *et al*., 2016; Yilmaz *et al*., 2020).

Essa ação foi avaliada por El-Kased *et al*. (2017). Os autores testaram formulações de três concentrações de mel com agentes gelificantes, quitosana ou carbopol 934 e, verificaram que, o hidrogel de mel-quitosana 75% possuiu maior efetividade cicatrizante, podendo ser utilizado com segurança como tratamento tópico natural eficaz em feridas, composição que também contribui com eficiência da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Chopra *et al*., 2022). Stojkovska *et al*. (2019), produziram hidrogeis contendo nanopartículas de prata (AgNPs), alginato e mel de acácia e, os produtos apresentaram efeito bactericida contra cepas de bactérias hospitalares, sendo a maioria delas, multirresistentes a antibióticos.

Zekry, Abdellatif e Azzazy (2020) avaliaram a atividade cicatrizante em feridas a partir do uso de mel de Manuka (MH) acrescido com pó de casca de romã, e, verificaram a contribuição desse hidrogel na atividade de proliferação celular e a reepitelização tecidual, bem como, atividade antimicrobiana do bioproduto, resultando na inibição de 90-98% do crescimento de *S. aureus* e *Escherichia coli*. Do mesmo modo, mel de Kelulut e mel de Tualang incorporados em hidrogeis de celulose/PEG, também apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra essas bactérias (Gopal *et al*., 2021).

Adicionalmente, a prevenção de contaminação bacteriana foi avaliada durante a o processo de regeneração óssea, a partir da incorporação de diferentes quantidades de mel de Manuka (originário da Nova Zelândia) em estruturas mineralizadas de criogel de fibroína de seda. O hidrogel resultante apresentou porosidade adequada, propriedades mecânicas, infiltração celular e inibição de infecção, os quais, são características essenciais para a cicatrização deste tecido (Hixon *et al*., 2018).

Além do mel, geleia real que é rica em compostos bioativos com potencial imunomodulador (Guo *et al*., 2021), antimicrobiano (Bagameri *et al*., 2022; Lee *et al*., 2022) e antioxidante (Rizki *et al*., 2021), também vem sendo utilizada no desenvolvimento de hidrogeis

para produção de curativos para cicatrização, pois podem estimular a migração de células-tronco mesenquimais e inibir a formação de biofilmes bacterianos (Ramírez *et al*., 2020).

Tan *et al*. (2023), desenvolveram um curativo a partir de uma mistura simples de vesículas extracelulares de geleia real (RJ-EVs) e sericina modificada com anidrido metacrílico (SerMA), o qual, foi capaz de inibir a inflamação e realizar o reparo vascular, oferecendo uma estratégia simples e segura para tratamento de feridas. Ramírez *et al*. (2020) integraram geis de colágeno tipo I a RJ-EVs e verificaram a captação dessas vesículas em fibroblastos, aumentando a capacidade contrátil dessas células, bem como, a inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus*. O colágeno tipo I pode ser utilizado como um sistema de liberação confiável para fornecer RJ EVs funcionais para terapias de cicatrização de feridas.

Em vários estudos, além do mel e geleia real, pesquisadores têm-se concentrado na própolis produzida por abelhas sem ferrão e *A. mellifera.* Devido a riqueza em flavonoides, compostos fenólicos, polifenois, terpenos, terpenoides, cumarinas, esteroides, aminoácidos e ácidos aromáticos, bem como, constituintes biologicamente ativos que incluem artepillina C, ácido cafeico, éster fenetílico do ácido cafeico, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, luteolina, genisteína, naringina, pinocembrina, ácido cumárico e quercetina, esse produto destaca-se pelas propriedades antioxidante, neuroprotetora, imunomoduladora (Zullkiflee; Taha; Usman, 2022), cicatrizante (da Silva *et al*., 2020), anti-inflamatória (Meneses *et al*., 2020), antimicrobiana (Meneses *et al*., 2022) e o uso como medicamento complementar alternativo no tratamento de várias doenças agudas e crônicas (Zullkiflee; Taha; Usman, 2022). Dentre elas, podemos destacar a artrite reumatoide, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios gastrointestinais e doenças relacionadas ao trato respiratório (Zullkiflee; Taha; Usman, 2022), tais como, a COVID-19 (Silveira *et al*., 2021).

Diante de todas propriedades biológicas e terapêuticas, a própolis passa a ser considerada um composto bioativo importante para o desenvolvimento de biomateriais destinados a aplicações médicas. Krupp *et al*. (2019) avaliaram a associação de extrato de própolis obtidas em colmeias da abelha sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* e membrana do látex de borracha natural (NRL) como curativo para queimaduras. O menor número de infiltrados inflamatórios e/ou células na área epitelial, formação de queratinócitos na camada epidérmica resultando no desprendimento e remoção de tecidos necróticos/lesados, os quais, se assemelham a ação do fármaco sulfadiazina de prata.

Eskandarinia *et al*. (2019), avaliaram a adição de própolis ao filme de amido de milho e ácido hialurônico e apresentaram propriedades antimicrobianas contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*, os quais, foram correlacionadas com a concentração de própolis. Saleh *et al*. (2023) também evidenciaram o potencial antimicrobiano do extrato de própolis adicionado à nanofibra de celulose (CNF)/poli (álcool vinílico) contra *E. coli*, *Salmonella typhimurium, Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e, destacaram um papel anti-inflamatório significativo para este produto de abelha e o seu potencial antimicrobiano em hidrogeis a serem utilizados como curativos na cicatrização de feridas e lesões.

Além de aplicações na medicina regenerativa, o uso da própolis vem sendo avaliado como componente bioativo em materiais de revestimento ou componentes de implantes dentários ou ortopédicos, visando reduzir os problemas associados à falta de biocompatibilidade de metais, amplamente empregados para este fim (Hanawa, 2019; Kaur e Singh, 2019). Existe atividade antifúngica deste produto em superfícies de titânio (Martorano-Fernandes *et al*., 2020), bem como, melhorias na resistência à corrosão, possivelmente, devido a sua ação antioxidante (Martinello; Mutinelli, 2021).

Para potencializar esses efeitos, a própolis vem sendo combinada com hidroxiapatita, que além de ser um dos principais componentes dos ossos, é um dos biomateriais mais utilizados em aplicações médicas. Grenho *et al.* (2015), investigou o efeito dos extratos de própolis vermelha e verde brasileira em biomateriais de nanohidroxiapatita (nano-HA). A composição nano-HA-própolis resultante, apresentou reduzida hidrofilicidade, maior atividade de fibroblastos, ausência de citoxicidade e redução significativa de bactérias *S. aureus.* Andrade *et al.* (2019), confirmaram que a incorporação da própolis em biomateriais vítreos, destinados a ambientes clínicos, aumenta a propriedade antimicrobiana contra diversos patógenos, como *S. mutans, S. salivarius* e *C. albicans*, o qual, parece estar associada ao seu conteúdo de flavonoides.

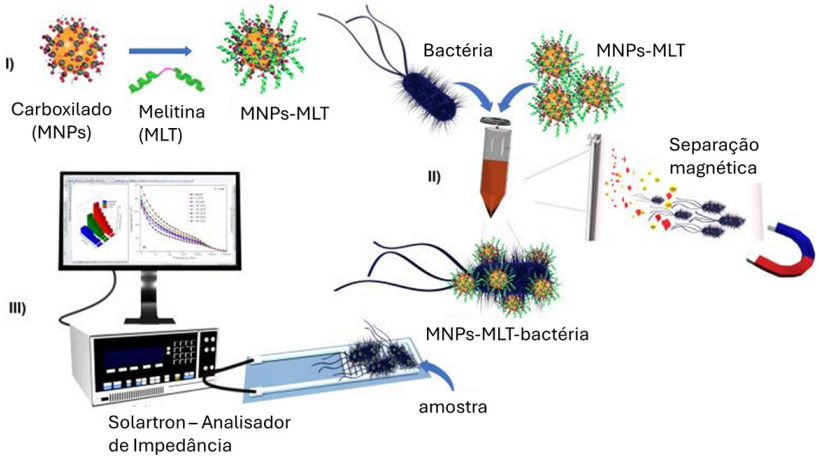
Em outro estudo, o extrato de própolis incorporado em uma matriz de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco biossintetizadas, resultou em hidrogeis resistentes, elásticos, não citotóxicos e, apresentando capacidade de incorporar outros compostos na matriz. Devido a essa propriedade de se ligar a outros componentes, sugeriu-se o potencial desses hidrogeis contendo própolis a atuarem como biocarreadores de fármacos ou anestésicos locais em aplicações biomédicas (Chelu *et al*., 2022).

Outra substância produzida pelas abelhas que vem ganhando espaço em inúmeras pesquisas nos últimos anos, é o veneno produzido por pela glândula de veneno em espécies pertencentes ao gênero *Apis*. Na área da saúde, o veneno de abelha destaca-se devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, inibidoras do sistema nervoso central, radioprotetoras, anticancerígenas, antibacterianas, antivirais e antifúngicas, entre outras (Bava *et al*., 2023).

Estas propriedades estão associadas à rica composição química identificada no veneno de abelhas, com destaque para a melitina que compõe aproximadamente 50% dos peptídeos identificados (White; Meier, 2017). Além da eficácia desta substância do ponto de

vista farmacológico, Wilson *et al*. (2019), utilizaram o peptídeo para recobrir nanopartículas magnéticas construindo um biossensor para detectar bactérias em alimentos e bebidas. Os ensaios indicaram rapidez e baixo custo para detectar a contaminação (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do princípio do método bioanalítico. Funcionalidade de MNPs (Nanopartículas Magnéticas) (I); captura de bactérias por MNPs-MLT (Carboxilatos - Melitina) e separação magnética das bactérias da matriz amostral (II); Detecção EIS (Espectroscopia de Impedância Elétrica) (III)



Fonte: Wilson et al. (2019).

O desenvolvimento de biomateriais a partir de produtos de abelhas, tornou-se um foco recente de pesquisa. Muitos estudos vêm sendo conduzidos e, várias empresas têm se concentrado na produção e comercialização de tais bioprodutos. Tendo em vista todas as propriedades relatadas, o baixo custo e disponibilidade, os produtos de abelhas podem se tornar alternativas promissoras a serem incorporadas em diferentes áreas (Ferreira *et al*., 2024).

4. ABELHAS COMO BIOINDICADORES AMBIENTAIS E ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO PARA OS POLINIZADORES

Contaminantes ambientais de atividades agrícolas, urbanas e industriais, juntamente com patógenos e alterações climáticas podem impactar negativamente a vida microbiana, vegetal e animal. Dentre os principais contaminantes podem-se citar os metais pesados, produtos químicos ambientalmente persistentes e pesticidas. Esses compostos podem ser comprometedores para o meio ambiente, no qual, têm potencial de se mobilizar pelo solo, água e ar (Moroń *et al*., 2014; Williams *et al*., 2015).

O monitoramento do ambiente para poluição, pesticidas e patógenos é essencial para proteger a saúde humana, agrícola e dos ecossistemas (Cunningham *et al*., 2022). Esse processo pode ser conduzido utilizando sistemas bióticos ou abióticos e uma combinação de análises físicas, químicas e genômicas (Kienzl *et al*., 2003; Cordier *et al*., 2020).

Nesse sentido, o emprego de indicadores para estimar o nível de poluição ambiental e seu impacto no meio ambiente inclui diferentes métodos, como avaliação da água, solo, ar e monitoramento por organismos vivos - plantas ou animais (Barganska *et al*., 2015). Para utilização de organismos vivos como bioindicadores existem alguns critérios que necessitam ser atendidos, como capacidade de acumulação de compostos específicos, presença em distintos habitats, incidência em populações maiores, facilidade de identificação e amostragem representativa (Roman, 2010; Skorbilowicz *et al*., 2018).

As abelhas podem ser empregadas como bioindicadores biológicos pois apresentam hábitos alimentares generalistas, sensibilidade a mudanças ambientais (Barganska *et al*., 2015),

à composição da vegetação, e também aos resíduos de moléculas de inseticidas e poluentes presentes nas plantas (Oliveira *et al*., 2014). Ao realizar o forrageamento para coleta de pólen e néctar, as abelhas podem entrar em contato com substâncias tóxicas enquanto voam e retornam para colmeia, e como não conseguem reconhecê-las acabam levando para colônia o alimento contaminado ou partículas de compostos em seu organismo, onde posteriormente se acumulam em produtos da colmeia, como cera e mel (Satta *et al*., 2012; Kessler *et al*., 2015; Negri *et al*., 2015). Além disso, a população de abelhas forrageiras realiza coleta de resina e água, recolhendo diferentes amostras do ambiente, acumulando contaminantes do ar, da água e do solo (Porrini *et al*., 2002; Celli *et al*., 2003). Dessa forma, as abelhas são contribuintes valiosos para a compreensão e monitoramento de mudanças ambientais (Cunningham *et al*., 2022).

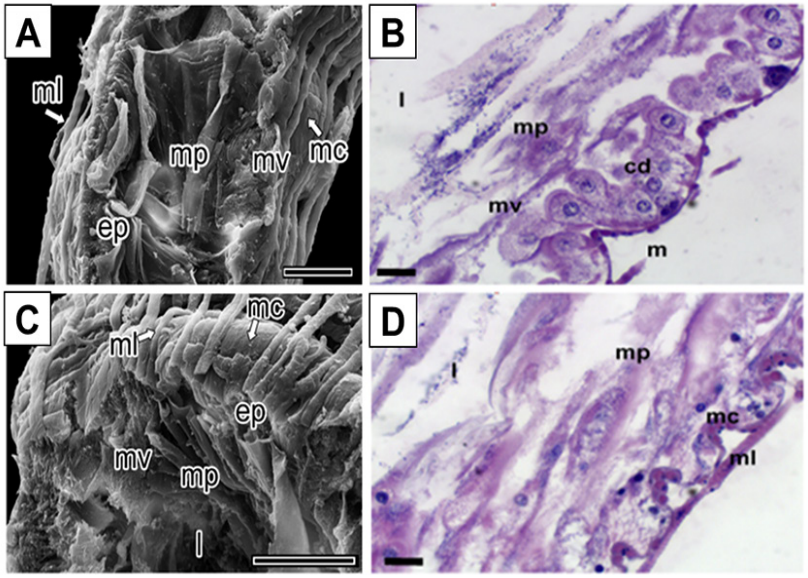
Nessa perspectiva, inúmeros estudos têm sido realizados buscando identificar como diferentes compostos podem afetar e/ou comprometer abelhas melíferas e nativas. Zaric *et al*. (2017), determinaram as concentrações de metais em *A. mellifera* e, as análises, mostraram duas fontes de metais: antropogênicas (Co, Cd, Na, Fe, Mn, Zn e Cu) e naturais (Ca, Al, Mg, Cr, Ba, Sr e Ni). Conti *et al*. (2022) avaliando cinco locais na província de Roma, determinaram os níveis de elementos (As, Be, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, U e Zn) em abelhas e produtos comestíveis da colmeia (mel, cera, pólen e própolis). Os autores confirmaram que, excluindo o mel, a cera, o pólen, a própolis e as abelhas podem acumular altos níveis de elementos tóxicos e potencialmente tóxicos do ambiente circundante.

Quando direcionamos as investigações para pesticidas, um estudo dos Estados Unidos detectou 120 ingredientes ativos ou metabólitos de agroquímicos no pólen coletado por abelhas (Traynor *et al*., 2021). Com intuito de determinar concentrações de fipronil e neonicotinoides em abelhas vivas e mortas em áreas rurais do Brasil onde estes compostos são amplamente utilizados na agricultura, foi empregada a técnica de espectrometria de massa (UHPLC-MS/MS usando o método QuEChERS). Análises toxicológicas em ambas as matrizes

detectaram contaminações múltiplas com maiores índices por fipronil, tiametoxam, imidacloprido, nitenpiram e tiacloprido. As amostras de abelhas vivas indicaram concentrações de pesticidas abaixo da DL_{50} -dose letal para 50% da população (Castilhos *et al*., 2019).

Moreira *et al*. (2018) avaliando a exposição do inseticida tiametoxam em abelhas nativas *S. bipunctata* confirmaram que concentrações subletais promoveram alterações morfológicas no intestino médio, modificação no estado da cromatina do cérebro e também na atividade isoenzimas esterases (EST-4). Os autores concluíram que mesmo promovendo baixa mortalidade o composto testado pode alterar a sobrevivência dos polinizadores (Figura 3).

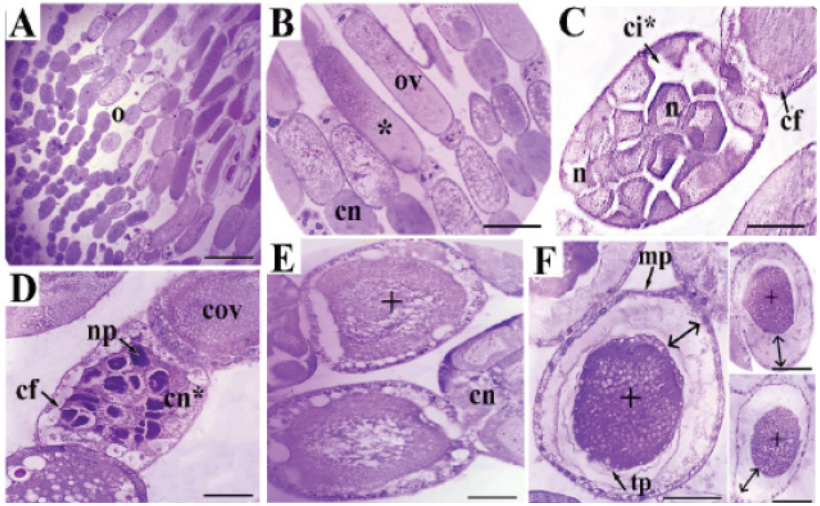
Figura 3. A-C: Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando internamente a região mediana do intestino médio de *Scaptotrigona bipunctata* expostas ao imidacloprido. B-D: Fotomicrografia do intestino médio de *Scaptotrigona bipunctat*a exposto a 5 × 10-9 g i.a./mL de imidacloprido em 24 e 72 horas, respectivamente. mp = membrana peritrófica; ep = epitélio do intestino médio; m = musculatura; mc = musculatura circular; ml = musculatura longitudinal; cd = células digestivas



Fonte: Moreira et al. (2018).

A exposição do neonicotinoide imidacloprido em colônias de abelhas *Apis mellifera* durante 42 dias ocasionou alterações histológicas no intestino médio de operárias e rainhas. Além disso, foi confirmado degeneração nos ovários das rainhas e reabsorção do conteúdo de ovaríolos, provavelmente afetando a fertilização e desenvolvimento da colônia (Figura 4) (Moreira *et al*., 2022).

Figura 4. A-F: Fotomicrografia do ovário da rainha *Apis mellifera* africanizada exposto oralmente ao imidacloprido. o= ovócito; cn= câmara nutridora; ov= ovócito; *= grânulos de vitelo; ci*= citoplasma com espaços; n= núcleo; cf= células foliculares; np= núcleos picnóticos; cn*= câmara nutridora em esgotamento; += reabsorção do conteúdo ovariolar; cov= câmara ovocítica; cn= câmara nutridora; mp= membrana peritoneal; tp= túnica própria; ↔ = espaçamento entre membranas da câmara ovocítica; Hematoxilina-Eosina. Escala: 100 µm



Fonte: Moreira et al. (2022).

Stuchi *et al.* (2022) expondo *Tetragonisca fiebrigi* aos agrotóxicos fipronil, malation e tiametoxam confirmaram elevada toxicidade por contato e ingestão. A exposição aos compostos promoveu modificações na atividade de esterases e também no estado de condensação da cromatina cerebral. Para *T. angustula* os pesticidas

malation e tiametoxam também promoveram alterações esterásicas e na cromatina do cérebro (Stuchi *et al*., 2023). Apesar de serem espécies diferentes, ambas foram suscetíveis aos produtos testados, indicando que podem ser empregadas no biomonitoramento da qualidade ambiental em áreas preservadas e agroecossistemas.

Operárias de *Melipona scutellaris* foram expostas via oral e por contato aos compostos glifosato, 2,4-D, picloram e glifosato+2,4-D. Estes produtos podem comprometer diretamente a sobrevivência das abelhas e, indiretamente, podem afetar o processo de polinização (Nocelli *et al*., 2019).

Estudos de campo têm detectado diferentes inseticidas em níveis residuais no ninho, pólen, mel e cera, o que pode afetar o crescimento, a força e a sobrevivência das colmeias (Pisa *et al*., 2017; Tosi *et al*., 2018). Além disso, esses compostos podem prejudicar o retorno das abelhas para colônia, suas habilidades de memória, cognição e também sua orientação de voo (Mommaerts *et al*., 2010; Henry *et al*., 2012; Lundin *et al*., 2015). A saúde humana também pode ser afetada por meio da contaminação residual do mel comercializado (Connolly *et al*., 2017; Mitchell *et al*., 2017).

Diante desse cenário de contaminação de abelhas e seus produtos fica evidente a necessidade de ações buscando a conservação desses polinizadores. Nesse sentido, a agricultura pode ser desenvolvida de forma harmônica com a apicultura e meliponicultura, visto que, são complementares e podem fornecer valor ambiental, social e econômico (Santos *et al*., 2018).

É importante destacar que existem práticas alternativas como o MIP- Manejo integrado de pragas, rotação de culturas, sistemas agroflorestais e orgânicos também podem ser desenvolvidos para diminuir o emprego de pesticidas (Khater *et al*., 2012; Guedes *et al*., 2016; Willer *et al*., 2017). Todavia, é necessária ajuda de custo e treinamento para agricultores, apicultores e meliponicultores (Santos *et al*., 2018).

A conservação de abelhas contribui efetivamente para os ecossistemas e garante a manutenção dos processos ecológicos, como a polinização, que é responsável pelo sucesso reprodutivo de muitas plantas nativas e cultivadas (Potts *et al*., 2010). Para que as práticas de conservação sejam eficientes é importante conhecer o comportamento social, morfofisiologia, estudos genéticos e taxonomia das diferentes espécies. Com base nesses conhecimentos, será possível a elaboração de estratégias para manejo e conservação de espécies nativas e apícolas, mantendo a segurança alimentar humana e estabilidade do ecossistema.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

As abelhas desempenham papel ecossistêmico essencial polinizando a flora nativa e cultivares agrícolas, contribuindo com a diversidade vegetal dos ecossistemas. Contudo, devido a muitos fatores como patógenos (vírus e bactérias) que atacam colônias, a poluição ambiental em especial ao mal uso de pesticidas, as mudanças climáticas e desmatamentos dentre outros, tem contribuído com o desenvolvimento de biotecnologias para a conservação dessas espécies.

Dessa maneira, a bioprospecção da microbiota das abelhas e o conhecimento do seu microbioma têm contribuído para conhecer e melhorar a imunidade das colônias de abelhas. Outro aspecto importante é a saúde das colônias que está relacionada com a alimentação, assim, têm sido desenvolvidos suplementos alimentares artificiais para suprir as necessidades nutricionais das abelhas, em especial de proteínas.

Finalmente, vale destacar que a atividade de criação de abelhas melíferas (apicultura) e nativas (meliponicultura), está sendo impulsionada pelo aumento de alimentos saudáveis e naturais, promovendo desenvolvimento econômico e social, gerando empregos e renda. Vale destacar que em 2020 o Brasil foi considerado o décimo maior produtor de mel em nível mundial. A apicultura e a meliponicultura são atividades sustentáveis e benéficas ao ambiente, pois são fontes de produtos naturais e de qualidade.

6. REFERÊNCIAS

ABD-EL-SAMIE, E. M.; BASUNY, N. K.; SEYAM, H. Molecular characterization of viruses found in honeybee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor* and *Nosema cerana* in Egypt, **Molecular and Cellular Probes**, v. 57, p. 101731, 2021.

ABOU-SHAARA, H. F; AL-GHAMDI, A. A; KHAN, K. A; AL-KAHTANI, S. N. Genetic network analysis between *Apis mellifera* subspecies based on mtDNA argues the purity of specimens from North Africa, the Levant and Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n.5, p. 2718-2725, 2021.

ADERIBIGBE, B. A. Hybrid-based wound dressings: combination of synthetic and biopolymers. **Polymers**, v. 14, p. 3806, 2022.

AL-AMERI, D. T.; ALHASAN, A. S. Study of the genetic diversity of Iraqi honeybee (*Apis mellifera* L.) populations utilizing the mTDNA COI region. **International Journal of Agricultural and Statistical Sciences,** v. 16, p. 1775-1778, 2020.

ANDRADE, Â. L.; LIMA, A. M.; SANTOS, V. R.; E SILVA, R. M. D. C.; BARBOZA, A. P.; NEVES, B. R.; VASCONCELLOS, W. A.; DOMINGUES, R. Z. Glass-ionomer-propolis composites for caries inhibition: flavonoids release, physical-chemical, antibacterial and mechanical properties. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v.5, p. 027006, 2019.

ARAUJO, N. D. S.; OGIHARA, F.; MARTINS, P. M.; ARIAS, M. C. Insights from *Melipona bicolor* hybrid genome assembly: a stingless bee genome with chromosome-level scaffold. BMC Genomics, v. 171, 2024.

BAGAMERI, L.; BACI, G. M.; DEZMIREAN, D. S. Royal jelly as a nutraceutical natural product with a focus on its antibacterial activity. **Pharmaceutics.** v. 14, p. e1142, 2022.

BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Honey bees and their products – bioindicators of environmental contamination. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 235-248, 2015.

BAVA, R.; CASTAGNA, F.; MUSELLA, V.; LUPIA, C.; PALMA, E.; BRITTI, D. Therapeutic use of bee venom and potential applications in veterinary medicine. **Veterinary Sciences,** v. 10, n. 2, p. 119, 2023.

BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T.; GONÇALVES, P. H. P.; PIOKER, F. C.; SOARES, A. E. E.; ARIAS, M. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetics Resource**s, v. 1, n. 1, p. 183–187, 2009.

CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J. L.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. **Apidologie**, v. 50, p. 657–668, 2019.

CELLI, G.; MACCAGNANI, B. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. **Bulletin of Insectology**, v. 56, p. 137–139, 2003.

CHELU, M.; MORENO, J. C.; ATKINSON, I.; CUSU, J. P.; RUSU, A.; BRATAN, V., ARICOV, L.; ANASTASESCU, M.; SECIU-GRAMA, A. M.; MUSUC, A. M. Green synthesis of bioinspired chitosan-ZnO-based polysaccharide gums hydrogels with propolis extract as novel functional natural biomaterials, **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 211, p. 410-424, 2022.

CHOPRA, H.; BIBI, S.; KUMAR, S.; KHAN, M. S.; KUMAR, P.; SINGH, I. Preparation and evaluation of chitosan/PVA-based hydrogel films loaded with honey for application in wound healing, **Gels**, v. 8, n. 111, 2022.

COBEY, S. W. An introduction to instrumental insemination of honey bee queens. **Bee World**, v. 93, n. 2, p. 33-36, 2016.

CONNOLLY, C. N. Nerve agents in honey. **Science**, v. 358, n. 6359, p. 38-39, 2017.

CONTI, M. E.; ASTOLFI, M. L.; FINOIA, M. G.; MASSIMI, L.; CANEPARI, S. Biomonitoring of element contamination in bees and beehive products in the Rome province (Italy). **Environmental Science and Pollution Research,** v. 29, n. 24, p. 36057-36074, 2022.

CORDIER, T.; ALONSO-SÁEZ, L.; APOTHÉLOZ-PERRET-GENTIL, L.; AYLAGAS, E.; BOHAN, D. A.; BOUCHEZ, A.; CHARITON A.; CREER, S.; FRÜHE, L.; KECK, F., KEELEY, N.; LAROCHE, O.; LEESE, F., POCHON, X.; STOECK, T.; PAWLOWSKI, J.; LANZÉN, A. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. **Molecular Ecology**, v. 46, p. 235-248, 2020.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v. 133, n. 1, p. 97-117, 1993.

CUNNINGHAM, M. M.; TRAN, L.; MCKEE, C. G.; POLO, R. O.; NEWMAN, T.; LANSING, L.; GUARNA, M. M. Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. **Ecological Indicators,** v. 134, p. 108457, 2022.

CURRIE, R. W.; PERNAL, S. F.; GUZMÁN-NOVOA, E. Honey bee colony losses in Canada. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 104-106, 2010.

DAS, R. K.; PACHAPUR, V. L.; LONAPPAN, L.; NAGHDI, M.; PULICHARLA, R.; MAITI, S.; CLEDON, M.; DALILA, L. M. A.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K. Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 2, p. 1-21, 2017.

DE MENESES, I. H. C.; DE MORAIS SAMPAIO, G. A.; DE CARVALHO, F. G.; CARLO, H. L.; MÜNCHOW, E. A.; PITHON, M. M.; ALVES, P. M. LACERDA-SANTOS, R. In vivo biocompatibility, mechanical, and antibacterial properties of cements modified with propolis in different concentrations. **European Journal of Dentistry**, v. 14, n. 01, p. 077-084, 2020.

DE MENESES, I. H. C.; DE MORAIS SAMPAIO, G. A.; VIEIRA, R. A.; DA SILVA CAMPOS, M. J.; ALVES, P. M.; PITHON, M. M.; LACERDA-SANTOS, R. Effect of yellow propolis on biocompatibility of cements: morphological and immunohistochemistry analysis. **European Journal of Dentistry**, v. 16, n. 01, p. 130-136, 2022.

DE PAULA FREITAS, F. C.; LOURENÇO, A. P.; NUNES, F. M.; PASCHOAL, A. R.; ABREU, F. C.; BARBIN, F. O.; BATAGLIA, L.; CARDOSO-JÚNIOR, C. A. M. , CERVONI, M. S.; SILVA, S. R.; DALARMI, F.; DEL LAMA, M. A.; DEPINTOR, T. S.; FERREIRA, K. M.; GÓRIA, P. S.; JASKOT, M. C.; LAGO, D. C.; UNA-LUCENA, D.; MODA, L. M.; NASCIMENTO, L. M. P.; OLIVEIRA, F. R.; SANCHES, F. C.; SANTOS, D. E.; SANTOS, C. G.; VIEIRA, J.; BARCHUK, A. R.; HARTFELDER, K.; SIMÕES, Z. L. P.; BITONDI, M. M. G.; PINHEIRO, D. G.The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* – a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 386, 2020.

DIVELY, G. P.; EMBREY, M. S.; KAMEL, A.; HAWTHORNE, D. J.; PETTIS, J. SAssessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118748, 2015.

EL-KASED, R. F.; AMER, R. I.; ATTIA, D.; ELMAZAR, M. M. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports**, v. 7, p. 9692, 2017.

ESKANDARINIA, A.; KEFAYAT, A.; RAFIENIA, M.; AGHEB, M.; NAVID, S.; EBRAHIMPOUR, K. Cornstarch-based wound dressing incorporated with hyaluronic acid and propolis: in vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, *v.* 216, 25–35, 2019.

FERREIRA, L. M. D. M. C.; MODESTO, Y. Y.; SOUZA, P. D. Q. D.; NASCIMENTO, F. C. D. A.; PEREIRA, R. R.; CONVERTI, A.; LYNCH, D. G.; BRASIL, D. S. B.; SILVA, E. O.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C.; RIBEIRO-COSTA, R. M. Characterization, biocompatibility and antioxidant activity of hydrogels containing propolis extract as an alternative treatment in wound healing. **Pharmaceuticals,** v. 17, n. 5, p. 575, 2024.

FISHER, A.; RANGEL, J. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208630, 2018.

FRANCESKO, A.; PETKOVA, P.; TZANOV, T. Hydrogel dressings for advanced wound management. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 41, p. 5782-5797, 2018.

FRUNZE, O.; KIM, H.; LEE, J. H.; KWON, H. W. The effects of artificial diets on the expression of molecular marker genes related to honey bee health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4271, 2024.

GEBREMEDHN, H.; CLAEYS BOUUAERT, D.; ASPERGES, M.; AMSSALU, B.; DE SMET, L.; DE GRAAF, D. C. Expression of molecular markers of resilience against *Varroa destructor* and bee viruses in Ethiopian honey bees (*Apis mellifera simensis*) Focussing on olfactory sensing and the RNA interference machinery. **Insects**. v. 14, n. 5, p. 436, 2023.

GEKIÈRE, A.; MICHEZ, D.; VANDERPLANCK, M. Bumble bee breeding on artificial pollen substitutes. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 5, p. 1423-1431, 2022.

GIANNINI, T. C.; ALVES, D. A.; ALVES, R.; CORDEIRO, G. D.; CAMPBELL, A. J.; AWADE, M.; BENTO, J. M. S.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie,** v. 51, p. 406–421, 2020.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO, E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209–223, 2015a.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomological**, p. 1–9, 2015b.

GLAVINIC, U.; STANKOVIC, B.; DRASKOVIC, V.; STEVANOVIC, J.; PETROVIC, T.; LAKIC, N.; STANIMIROVIC, Z. Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187726, 2017.

GOPAL, R.; LO, A. Z. K.; MASROL, M.; LAI, C. H.; ZAIN, N. M.; SAIDIN, S. Susceptibility of stingless bee, giant bee and Asian bee honeys incorporated cellulose hydrogels in treating wound infection. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 17, n. 3, p. 242-252, 2021.

GRENHO, L.; BARROS, J.; FERREIRA, C.; SANTOS, V. R.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P.; CORTES, M. E. In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. **Biomedical Materials**, v. 10, p. 025004, 2015.

GUEDES, R. N. C.; SMAGGHE, G.; STARK, J. D.; DESNEUX, N. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. **Annual Review of Entomology**, v. 61, p. 43–62, 2016.

GUO, J.; WANG, Z.; CHEN, Y.; CAO, J.; TIAN, W.; MA, B.; DONG, Y. Active components and biological functions of royal jelly. **Journal of Functional Foods,** v. 82, p. e104514, 2021.

HALLMANN, C. A.; SORG, M.; JONGEJANS, E.; SIEPEL, H.; HOFLAND, N.; SCHWAN, H.; STENMANS, W.; MÜLLER, A.; SUMSER, H.; HÖRREN, T.; GOULSON, D.; DE KROON, H. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. **PloS one**, v. 12, n. 10, e0185809, 2017.

HAMEDI, H.; MORADI, S.; HUDSON, S. M.; TONELLI, A. E. Chitosan-based hydrogels and their applications for drug administration in dressings: a review. **Carbohydrate Polymers,** v. 199, p. 445–460, 2018.

HANAWA, T. Titanium-fabric interface reaction and its control with surface treatment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 170, 2019.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, p. 348–350, 2012.

HIXON, K. R.; LU, T.; CARLETTA, M. N.; MCBRIDE-GAGYI, S. H.; JANOWIAK, B. E.; SELL, S. A. A preliminary in vitro evaluation of the bioactive potential of cryogel scaffolds incorporated with Manuka honey for the treatment of chronic bone infections. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 106. n. 5, p.1918-1933, 2018.

HRISTOV, P.; NEOV, B.; SHUMKOVA, R.; PALOVA, N. Significance of Apoidea as main pollinators. Ecological and economic impact and implications for human nutrition. **Diversity**, v. 12, n. 7, p. 280, 2020.

HU, F. L., BÍLIKOVÁ, K., CASABIANCA, H., DANIELE, G., SALMEN ESPINDOLA, F., FENG, M., GUAN, C.; HANE, B.; KRAKOVA, T. K.; LI, J-KE.; LI L.; LIH, X.A.; SIMÚTH J.; WU, L.W.; WU, Y. Q.; XUE, X. F.; XUE, Y. B.; YAMAGUCHI, K.; ZENG, Z. J.; ZHENG, H. Q.; ZHOU, J. H. Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1-68, 2019.

HUANG, M. H.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; LEBLANC, B. Comparisons of the queen volatile compounds of instrumentally inseminated versus naturally mated honey bee (*Apis mellifera*) queens. **Apidologie**, v. 40, n. 4, p. 464-471, 2009.

HUSSAIN, R.; HASAN, M.; IQBAL, K. J.; ZAFAR, A.; TARIQ, T.; SAIF, M. S.; HASSAN, S. G.; SHU, X.; CAPRIOLI, G.; ANJUM, S. I. Nano-managing silver and zinc as bio-conservational approach against pathogens of the honey bee. Journal of Biotechnology, v. 365, 1-10, 2023.

JAFFÉ, R.; CASTILLA, A.; POPE, N.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; METZGER, J. P.; ARIAS, M. C.; JHA, S. Landscape genetics of a tropical rescue pollinator. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 2, p. 267–278, 2016.

KANELIS, D.; LIOLIOS, V.; RODOPOULOU, M. A.; PAPADOPOULOU, F.; TANANAKI, C. Production and Quality Characteristics of Royal Jelly in Relation to Available Natural Food Resources. **Resources**, v. 13, n. 4, p. 55, 2024.

KAPHEIM, K. M.; PAN, H.; LI, C.; SALZBERG, S. L.; PUIU, D.; MAGOC, T.; ROBERTSON, H. M.; HUDSON, M. E.; VENKAT, A.; FISCHMAN, B. J.; HERNANDEZ, A.; YANDELL, M.; ENCE, D.; HOLT, C.; YOCUM, G. D.; KEMP, W. P.; BOSCH, J.; WATERHOUSE, R. M.; ZDOBNOV, E. M.; STOLLE, E.; ZHANG, G. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. **Science**, v. 348, n. 6239, p. 1139–1143, 2015.

KAUR, M.; SINGH, K. Review on titanium and titanium-based alloys as biomaterials for orthopedic applications. **Materials Science and Engineering: C.,** v. 102, p. 844–862, 2019.

KESSLER, S. C.; TIEDEKEN, E. J.; SIMCOCK, K. L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; RADCLIFFE, A.; STOUT. J. C.; WRIGHT, G. A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, p. 74-76, 2015.

KHAN, K. A.; GHRAMH, H. A.; AHMAD, Z.; EL-NIWEIRI, M. A.; AHAMED MOHAMMED, M. E. Queen cells acceptance rate and royal jelly production in worker honey bees of two *Apis mellifera* races. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0248593, 2021.

KHAN, S. U.; ANJUM, S. I.; RAHMAN, K.; ANSARI, M. J.; KHAN, W. U.; KAMAL, S.; KHATTAK, B.; MUHAMMAD, A.; KHAN, H. U. Honey: Single food stuff comprises many drugs. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 320-325, 2018.

KHATER, H. F. **Ecosmart biorational insecticides: alternative insect control strategies**. *In*: Perveen F, editor. Insecticides—advances in integrated pest management. Rijeka (Croatia), Shanghai (China): InTech; p. 17–60, 2012.

KIENZL, K. **Bioindicators and biomonitors for policy, legislation and administration**, *In*: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), Trace Metals and other Contaminants in the Environment. Elsevier, p. 85-122, 2003.

KIM, H.; FRUNZE, O.; MAIGORO, A. Y.; LEE, M. L.; LEE, J. H.; KWON, H. W. Comparative study of the effect of pollen substitute diets on honey bees during early spring. **Insects**, v. 15, n. 2, p. 101, 2024.

KIM, J. O.; PARK, J. K.; KIM, J. H.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; LI, D. X.; CHOI, J. Y.; WOO, J. S.; YOO, B. K.; LYOO, W. S., KIM, J.A.; CHOI, H. G. Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1-2, p. 79-86, 2008.

KRUPP, T.; DOS SANTOS, B. D.; GAMA, L. A.; SILVA, J. R.; ARRAIS-SILVA, W. W.; DE SOUZA, N. C.; AMÉRICO, M. F; DE SOUZA SOUTO, P. C. Natural Rubber - Propolis Membrane Improves Wound Healing in Second-Degree Burning Model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 980–988, 2019.

LEE, S.; LEE, K. S.; OK, M.; KIM, B. Y.; JIN, B. R. Antimicrobial activity of major royal jelly protein 8 and 9 of honeybee *(Apis mellifera)* venom. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 25, p. e101964, 2022.

LUNDIN, O.; RUNDLÖF, M.; SMITH, H. G.; FRIES, I.; BOMMARCO, R. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. **PLoS One**, v. 10, p. e0136928, 2015.

MAHBOBI, A.; FARSHINEH-ADL, M.; WOYKE, J.; ABBASI, S. Effects of the age of grafted larvae and the effects of supplemental feeding on some morphological characteristics of iranian queen honey bees (Skorikov, 1929). **Journal of Apicultural Science**, v. 56, n. 1, p. 93-98, 2012.

MANZOOR, F.; PERVEZ, M. Pesticide Impact on Honeybees Declines and Emerging Food Security Crisis. **Global Decline of Insects**. IntechOpen, 2022.

MARTINELLO M.; MUTINELLI F. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 71, 2021.

MARTORANO-FERNANDES, L.; CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D. Inhibitory effect of Brazilian red propolis on candida biofilms developed on titanium surfaces. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 104, 2020.

SUMÁRIO

MAUCOURT, S.; FORTIN, F.; ROBERT, C.; GIOVENAZZO, P. Genetic progress achieved during 10 years of selective breeding for honeybee traits of interest to the beekeeping industry. **Agriculture**, v. 11, n. 6, p. 535, 2021.

MAUCOURT, S.; ROUSSEAU, A.; FORTIN, F.; ROBERT, C.; GIOVENAZZO, P. Observation of genetic gain with instrumental insemination of honeybee queens. **Insects**, v. 14, n. 3, p. 301, 2023.

MEO, S. A.; AL-ASIRI, S. A.; MAHESAR, A. L.; ANSARI, M. J. Role of honey in modern medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 5, p. 975-978, 2017.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D.; FALEIRO, M. L. Honey as a complementary medicine. **Integrative Medicine Insights**, v. 12, 2017.

MITCHELL, E. A.; MULHAUSER, B.; MULOT, M.; MUTABAZI, A.; GLAUSER, G.; AEBI, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. **Science**, v. 111, p. 109–111, 2017.

MOMMAERTS, V.; REYNDERS, S.; BOULET, J.; BESARD, L.; STERK, G.; SMAGGHE, G. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. **Ecotoxicology**, v**.** 19, p. 207–215, 2010.

MOREIRA, D. R.; DE SOUZA, T. H. S.; GALHARDO, D.; PUENTES, S. M. D.; FIGUEIRA, C. L.; SILVA, B. G. D.; CHAGAS, F. D.; GIGLIOLLI, A. A. S.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Imidacloprid Induces Histopathological Damage in the Midgut, Ovary, and Spermathecal Stored Spermatozoa of Queens After Chronic Colony Exposure. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1637-1648, 2022.

MOREIRA, D. R.; GIGLIOLLI, A. A. S.; FALCO, J. R. P.; JULIO, A. H. F.; VOLNISTEM, E. A.; CHAGAS, F. D.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 463-475, 2018.

MOROŃ, D.; SZENTGYÖRGYI, H.; SKÓRKA, P.; POTTS, S. G.; WOYCIECHOWSKI, M. Diversity, Survival, reproduction and population growth of the bee pollinator, *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae), along gradients of heavy metal pollution. **Insect Conservation and Diversity**, v. 7, p. 113-121, 2014.

NEGRI, I.; MAVRIS, C.; DI PRISCO, G.; CAPRIO, E.; PELLECCHIA, M. Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. **PLOS ONE,** v. 10, e0132491, 2015.

SUMÁRIO

NOCELLI, R. C. F.; SOARES, S. M. M.; MONQUERO, P. A Effects of herbicides on the survival of the Brazilian native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta Daninha**, v. 37, e019220193, 2019.

OLIVEIRA, M. A.; GOMES, C. F. F.; PIRES, E. M.; MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. Bioindicadores ambientais: insetos como um instrumento desta avaliação. **Ceres**, v. 61, p. 800-807, 2014.

PATEL, S.; CICHELLO, S. Manuka honey: an emerging natural food with medicinal use. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, p. 121-128, 2013.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**. v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PEREIRA, D. R.; SILVA-CORREIA, J.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L.; PANDIT, A.; BIGGS, M. J. Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrosus tissue regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 897-908, 2018.

PIEPLOW, J. T.; BRAUSSE, J.; VAN PRAAGH, J. P.; MORITZ, R. F.; ERLER, S. A scientific note on using large mixed sperm samples in instrumental insemination of honeybee queens. **Apidologie**, v. 48, p. 716-718, 2017.

PISA, L.; GOULSON, D.; YANG, E. C.; GIBBONS, D.; SÁNCHEZ-BAYO, F.; MITCHELL, E.; AEBI, A.; VAN DER SLUIJS, V.; MACQUARRIE, C. J. K.; GIORIO, C.; LONG, E. Y.; MCFIELD, M.; VAN LEXMOND, M. B.; BONMATIN, J. M. An update of the worldwide integrated assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research;** p.1–49, 2017.

PORRINI, C.; GHINI, S.; GIROTTI, S. **Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy;** CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2002.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution,** v. 25, p. 345–353, 2010.

POWELL, J. E.; LAU, P.; RANGEL, J.; ARNOTT, R.; DE JONG, T.; MORAN, N. A. The microbiome and gene expression of honey bee workers are affected by a diet containing pollen substitutes. **PLoS One**, v. 18, n. 5, e0286070, 2023.

SUMÁRIO

QAMER, S.; AL-ABBADI, A. A.; SAJID, M.; ASAD, F.; KHAN, M. F.; KHAN, N. A.; STHANADAR, A. A.; AKHTAR, M. N.; MAHMOUD, A. H.; MOHAMMED, O. B.; MOHAMMED, O. B. Genetic analysis of honey bee, Apis dorsata populations using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Journal of King Saud University, v. 33, n. 1, p. 1018-3647, 2021.

RAMÍREZ, O. J.; ALVAREZ, S.; CONTRERAS-KALLENS, P.; BARRERA, N. P.; AGUAYO, S.; SCHUH, C. M. Type I collagen hydrogels as a delivery matrix for royal jelly derived extracellular vesicles. **Drug Delivery,** v. 27, n. 1, p. 1308-1318, 2020.

RICIGLIANO, V. A.; CANK, K. B.; TODD, D. A.; KNOWLES, S. L.; OBERLIES, N. H. Metabolomics-guided comparison of pollen and microalgae-based artificial diets in honey bees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 31, p. 9790-9801, 2022b.

RICIGLIANO, V.; WILLIAMS, S. T.; OLIVER, R. Effects of different artificial diets on commercial honey bee colony performance, health biomarkers, and gut microbiota. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 52, 2022a.

RIZKI, A. M. F.; USMAN, A. N.; RAYA, I.; DIRPAN, A.; ARSYAD, A.; FENDI, F.; SUMIDARTI, A. Effect of royal jelly to deal with stress oxidative in preconception women: A literature review. **Gaceta Sanitaria,** v. 35, p. 288–290, 2021.

ROMAN, A. Level of copper, selenium, lead, and cadmium in forager bees. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, p. 663-669, 2010.

SADEGHI, A.; MOZAFARI, A. A.; BAHMANI, R.; SHOKRI, K. Use of honeybees as bioindicators of environmental pollution in the Kurdistan province of Iran. **Journal of Apicultural Science,** v. 56, p. 83–88, 2012.

SAFFARI, A.; KEVAN, P. G.; ATKINSON, J. L. Palatability and consumption of patty-formulated pollen and pollen substitutes and their effects on honeybee colony performance. **Journal of Apicultural Science**, v. 54, n. 2, p. 63-71, 2010.

SALEH, S.; SALAMA, A.; ALI, A. M.; SALEH, A. K.; ELHADY, B. A.; TOLBA, E. Egyptian propolis extract for functionalization of cellulose nanofiber/poly (vinyl alcohol) porous hydrogel along with characterization and biological applications. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 7739, 2023.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F. Honey and Health: A Review of Recent Clinical **Research. Pharmacognosy Res**, v. 9, n. 2, p. 121-127, 2017.

SUMÁRIO

SANTOS, A. C. C.; BORGES, L. D. F.; ROCHA, N. D. C.; DE CARVALHO AZEVEDO, V. A.; BONETTI, A. M., DOS SANTOS; A. R.; FERNANDES, G. R.; DANTAS, R. C. C.; UEIRA-VIEIRA, C. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5147, 2023.

SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200286, 2018.

SARHAN, W. A.; AZZAZY, H. M.; EL-SHERBINY, I. M. Honey/chitosan nanofiber wound dressing enriched with *Allium sativum* and *Cleome droserifolia*: enhanced antimicrobial and wound healing activity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 10, p. 6379-6390, 2016.

SATTA, A.; VERDINELLI, M.; RUIU, L.; BUFFA, F.; SALIS, S.; SASSU, A.; FLORIS, I. Combination of beehive matrices analysis and ant biodiversity to study heavy metal pollution impact in a post-mining area (Sardinia, Italy). **Environmental Science and Pollution Research,** v. 19, p. 3977–3988, 2012.

SILVA, G. R.; SOUZA, B. D. A.; PEREIRA, F. D. M.; LOPES, M. D. R.; VALENTE, S. E.; DINIZ, F. M. New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymentoptera, Apidae, Meliponini). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 38, 1-9, 2014.

SILVA, M. V. D.; MOURA JR, N. G. D.; MOTOYAMA, A. B.; FERREIRA, V. M A. review of the potential therapeutic and cosmetic use of propolis in topical formulations. **Journal of Applied Pharmaceutical Science,** v. 10, p. 131–141, 2020.

SILVEIRA, M. A. D.; DE JONG, D.; BERRETTA, A. A.; DOS SANTOS GALVAO, E. B.; RIBEIRO J. C.; CERQUEIRA-SILVA, T.; AMORIM, T. C.; CONCEIÇÃO, L. F. M. R. D.; GOMES, M. M. D.; TEIXEIRA, M. B.; SOUZA, S. P.; SANTOS, M. H. C. A. D.; SAN MARTIN, R. L. A.; SILVA, M. O.; LÍRIO, M.; MORENO, L.; SAMPAIO, J. C. M.; MENDONÇA, R.; ULTCHAK, S. S.; AMORIM, F. S.; DA HORA PASSOS, R. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 138, p. e111526, 2021.

SKORBILOWICZ, E.; SKORBIŁOWICZ, M.; CIEŚLUK, I. Bees as bioindicators of environmental pollution with metals in an urban area. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, p. 229-234, 2018.

SUMÁRIO

SOUZA, I. G. B.; PATERSON, I.; MCBRIDE, M. C.; SOUZA, B. A.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T.; BENTZEN, P.; DINIZ, F. M. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using Next-Generation sequencing. **Conservation Genetics Resources**, p. 7–9, 2014.

SOUZA, T. H.; PEDROSO, C. G. S. J.; MOREIRA, D. R; CHAGAS, F.; GIGLIOLLI, A. A. S.; GUADALIN, W. G.; BENITES, A. F. G.; NASCIMENTO, J. E. M.; ROSSONI, D. F.; TOLEDO, V. D. A. A. Supplemental feeding coupled with different grafting techniques ensures better quality of queen honey bees. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-10, 2023.

STOJKOVSKA, J.; PETROVIC, P.; JANCIC, I.; MILENKOVIC, M. T.; OBRADOVIC, B. Novel nano-composite hydrogels with honey effective against multi-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8529-8543, 2019.

STUCHI, A. L. P. B.; MOREIRA, D. R.; GALHARDO, D.; DOS SANTOS, S. A.; RONQUI, L.; CANTAGALLI, L. B.; LOPES, D. A.; GIGLIOLLI, A. A. S.; TOLEDO, V. D. A. A. D.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. Comparative toxicity of fipronil, malathion, and thiamethoxam on the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 44, n. 1, p. e57846, 2022.

STUCHI, A. L. P. B.; MOREIRA, D. R.; GIGLIOLLI, A. A. S.; GALHARDO, D.; FALCO, J. R. P.; TOLEDO, V. D. A. A. D.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Toxicological evaluation of different pesticides in *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 45, n. 1, p. 58412, 2023.

SUAMTE, L.; TIRKEY, A.; BABU, P. J. Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications. **Smart Materials in Medicine**, v. 4, p. 243–256, 2023.

TAN, D. In situ formed scaffold with royal jelly-derived extracellular vesicles for wound healing. **Theranostics,** v. 13, n. 9, p. 2811-2824, 2023.

TOSI, S.; COSTA, C.; VESCO, U.; QUAGLIA, G.; GUIDO, G. A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of the Total Environment,** v. 615, p. 208–218, 2018.

TRAYNOR, K. S.; TOSI, S.; RENNICH, K.; STEINHAUER, N.; FORSGREN, E.; ROSE, R.; KUNKEL, G.; MADELLA, S.; LOPEZ, D.; EVERSOLE, H.; FAHEY, R.; PETTIS, J.; EVANS, J. D.; vanENGELSDORP, D. Pesticides in honey bee colonies: Establishing a baseline for real world exposure over seven years in the USA. **Environmental Pollution**, v. 279, p. 116566, 2021.

TSCHEULIN, T.; NEOKOSMIDIS, L.; PETANIDOU, T.; SETTELE, J. Influence of landscape context on the abundance and diversity of bees in Mediterranean olive groves. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, p. 557–564, 2011.

ULLAH, A.; SHAHZAD, M. F.; IQBAL, J.; BALOCH, M. S. Nutritional effects of supplementary diets on brood development, biological activities and honey production of *Apis mellifera* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 6861-6868, 2021.

VAN ENGELSDORP, D.; CARON, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R.; HENSON, M.; RENNICH, K.; SPLEEN, A.; ANDREE, M.; SNYDER, R.; LEE, K.; ROCCASECCA, K.; WILSON, M.; WILKES, J.; LENGERICH, E.; PETTIS, J. S. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 1, p. 115-124, 2012.

VAN ENGELSDORP, D.; HAYES JR, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 7-14, 2010.

VAN PRAAGH, J. P.; BRAUSSE, J.; TITERA, D. Mixing and storing large volumes of honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) sperm integrated in a breeding program. **Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting**, v. 25, p. 39–45, 2014.

WALLBERG, A.; BUNIKIS, I.; PETTERSSON, O. V.; MOSBECH, M. B.; CHILDERS, A. K.; EVANS, J. D.; MIKHEYEV, A. S.; ROBERTSON, H. M., ROBINSON, G. E.; WEBSTER, M. T. A hybrid de novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. **BMC Genomics**, v. 8, n. 20, p. 275, 2019.

WHITE, J.; MEIER, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons.** CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017.

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture: summary. The world of organic agriculture. statistics and emerging trends.** Bonn: Researcher Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick & IFOAM—Organics International, 2017.

WILLIAMS, G. R.; TROXLER, A.; RETSCHNIG, G.; ROTH, K.; YAÑEZ, O.; SHUTLER, D.; NEUMANN, P.; GAUTHIER, L. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14621, 2015.

WILSON, D.; MATERÓN, E. M.; IBÁÑEZ-REDÍN, G.; FARIA, R. C.; CORREA, D. S.; OLIVEIRA JR, O. N. Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. **Talanta,** v. 194, p. 611-618, 2019.

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A.R.; VARASSIN, I.G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L.T.; BUENO, R.O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A.M.; SILVA, C.I.; PADGURSCHI, M.C.G. (Org.). **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil.** São Paulo: BPBES-REBIPP, 2019.

WRIGHT, G.; NICOLSON, S. W.; SHAFIR, S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. **Annual Review of Entomology**, v. 63, n. 1, p. 327-344, 2018.

XAVIER DE FREITAS, P. V. D.; ZANATA, R. A.; SILVA, I. E. D.; FAQUINELLO, P.; SILVA-NETO, C. D. M. E. Feed supplementation in the diet of *Melipona rufiventris*. **Journal of Apicultural Research**, v. 62, n. 2, p. 211-215, 2023.

YAGHOOBI, R.; KAZEROUNI, A. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: A review. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 8, n. 3, p. 100, 2013.

YILMAZ, A. C.; AYGIN, D. Honey dressing in wound treatment: a systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 51, p. 102388, 2020.

ZARIĆ, N. M.; ILIJEVIĆ, K.; STANISAVLJEVIĆ, L.; GRŽETIĆ, I. Use of honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators for assessment and source appointment of metal pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 25828–25838, 2017.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. OneEarth, v. 4, p. 114–123, 2021.

ZEKRY, A. S. S.; ABDELLATIF, A.; AZZAZY H. M. E. Fabrication of pomegranate/honey nanofibers for use as antibacterial wound dressings. **Wound Med.**, v. 28, p. 100181, 2020.

ZULLKIFLEE, N.; TAHA, H.; USMAN, A. Propolis: Its role and efficacy in human health and diseases. **Molecules**. v. 27, n. 18, e6120, 2022.

Parte 3

BIOPROSPECÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO

3.1

Julio Cesar Polonio
João Arthur dos Santos Oliveira
Andressa Domingos Polli
João Alencar Pamphile (in memoriam)
João Lúcio de Azevedo

PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem se mostrado uma ferramenta poderosa na busca por soluções inovadoras para diversos desafios globais, desde a medicina até a agricultura (Gartland *et al.*, 2013; Eskandar, 2023). Dentro desse campo, a prospecção de microrganismos endofíticos destaca-se como uma área promissora, com potencial para revolucionar múltiplos setores (Burragoni; Jeon, 2021). Os endofíticos são microrganismos que vivem dentro de plantas sem causar doenças (Petrini, 1991), e seu estudo pode revelar novos compostos bioativos, enzimas industriais, e outros produtos biotecnológicos de alto valor como novos medicamentos, pesticidas biológicos e outros produtos agrícolas (Gouda *et al.*, 2016; Rochín-Hernández; Rochín-Hernández; Flores-Cotera, 2022).

A prospecção destes microrganismos para compostos bioativos é uma área de grande interesse. Estudos têm demonstrado que endofíticos podem produzir uma variedade de substâncias com atividades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Singh *et al.*, 2017; Ancheveeva; Daletos; Proksch, 2020). Uma das áreas mais promissoras é a descoberta de novos antibióticos, principalmente devido ao aumento da resistência bacteriana, considerando a necessidade urgente de novos agentes antimicrobianos (Silva; Cardoso; Macedo, 2023; Yang *et al.*, 2023).

Na agricultura, os endofíticos podem ser utilizados para o controle biológico de pragas e doenças, reduzindo a dependência de pesticidas químicos (Grabka *et al.*, 2022). Eles também podem promover o crescimento das plantas por meio da produção de hormônios vegetais e auxiliando na absorção de nutrientes, melhorando a saúde das plantas e aumentando os rendimentos agrícolas (Grabka *et al.*, 2022; Negrelli *et al.*, 2023).

Outra valiosa fonte de exploração são as enzimas industriais. Enzimas como celulases, proteases e lipases têm aplicações amplas, desde a indústria alimentícia até a produção de biocombustíveis (Corrêa *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019). Endofíticos podem degradar biomassa vegetal, convertendo-a em açúcares simples que podem ser fermentados para produzir etanol e outros biocombustíveis (Ahamed; Ahring, 2011; Maxwell *et al.*, 2018). Esse processo é crucial para o desenvolvimento de fontes de energia renováveis e sustentáveis.

Do ponto de vista de preservação ambiental e resolução de problemas relacionados a poluição e tratamento de efluentes industriais, outra área que apresenta forte exploração com endofíticos é a biorremediação, que pode ser definida como o uso de organismos vivos para remover ou neutralizar poluentes do ambiente (Lellis *et al.*, 2019). Endofíticos também têm sido estudados por sua capacidade de degradar compostos tóxicos, como metais pesados, pesticidas e corantes tóxicos (Bulla *et al.*, 2017; Polli *et al.*, 2023), contribuindo para a limpeza de solos e águas contaminadas.

A bioprospecção de microrganismos endofíticos também destaca a importância da conservação da biodiversidade. Muitas plantas hospedeiras de endofíticos ainda não foram estudadas, especialmente em ecossistemas biodiversos como florestas tropicais (Azevedo; Quecine, 2017). A destruição desses habitats pode levar à perda de microrganismos potencialmente valiosos antes mesmo de serem descobertos. Florestas tropicais são *hotspots* de biodiversidade, abrigando uma vasta gama de plantas e seus microrganismos endofíticos associados (Azevedo; Quecine, 2017). Proteger esses ecossistemas não só preserva a biodiversidade, mas mantém um reservatório de recursos genéticos que pode ser vital para futuras descobertas biotecnológicas.

Apesar do imenso potencial, a prospecção de microrganismos endofíticos enfrenta desafios significativos. A identificação e cultivo de endofíticos em laboratório podem ser difíceis, e a

bioprospecção requer tecnologias avançadas e abordagens interdisciplinares (Arnold, 2007). Avanços em técnicas de sequenciamento genômico e metagenômico estão facilitando a identificação de novos microrganismos e a análise de seus potenciais bioativos, assim como ferramentas de bioinformática e biologia sintética também estão permitindo a engenharia de endofíticos para produzir compostos de interesse em maior escala e com maior eficiência (Polonio *et al.*, 2016a; Pamphile; Ribeiro; Polonio, 2017). A pesquisa em endofíticos é intrinsecamente interdisciplinar, envolvendo microbiologistas, botânicos, químicos, engenheiros, entre outros profissionais, de forma que a colaboração entre essas áreas é crucial para superar os desafios e traduzir as descobertas laboratoriais em aplicações práticas.

Portanto, a prospecção biotecnológica de microrganismos endofíticos oferece uma rica fonte de novos compostos bioativos, enzimas industriais e soluções para problemas ambientais. Com o apoio contínuo à pesquisa e à inovação tecnológica, o potencial dos endofíticos pode ser plenamente realizado, contribuindo para um futuro mais sustentável e saudável. Desta forma, este capítulo visará explorar esse potencial microbiano com enfoque em trabalhos de bioprospecção de endofíticos realizados junto à linha de pesquisa 'bioprospecção e controle biológico' do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá.

2. O QUE SÃO OS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS?

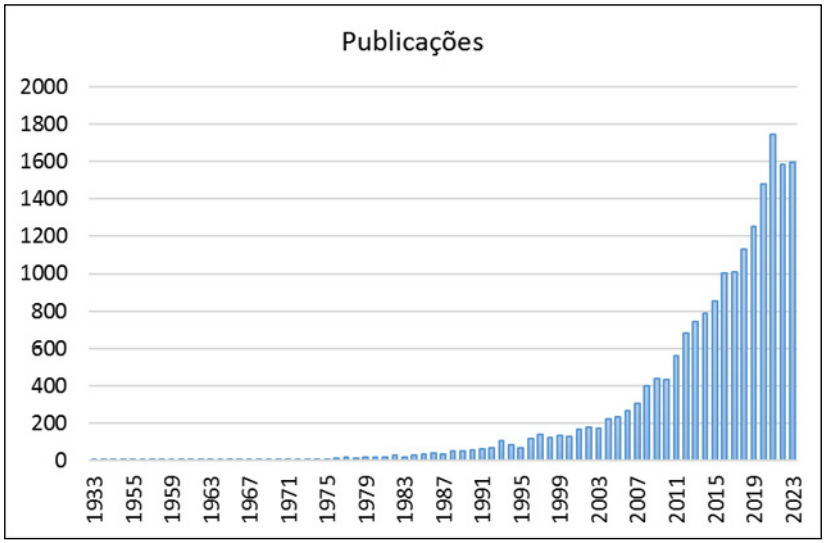
De acordo com Kobayashi e Palumbo (2000), o termo 'endofítico' refere-se a organismos que vivem no 'interior da planta'. Este conceito inclui não apenas fungos e bactérias, mas também algas e insetos. Assim, os microrganismos endofíticos ou endófitos são, no geral, fungos e bactérias que habitam as partes internas das plantas,

como folhas, caules, raízes e sementes, sem causar doenças ou formar estruturas visíveis externamente (Azevedo *et al.*, 2000). Azevedo e Araújo (2007) ampliam essa definição ao incluir todos os microrganismos que habitam tecidos e órgãos vegetais, sem causar danos às plantas hospedeiras nem produzir estruturas externas, mesmo que alguns não possam ser cultivados em laboratório.

Esta definição exclui microrganismos que formam nódulos nas raízes, como as bactérias do gênero *Rhizobium* e os fungos micorrízicos, apesar de estes também poderem atuar como endofíticos. No entanto, os endofíticos que não produzem estruturas externas eram menos estudados em comparação com os simbiontes fixadores de nitrogênio até recentemente (Lacava *et al.*, 2010), o que justifica essa separação. Neste sentido, Mendes e Azevedo (2007) propuseram a divisão dos endófitos em dois tipos: aqueles que não produzem estruturas externas na planta e aqueles que produzem (tipo I e II, respectivamente).

Os primeiros relatos sobre esses microrganismos foram feitos por 'de Bary' em 1866, mas eles foram ignorados por mais de um século devido à falta de entendimento sobre suas funções nas plantas e à dificuldade de estudo por não apresentarem estruturas visíveis (Peixoto-Neto; Azevedo; Araújo, 2002). Em 1924, Lewis observou a presença de fungos endofíticos em folhas de gramíneas, mas seus estudos não produziram resultados promissores, e o interesse pelos endofíticos só se intensifica na década de 1980 (Figura 1). Atualmente, devido às suas características únicas de adaptação e à capacidade de estabelecer relações simbióticas intrínsecas com as plantas hospedeiras (Schulz; Boyle, 2005; Kusari; Singh; Jayabaskaran, *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2023), além do desenvolvimento do setor biotecnológico, os microrganismos endofíticos têm atraído a atenção da comunidade científica como fontes alternativas de nutrientes para plantas, controle de pragas e patógenos, produção de enzimas e compostos bioativos, e biorremediação de áreas poluídas, entre outras aplicações (Lacava *et al.* 2010; Burragoni; Jeon, 2021).

Figura 1. Número de publicações relacionadas ao termo 'endofíticos' (em inglês: 'endophytic') por ano de acordo com a base de dados SCOPUS



Diversos estudos sobre a diversidade de comunidades endofíticas microbianas foram realizados em plantas com propriedades medicinais (Wiyakrutta *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008; Bernardi-Wenzel *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2012; Rhoden *et al.*, 2012; Orlandelli *et al.*, 2012; Alvin; Miller; Neilan, 2014; Gangwar *et al.*, 2014; Nalini; Sunayana; Prakash, *et al.*, 2014; Rhoden *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2021), de interesse econômico (Zinniel *et al.*, 2002; Leme *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Romero; Marina; Peickenstain, *et al.*, 2014; Bongiorno *et al.*, 2016; Felber *et al.*, 2016; Montanari-Coelho *et al.*, 2018) entre outras de interesse ecológico (Clay, 1988; Zimmerman; Vitousek, 2012; Debbab; Aly; Proksch, 2013; Higgins *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2021a; 2021b).

Praticamente todas as plantas estudadas em ecossistemas naturais são colonizadas por microrganismos endofíticos (Kogel; Franken; Hückelhoven, 2006). Estudos de Arnold (2008) sobre a distribuição demográfica dessas comunidades microbianas mostraram

que, em altas latitudes, há poucas espécies distribuídas em muitas classes distintas de ascomicetos, enquanto em regiões tropicais há um pequeno número de classes com muitas espécies. Rhoden *et al.* (2013) destacam o potencial dessa área de estudo no Brasil, considerando que a sua grande biodiversidade, que atualmente é estimada, em termos de flora, em cerca de 50 mil espécies, incluindo algas, fungos, briófitas, pteridófitas, licófitas, gimnospermas e angiospermas (Gomes-da-Silva *et al.*, 2021; http://floradobrasil.jbrj.gov.br).

3. O PAPEL ECOLÓGICO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

Microrganismos endofíticos têm a capacidade de colonizar tanto os espaços intercelulares quanto intracelulares dos tecidos vegetais (Stone *et al.*, 1994; Ohki *et al.*, 2002; Schulz; Boyle, 2005; Bernardi-Wenzel *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2012), sem causar danos às plantas. Esta característica define uma relação assintomática entre os microrganismos e as plantas (Pamphile; Azevedo, 2002).

Todas as interações endofíticas são baseadas em um equilíbrio do antagonismo entre o hospedeiro e o endófito. Os microrganismos produzem metabólitos necessários para sua colonização, enquanto as plantas produzem substâncias que impedem a infecção microbiana (Schulz; Boyle, 2005). As diversas interações entre plantas e microrganismos envolvem complexas rotas metabólicas que resultam nas características únicas dos endófitos, permitindo-lhes adaptar-se aos ambientes específicos dentro dos tecidos vegetais de forma assintomática. Essa interação planta-hospedeiro exige uma

atividade metabólica específica, tornando-se um nicho ecológico com grande potencial para a descoberta de novas linhagens produtoras de enzimas e compostos orgânicos de interesse comercial (Kusari; Singh; Jayabaskaran, 2014).

Schulz e Boyle (2005) discutem extensivamente o comportamento dos microrganismos endofíticos, observando que qualquer órgão vegetal pode ser colonizado por endófitos específicos em determinadas fases de desenvolvimento da planta hospedeira. No entanto, a colonização, seja endofítica ou patogênica, depende não apenas dos mecanismos de adaptação dos organismos envolvidos, do órgão vegetal e do estágio de desenvolvimento da planta, mas também de fatores ambientais e variações na virulência dos endófitos. Kusari *et al.* (2012) destacam a interação química entre microrganismos e seus hospedeiros, enfatizando que existem várias barreiras físicas e químicas que devem ser superadas para que um microrganismo se estabeleça como endófito. A hipótese do antagonismo balanceado sugere que um microrganismo endofítico consegue evitar as respostas de defesa de seu hospedeiro antes de ser incapacitado por metabólitos tóxicos da planta, resultando em uma colonização assintomática onde o equilíbrio do antagonismo entre planta e microrganismo é mantido. Se a virulência do fungo e a defesa da planta permanecem equilibradas, a associação continuará assintomática e avirulenta. No entanto, se a planta não conseguir se defender adequadamente contra a ação fúngica, pode se estabelecer uma relação patogênica.

Na associação assintomática entre planta e endófito, esses microrganismos podem atuar em conjunto com a planta contra a atividade de patógenos, através de um sinergismo balanceado das atividades metabólicas da planta e dos endófitos envolvidos. Este equilíbrio é fundamental para a manutenção da saúde da planta e para a prevenção de infecções patogênicas, demonstrando a importância das interações metabólicas específicas entre plantas e seus microrganismos endofíticos (Polonio *et al.,* 2016b).

Schulz *et al.* (2002) propõem que os microrganismos endofíticos representam uma excelente fonte para a bioprospecção microbiana devido à sua estreita relação com as plantas hospedeiras. O estudo dessa interação endófito-hospedeiro pode levar à identificação de fontes alternativas de substâncias com relevância biotecnológica (Santos *et al.*, 2008). Essas substâncias podem incluir metabólitos primários e secundários com propriedades herbicidas, antifúngicas, antibacterianas e antitumorais (Stierle *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002; Polonio *et al.*, 2016a; Ataides *et al.*, 2018; Golias *et al.*, 2020; Polli *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022; Espírito-Santo *et al.*, 2023; Garcia *et al.*, 2023). Além disso, podem ser identificadas enzimas que degradam e lisam a parede celular de fungos fitopatogênicos (Elad *et al.*, 1982; Papavizas, 1985; Ridout; Coley-Smith; Lynch, 1988; Pereira *et al.*, 2011; Ting *et al.*, 2012; Schoffen *et al.*, 2020).

Além da interação entre endófitos e plantas, é crucial entender as interações entre os próprios microrganismos endofíticos. Estudos indicam que essas interações envolvem atividades de moléculas sinalizadoras e indutoras que podem ativar rotas biossintéticas anteriormente silenciadas em culturas axênicas desses microrganismos, ou seja, atividades em '*quorum sensing*' e/ou '*quorum quenching*' (Hughes; Sperandio, 2008; Scherlach; Hertweck, 2009; Kusari *et al.*, 2012; Kusari; Singh; Jayabaskaran, 2014; Mookherjee *et al.*, 2018; Joo; Deyrup; Shim, 2021).

Explorar essas interações pode revelar novas vias metabólicas e substâncias bioativas, ampliando ainda mais o potencial dos endofíticos na biotecnologia. Assim, a pesquisa nesse campo não só visa a descoberta de novos compostos bioativos, mas também a compreensão de como os microrganismos se comunicam e regulam suas atividades metabólicas em ambientes naturais e controlados.

4. TÉCNICAS E MÉTODOS UTILIZADOS PARA ISOLAR E IDENTIFICAR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

4.1 ISOLAMENTO

Os microrganismos endofíticos têm ganhado atenção significativa na comunidade científica devido ao seu potencial para a produção de novos produtos naturais com diversas aplicações nos domínios médico, agrícola e industrial (Sahoo *et al.*, 2017). O isolamento e a caracterização destes são passos cruciais para desbloquear o seu potencial biotecnológico.

A seleção da planta hospedeira apropriada é um primeiro passo crítico no isolamento de microrganismos endofíticos. Estudos destacaram a importância de considerar fatores como biodiversidade vegetal, localização geográfica e condições ambientais ao selecionar plantas hospedeiras (Strobel, 2007). As plantas medicinais, em particular, surgiram como fontes promissoras de endofíticos, uma vez que muitas vezes abrigam uma gama diversificada de metabólitos secundários que podem ser explorados para diversas aplicações (Polonio *et al.*, 2015; Adeleke; Babalola, 2021).

Uma vez selecionada a planta hospedeira, o próximo passo envolve a esterilização da superfície dos tecidos vegetais para eliminar quaisquer microrganismos epífitos que possam interferir no isolamento dos endófitos. Isso normalmente envolve a lavagem sequencial do material vegetal com vários desinfetantes, como etanol, hipoclorito de sódio e água estéril (Pathak; Keharia.; Kharkwal, 2009; Pimentel *et al.*, 2011).

Os tecidos vegetais esterilizados podem então ser dissecados e plaqueados em meios de cultura adequados para permitir o crescimento de microrganismos endofíticos. A escolha do meio de cultura também é crucial, pois diferentes microrganismos terão necessidades nutricionais variadas. Relatos indicam que a adição de extratos vegetais aos meios de cultura pode aumentar significativamente a eficiência de isolamento de microrganismos endofíticos, uma vez que esses extratos podem fornecer fatores de crescimento essenciais e imitar o ambiente natural dos endófitos (Strobel; Daisy; Castillo, 2005).

A identificação e caracterização dos endofíticos isolados podem ser realizadas utilizando uma combinação de técnicas bioquímicas e moleculares. Ensaios bioquímicos podem ser empregados para rastrear a produção de compostos antimicrobianos ou bioativos pelos endófitos (Kashyap *et al.*, 2023). Além disso, técnicas moleculares, como extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de regiões *barcode*, podem ser usadas para determinar as afiliações filogenéticas dos endófitos isolados.

De certa forma, a caracterização de um microrganismo isolado como endofítico é muito dependente do método de isolamento. Portanto, ao detalhar protocolos em redação científica, principalmente para isolamento de microrganismos endofíticos, há vários aspectos importantes que devem ser expostos para garantir que o protocolo seja claro e reprodutível como segue-se:

1. Seleção da planta hospedeira: devem ser explicados os critérios para selecionar a planta hospedeira, incluindo as razões para considerar fatores como biodiversidade vegetal, localização geográfica e condições ambientais.

2. Esterilização superficial: descrever as etapas sequenciais de lavagem e as concentrações e tempo de exposição à desinfetantes utilizados (por exemplo, etanol e hipoclorito de sódio) para a esterilização de superfície dos tecidos vegetais.

3. Dissecção e Plaqueamento: deve-se detalhar sobre como os tecidos vegetais são dissecados e os meios de cultura específicos usados para plaqueamento, incluindo quaisquer extratos vegetais adicionados para aumentar a eficiência do isolamento.

4. Técnicas de identificação e caracterização: detalhar os ensaios bioquímicos e/ou técnicas moleculares (incluindo extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento) utilizados para a caracterização e identificação dos microrganismos.

5. Controles e Replicação: mencione quaisquer controles utilizados na experimentação e quantas vezes o protocolo foi replicado para garantir a confiabilidade dos resultados.

6. Coleta e Análise de Dados: descrever como os dados foram coletados durante a pesquisa e os métodos utilizados para análise.

7. Solução de problemas potenciais: fornecer *insights* sobre quaisquer problemas potenciais que possam surgir durante o protocolo e como eles podem ser resolvidos.

8. Considerações Éticas: se aplicável, inclua informações sobre considerações éticas, especialmente se o material vegetal for de espécies protegidas ou raras.

A extensa pesquisa dedicada à caracterização e identificação da população diversificada de microrganismos endofíticos associados a vários hospedeiros vegetais revelou uma riqueza de informações valiosas sobre as intrincadas interações planta-endófito (Kekuda, 2016). Ao incorporar estudos de caso específicos e resultados de pesquisas recentes, a complexidade e a natureza multifacetada dessas relações simbióticas pode ser retratada de forma mais vívida. A compreensão dos mecanismos de interação, sejam simbióticos, comensalistas ou patogênicos, lança luz sobre as vantagens ou desvantagens potenciais que esses micróbios oferecem às suas plantas hospedeiras (Saikkonen *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2020).

A aplicação de tecnologias metagenômicas revolucionou a nossa apreciação pela diversidade microbiana dentro das plantas, descobrindo comunidades biológicas vastas e anteriormente descaracterizadas (Chen *et al.*, 2015). Além disso, sabe-se agora que fatores ambientais como qualidade do solo, condições climáticas e fisiologia vegetal influenciam significativamente as populações endofíticas (Papik *et al.*, 2020). As abordagens da genômica funcional também ajudam a elucidar as bases genéticas dos efeitos mediados por endófitos na saúde das plantas e na resiliência ao estresse (Bosamia, Kalyani; Modi, 2020).

Além disso, é fundamental reconhecer a dinâmica das interações micróbio-micróbio dentro da comunidade endofítica, pois essas interações podem influenciar a ecologia microbiana geral da planta (Ramadurai; Moorthy; Balasundaram, 2021). Do ponto de vista das aplicações biotecnológicas, a descoberta de microrganismos endofíticos com capacidades metabólicas únicas é uma promessa para a inovação de práticas agrícolas ecológicas, novos produtos farmacêuticos e métodos eficientes de biocontrole.

No entanto, é crucial reconhecer os desafios que acompanham esta investigação, tais como as dificuldades em isolar e cultivar uma gama abrangente de micróbios endofíticos, dadas as suas intrincadas associações com tecidos vegetais. Estas limitações sublinham a necessidade de métodos avançados independentes da cultura para traçar com precisão o perfil destas comunidades.

4.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO: TÉCNICAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAR E CARACTERIZAR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

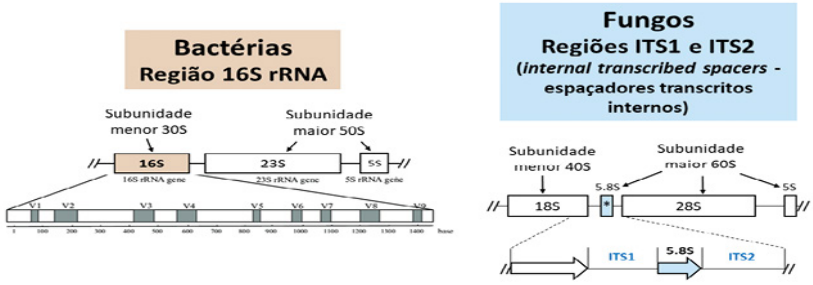
Os endófitos, individualmente ou de forma coletiva, podem desempenhar papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento e proteção das plantas, tornando-os alvos valiosos para pesquisa e

aplicações práticas (Sharma *et al.*, 2018). Avanços nas tecnologias genômicas e pós-genômicas permitiram que os pesquisadores se aprofundassem nas capacidades e funcionalidades desses microrganismos, esclarecendo suas contribuições potenciais para a saúde e produtividade das plantas (Sahoo *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Renugadevi *et al.*, 2021).

O primeiro passo crucial na caracterização de microrganismos endofíticos envolve seu isolamento e cultivo bem-sucedidos (Manias *et al.*, 2020; Aleynova; Kiselev, 2023), conforme discutido anteriormente. Após o isolamento, torna-se essencial a identificação dos endofíticos.

A taxonomia e a filogenia dos microrganismos endofíticos são comumente determinadas por meio do uso de marcadores moleculares. Nas bactérias, o gene 16S do RNA ribossômico (rRNA) (Figura 2) tem sido o principal alvo da identificação molecular devido à sua presença em todas as bactérias e ao equilíbrio que oferece entre regiões conservadas e variáveis. Este equilíbrio permite a distinção entre diferentes táxons bacterianos. As sequências do gene 16S rRNA fornecem uma caracterização relativamente imparcial da diversidade bacteriana e de arqueias, o que é essencial para pesquisas de biodiversidade em larga escala (Goodrich *et al.*, 2014).

Figura 2. Principais marcadores moleculares para fins taxonômicos de bactérias e fungos



Embora o sequenciamento do gene 16S rRNA seja eficaz para a identificação bacteriana, ele tem suas limitações na resolução de espécies intimamente relacionadas. Portanto, outros marcadores genéticos também são utilizados, como o gene 23S rRNA, que é maior que o 16S rRNA, fornecendo mais informações, que podem ser particularmente úteis para distinguir espécies intimamente relacionadas. Além de genes ribossomais, outros genes para enzimas e proteínas de caráter constitutivo são frequentemente utilizados em abordagens multilocus, como *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *gyrB* (subunidade B da girase), entre outros (Maiden, 2006; Glaeser; Kämpfer, 2015).

A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA oferece diversas vantagens para a taxonomia bacteriana, contribuindo para a nossa compreensão das comunidades microbianas. Este gene tem um caráter de 'universalidade', estando presente em todas as bactérias, tornando-o um marcador universal para identificação de espécies bacterianas (Goodrich *et al.*, 2014). O gene contém sequências altamente conservadas, que são úteis para a amplificação do gene de diversas bactérias, e regiões variáveis que fornecem sequências de assinatura específicas da espécie (Bredow *et al.*, 2015). As sequências conservadas permitem o alinhamento das sequências do gene 16S rRNA de diferentes bactérias. Porém, embora certas regiões do gene sejam conservadas, outras variam significativamente entre os diferentes táxons bacterianos. Esta variabilidade permite aos investigadores distinguirem entre diferentes gêneros e, em muitos casos, espécies dentro de uma comunidade, possibilitando a construção de árvores filogenéticas para compreender as relações evolutivas (Ntushelo *et al.*, 2013).

Por ser um método bem estabelecido, o sequenciamento do gene 16S rRNA possui um grande conjunto de dados de referência, o que permite a comparação entre diferentes estudos e bancos de dados. Além disso, tecnologias de sequenciamento de alto rendimento melhoraram a velocidade e reduziram o custo do sequenciamento do

gene 16S rRNA, tornando-o uma escolha mais econômica para estudos em larga escala, sendo uma ferramenta ideal para traçar o perfil de comunidades bacterianas em amostras ambientais, fornecendo informações sobre a diversidade e composição das populações bacterianas (Goodrich *et al.*, 2014; Weinroth *et al.*, 2022).

Embora o gene 16S rRNA não forneça informações diretamente sobre a função bacteriana, as sequências podem ser ligadas a funções conhecidas em bancos de dados por meio de predições funcionais, que, em combinação com dados metagenômicos, podem fornecer informações sobre os papéis potenciais das bactérias em seus ambientes (YIN; WANG, 2021).

Ao usar o sequenciamento do gene 16S rRNA, os pesquisadores podem criar perfis de comunidades bacterianas que contribuem para a nossa compreensão de seus papéis ecológicos em diferentes ambientes, desde microbiomas humanos e animais até solos e ecossistemas aquáticos (Compant *et al.*, 2021). Esta informação é vital para a gestão dos recursos ambientais, o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas e a compreensão da dinâmica da ecologia microbiana face às mudanças ambientais.

Os processos para análises de diversidade microbiana com a região 16S de rRNA envolvem etapas como:

1. Amostragem: Os pesquisadores coletam amostras do ecossistema de interesse, como solo, água, ar ou superfícies de plantas.

2. Extração de DNA: O DNA é extraído das amostras coletadas, isolando o material genético dos microrganismos presentes no ambiente.

3. Amplificação por PCR: Usando a reação em cadeia da polimerase, o gene 16S rRNA é amplificado seletivamente usando primers que têm como alvo regiões conservadas comuns à maioria das bactérias.

4. Sequenciamento: Os genes 16S rRNA amplificados são então sequenciados, muitas vezes usando tecnologias de sequenciamento de alto rendimento que podem gerar grandes volumes de dados.

5. Análise Bioinformática: As sequências obtidas são comparadas com bancos de dados de sequências conhecidas do gene 16S rRNA para identificar as espécies bacterianas presentes na amostra. Ferramentas de bioinformática também são utilizadas para analisar a diversidade e abundância relativa dessas espécies.

6. Perfil da Comunidade: Os dados fornecem um perfil da composição e estrutura da comunidade microbiana, dando informações sobre os diferentes táxons bacterianos presentes e as suas proporções dentro da comunidade.

7. Relativamente imparcial: O método fornece uma caracterização relativamente imparcial da diversidade bacteriana, permitindo a detecção de membros dominantes e raros de comunidades microbianas.

Para fungos, as regiões espaçadoras internas do transcrito (ITS) dos clusters de genes para RNA ribossômicos são os principais marcadores moleculares para fins taxonômicos. Essa região foi designada como código de barras fúngico pelo Consórcio 'Código de Barras da Vida' ('*Barcode for Life*' - https://ibol.org/) devido à sua capacidade de diferenciar entre gêneros e, por vezes, a nível de espécie. As regiões ITS1 e ITS2 flanqueiam o gene 5.8S (Figura 2), sendo altamente variáveis e permitem a discriminação até o nível da espécie para parte dos fungos conhecidos, sendo extremamente eficaz para a diferenciação à nível de gênero. Outras regiões gênicas para rRNA também são utilizadas como 18S e 28S, na qual também se apresentam conservados e são úteis para elucidar relações evolutivas mais profundas. Além destes, de forma semelhante ao que foi apresentado para as bactérias, outros genes, especialmente aqueles

chamados '*housekeeping*', são frequentemente utilizados para taxonomia multilocus, como *TEF1* (Fator de elongação de tradução 1-alfa) e *RPB2* (RNA polimerase II) (Lin *et al.*, 2023). São genes codificadores de proteínas usados em conjunto com ITS para identificação mais precisa e para resolver relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos.

Embora a região ITS seja amplamente utilizada para a identificação taxonômica de fungos, existem várias limitações à sua aplicação, como: a) limites de resolução: para alguns grupos de fungos, a região ITS não fornece resolução suficiente para diferenciar espécies estreitamente relacionadas devido à variabilidade insuficiente. b) variação intraespecífica: Em alguns fungos, existe uma variação intraespecífica significativa na região ITS, o que pode levar a dificuldades na definição dos limites das espécies. c) qualidade das bases de dados de referência: a precisão da identificação baseada em ITS pode ser comprometida por erros ou entradas incompletas em bases de dados de referência, onde as sequências podem ser mal rotuladas ou não representar toda a diversidade de sequências de ITS fúngicas. d) evolução concertada: a região ITS faz parte do cístron do rDNA, que está presente em múltiplas cópias no genoma. Espera-se que essas cópias passem por uma evolução concertada para manter a uniformidade da sequência, mas às vezes o processo é incompleto, resultando em múltiplas sequências ITS diferentes dentro de um único organismo. e) transferência horizontal e hibridização de genes: alguns fungos experimentam transferência ou hibridização horizontal de genes, levando à presença de sequências ITS que não seguem a história evolutiva do organismo, complicando as interpretações filogenéticas. f) questões de amplificação e clonagem: quando existem diferentes tipos de ITS num organismo ou amostra, a amplificação seletiva de uma variante em detrimento de outra pode levar a uma compreensão distorcida da comunidade fúngica. g) complexidade das amostras ambientais: as amostras ambientais contêm frequentemente ADN de uma variedade de organismos, incluindo fungos,

bactérias e outros eucariotas, o que pode dificultar a segmentação e amplificação apenas de sequências ITS fúngicas.

Devido a estas limitações, por vezes pode ser necessário complementar os dados se sequenciamento das regiões ITS com marcadores ou métodos adicionais para uma identificação e caracterização mais abrangente e precisa de espécies de fungos, como outros genes codificantes, de preferência, genes constitutivos como TEF1, Beta-tubulina entre outros (Golias *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2021b), ou ainda, empregar análises metagenômicas e metatranscriptômicas, para alcançar uma compreensão mais abrangente da diversidade fúngica e para melhorar a resolução taxonômica no estudo de comunidades fúngicas.

Nos últimos anos, abordagens de sequenciamento multilocus, utilizando uma combinação de marcadores genéticos permitiram explorar a diversidade, reclassificar várias linhagens, determinar funções e interações de microrganismos endofíticos com detalhes sem precedentes, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas (Araujo, 2014; Gouda *et al.*, 2016; Sahoo *et al.*, 2017; Renugadevi *et al.*, 2021).

Além das abordagens moleculares, técnicas bioquímicas têm sido amplamente utilizadas para caracterizar as capacidades funcionais dos microrganismos endofíticos. Estes incluem a avaliação das atividades enzimáticas, produção de metabólitos secundários, características de promoção do crescimento das plantas e outras propriedades bioquímicas relevantes (Alberto *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019; Balbinot *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

Ensaios enzimáticos, como aqueles para celulases, quitinases e fosfatases, têm sido empregados para avaliar o potencial dos endófitos em degradar polímeros vegetais complexos, antagonizar fitopatógenos e solubilizar nutrientes (Santos *et al.*, 2019; Renugadevi *et al.*, 2021). Além disso, a detecção de metabólitos secundários, como compostos antimicrobianos, fitohormônios e outras moléculas

bioativas, forneceu informações sobre os papéis ecológicos e o potencial biotecnológico dos micróbios endofíticos, como nas características promotoras do crescimento das plantas, incluindo a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfato, a produção de sideróforos e ACC desaminase (Pamphile; Ribeiro; Polonio, 2017; Beraldo-Borrazzo *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

A caracterização de microrganismos endofíticos através de uma combinação de técnicas moleculares e bioquímicas tem sido fundamental para avançar na nossa compreensão destes enigmáticos habitantes microbianos. Desde a descoberta da sua diversidade taxonômica até à elucidação das suas capacidades funcionais, estas abordagens abrangentes abriram novas fronteiras no campo da investigação sobre endófitos. Ao aproveitar o poder dessas metodologias de ponta, os pesquisadores podem continuar a explorar o potencial inexplorado dos microrganismos endofíticos, levando a aplicações inovadoras em vários domínios (Strobel, 2018; Maiyappan *et al.*, 2020; Renugadevi *et al.*, 2021; Kashyap *et al.*, 2023).

5. EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS

O perfil bioquímico abrangente, combinado com técnicas moleculares, permitiu desvendar as intrincadas relações entre microrganismos endofíticos e suas plantas hospedeiras, abrindo caminho para o desenvolvimento de aplicações inovadoras na agricultura, biorremediação, restauração ambiental e indústrias farmacêuticas (Zheng *et al.*, 2016; Kumar; Saxena; Tomar, 2017; Pamphile; Ribeiro; Polonio, 2017; Manganyi; Ateba, 2020). Desta forma, neste subitem serão abordados trabalhos e resultados obtidos em pesquisas científicas nos últimos anos, principalmente relacionados aos projetos de pesquisa desta linha de pesquisa junto ao PBA.

5.1 PROMOÇÃO DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL E AGENTES DE BIOCONTROLE

A seleção de endófitos que atuem no controle de fitopatógenos, e que produzam compostos com atividades biológicas para promoção de desenvolvimento vegetal abrem um campo de produção de novos insumos, na forma de inoculantes ou formulações químicas de origem microbiana com menor impacto ambiental, para culturas importantes (Schoffen *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022). A busca de novas linhagens microbianas para a aplicação na forma de inoculantes agrícolas e produção de compostos orgânicos, representa um grande nicho de exploração para a substituição do uso de fungicidas, herbicidas, entre outros compostos com atividades relacionadas a ações biológicas de doenças e na produção de compostos com grande potencial na área de síntese orgânica (Negrelli *et al.*, 2023).

Especialmente nos últimos anos os micro-organismos endofíticos foram reconhecidos e estudados, identificados molecularmente via sequenciamento do rDNA (Rhoden *et al.*, 2013) e por análise de múltiplos loci gênicos (Polonio *et al.*, 2016a; Silva *et al.*, 2020), graças à descoberta da capacidade dos mesmos de protegerem seu hospedeiro do ataque de insetos, patógenos e herbívoros domésticos, possuindo capacidade de produzir alterações fisiológicas nos vegetais que os albergam, sendo responsáveis pela produção de fármacos como antibióticos e antifúngicos, antitumorais e promovendo o crescimento da planta (Azevedo, 1999; azevedo *et al.*, 2000, Azevedo; Araújo, 2007; Orlandelli *et al.*, 2017).

O fenômeno de antagonismo entre microrganismos refere-se à capacidade da microbiota normal (p. ex., endófitos) em competir com organismos patogênicos e, em algumas circunstâncias, combater seu crescimento eficazmente, diminuindo seus nutrientes ou produzindo alguma substância desfavorável aos mesmos. Interações antagônicas entre os microrganismos na natureza, incluindo a antibiose, a competição e o parasitismo, servem de mecanismos básicos pelos quais os agentes de biocontrole atuam (Sornakili *et al.*, 2020).

Araújo *et al.* (2002), relacionam a dinâmica da interação planta-patógeno-endófito com o desenvolvimento de estratégias de controle do patógeno. Para isso, é necessário o conhecimento da comunidade endofítica associada ao hospedeiro de interesse, dos processos de patogenicidade e das possíveis interações do patógeno alvo com esses endófitos, que estão vivendo em harmonia com a planta hospedeira. Porém, se ocorrer um desequilíbrio na população de endófitos pode ocorrer o estabelecimento de patógenos.

Os microrganismos podem atuar direta ou indiretamente sobre os patógenos, inibindo o seu desenvolvimento. As principais estratégias utilizadas pelos endófitos são: competição por espaço e nutrientes; o antagonismo, onde o fungo produz compostos contra o patógeno e desenvolvimento de uma barreira física feita pelo fungo endofítico que coloniza interna e externamente os tecidos da planta hospedeira, impedindo assim o acesso do patógeno; produção de enzimas hidrolíticas que degradam as células dos microrganismos patogênicos, reduzindo assim sua variabilidade e indução de resistência sistêmica, que podem levar a planta a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno, ou alterar a morfologia do vegetal (Maccheroni; Araújo; Lima, 2010). Em alguns casos, o controle é indireto e o endofítico produz metabólitos que retardam o desenvolvimento do patógeno (Latz *et al.*, 2018).

De acordo com Lira-Cadete *et al.* (2012), alguns microrganismos, principalmente as bactérias, apresentam a capacidade de se associar às plantas e estimular o desenvolvimento destas e, portanto, torna-se importante a bioprospecção de isolados bacterianos com potencial para promover o desenvolvimento vegetal. Sendo assim, sobressaem-se as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico e fixadoras de nitrogênio. O emprego de inoculantes compostos por microrganismos endofíticos, como bactérias e fungos, são importantes ferramentas para favorecer o desenvolvimento de culturas de importância agronômica, contribuindo para o aumento da produtividade, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzindo os

custos e a quantidade de adubos nitrogenados, visando a preservação ambiental. Trabalhos com inoculantes produzidos a partir de bactérias fixadoras de nitrogênio tem buscado avaliar sua contribuição na eficiência do crescimento vegetal e ganho de produtividade, sobretudo quando somado a isso, essas bactérias ainda apresentam atividade biológica no controle de fitopatógenos ou resistência a outro tipo de estresse (Assumpção *et al.*, 2009; Bianchet *et al.*, 2013; Compant *et al.*, 2016; Kong; Glick, 2017).

Neste contexto, trabalhos direta ou indiretamente relacionados ao PBA foram realizados nos últimos anos, com enfoque em selecionar novas cepas microbianas para atuarem como agentes de controle biológico e/ou como promotores de desenvolvimento vegetal. Schoffen *et al.* (2020) identificaram e demonstraram o uso de *Trichoderma atroviride* isolado de cultura orgânica de cafeeiros com atividade de promoção de crescimento em tomateiros, além de atividade fitoprotetiva contra *Fusarium oxysporum*. Neste trabalho, ainda foi possível observar a interação micoparasítica do endófito frente ao fitopatógeno, destacando-se o fato de que o comportamento desta linhagem como endofítico pode favorecer a sua disseminação sistêmica pelas plantas, ocupando nichos que seriam ocupados por fitopatógenos e, portanto, protegendo o vegetal.

Outros trabalhos como em Ribeiro *et al.* (2021a), Santos *et al.* (2019) e Oliveira *et al.* (2021) também demonstram atividades promissoras com fungos endofíticos, destacando as linhagens *Colletotrichum* sp. PE-36, *Alternaria* sp. PL-75, *Diaporthe citri* SS81, entre outras. A linhagem *Alternaria* sp. PL-75, isolada da planta *Pachystachys lutea* (Acanthaceae), apresentou atividade para solubilização de fosfato (índice de 4,29), produção de ácido 3-indolacético (AIA) de 1,73 µg/mL, atividade antagonistica em cultura dupla e de seus metabólitos contra fitopatógenos, em especial contra *Moniliophtora perniciosa* (agente causador da 'vassoura-de-bruxa' no cacau), além da promoção do desenvolvimento de raízes de tomateiros. Essa mesma linhagem foi posteriormente submetida a ensaios de melhoramento

genético por Ferreira *et al.* (2023), onde foi caracterizada por MLSA como *Alternaria alternata* e submetida a obtenção de mutantes auxotróficos por meio da exposição ao bromato de potássio. Mutantes auxotróficos foram avaliados quanto a produção de AIA e solubilização de fosfato, e então, os melhores produtores foram submetidos ao processo de fusão de protoplastos, resultando principalmente num aumento de aproximadamente 10 vezes na produção de AIA em relação a linhagem selvagem.

Oliveira *et al.* (2021) trabalharam com mutantes e recombinantes endofíticos da espécie *Colletotrichum karstii* no qual também foi observado um potencial de utilização destes microrganismos e de se utilizar abordagens clássicas de melhoramento genético microbiano para aprimorar características que podem ser de interesse para o desenvolvimento de linhagens como inoculantes agrícolas.

Emmer *et al.* (2021) e Beraldo-Borazzo *et al.* (2021) realizaram estudos com bactérias endofíticas. Emmer et al (2021) observaram que o isolamento de bactérias endofíticas da planta suculenta *Echeveria laui* (Crassulaceae) resultou em um grande número de isolados do gênero *Pantoea*, sendo que este gênero se apresentou promissor em ensaios com feijão preto como promotoras de crescimento. Beraldo-Borazzo *et al.* (2021) também isolaram bactérias endofíticas, porém de cactos Mandacaru selvagem (*Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)) e de uma linhagem da planta que foi regenerada de cultivo *in vitro*. Neste trabalho, observou-se que houve variação na microbiota cultivável, sendo que algumas linhagens como *Bacillus licheniformis* CR09, apresentou atividade de produção de exopolissacarídeos e de fixação biológica de nitrogênio. Além desta, outras linhagens mostraram-se promissoras devido a capacidade de produzir o fitohormonio ácido 3-indolacético (AIA) como o isolado *Corynebacterium mycetoides* CS02.

Felber *et al.* (2019), utilizando as linhagens de fungos endofíticos *Diaporthe schini* B46-64 e C27-07, ambos isolados de cultivares

de *Vitis labrusca*, buscaram obter linhagens geneticamente modificadas com genes de fluorescência para estudar o processo de infecção destes microrganismos em videiras. Além disso, observou-se que alguns transformantes apresentaram maior atividade antagônica contra o fitopatógeno *Glomerella* sp. CNPUV 378 quando comparada à linhagem selvagem. Este trabalho demonstra que abordagens de engenharia genética também podem ser utilizadas em microrganismos endofíticos buscando melhorias nos seus efeitos benéficos às plantas.

Ainda, o estudo de interações microbianas entre endófitos e fitopatógenos podem fornecer informações importantes para lidar com problemas como capacidade infectiva e de gerar danos às plantas cultivadas. No trabalho realizado por Rosseto *et al.* (2016) é demonstrado a presença de micovírus em linhagens fúngicas fitopatogênicas de videiras, pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, sendo que em linhagens endofíticas o mesmo não foi observado, podendo este fato estar correlacionado com a virulência do fitopatógeno.

5.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS

Os microrganismos endofíticos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários bioativos de estrutura única, incluindo alcaloides, benzopiranonas, quinonas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, terpenoides, tetralonas, xantonas, entre outros (Newman; Cragg, 2007; Pamphile; Ribeiro; Polonio, 2017; Singh; Kumar, 2023). Os compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos, têm apresentado resultados promissores na área da saúde, com estudos apontando para o potencial antimicrobiano, antiviral, antitumoral, antioxidante, antineoplásico, imunossupressor e inibidor de acetilcolinesterase (Joseph; Priya, 2011; Lacerda; Polonio; Golias, 2022; Singh; Kumar, 2023).

Em Golias *et al.* (2020) foi explorada a diversidade de fungos endofíticos associados a planta Quaresmeira (*Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae)), na qual foram isolados e identificados 30 fungos que compreendiam 8 diferentes gêneros incluindo *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Xylaria*, *Hypoxylon*, *Fusarium*, *Nigrospora* e *Cercospora*. Dentre estes, foi observada atividade anti-protozoaria para o extrato produzido pelo isolado *Phyllosticta capitalensis* Tg06, sendo caracterizados 18 compostos por meio de análises de espectrometria de massas (UHPLC-HRMS) na qual foram identificados como pertencentes a moléculas relacionadas ao metabolismo de purinas, cumarinas, aminoácidos, substâncias com núcleos de mefenoxalona e ácidos graxos.

Silva *et al.* (2020) isolaram 300 fungos endofíticos de folhas de *Justicia brandegeana* e identificaram 46 destes com análises moleculares multilocus incluindo regiões para genes como ITS, TEF1, β-tubulina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e actina, resultando na caracterização de fungos pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Flavodon*, *Corynespora* e *Mycoleptodiscus*. Ainda neste trabalho, foi explorada a capacidade do fungo *Mycoleptodiscus indicus* JB06 quanto a sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas, antioxidante e antiproliferativa (em células tumorais HepG2/C3A), sendo caracterizados 3 compostos majoritários relacionados a estas atividades (3-etil-5-hidroxi-7,8-dimetoxicroman4-ona, metil--latodoratina e 8-metoxi-metil-latodoradina). Em Silva *et al.* (2021), outro fungo isolado de *J. brandegeana*, a linhagem *Flavodon flavus* JB257, demonstrou ter atividade no controle de *Alicyclobacills acidoterrestris*, um importante contaminante para a indústria de alimentos, especialmente para aqueles com teor ácido como sucos cítricos, sendo identificadas por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) a presença de substâncias no extrato como álcool feniletílico, acetato de álcool feniletílico, N-acetiltiramina, ácido 4-isopropil-4-ciclohexeno-1,2-dicarboxílico, 1-fenilhexahidro-3-(2-metilpropil)pirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona e acetato de 19-hidroxi-17-oxoandrost-5-en-3-il.

Polli *et al.* (2021) identificaram pela primeira vez a produção do composto (-)-asperpentina por um fungo endofítico do gênero *Curvularia* sp. isolado de folhas de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae). Neste trabalho é relatado que este composto se apresentou como majoritário dentre os compostos produzidos por esta linhagem, sendo constatada atividade anti-colinesterásica e antifúngica contra isolados fitopatogênicos.

Segundo Kusari, Hertweck e Spiteller (2012), no caso das comunidades microbianas, todos os produtos naturais liberados no sistema podem impactar os perfis metabólicos dos microrganismos que coabitam o mesmo habitat, causando uma maior diversidade de metabólitos na planta do que quando analisados separadamente. Nessa perspectiva, os endófitos ainda representam um nicho inexplorado para a bioprospecção de produtos microbianos uma vez que a exposição dos isolados a condições estressantes como presença/ausência de nutrientes e compostos alternativos aos meios de cultura podem afetar o comportamento metabólico do microrganismo quando comparado às condições rotineiras de cultivo. Pamphile, Ribeiro e Polonio (2017) também incluem a possibilidade de elicitação de rotas metabólicas não convencionais por meio de culturas mistas, desencadeando a produção e a biotransformação de moléculas produzidas pelo microrganismo ou por aquelas previamente adicionadas ao meio de cultura.

Neste sentido, trabalhos realizados por Polonio e colaboradores (POLONIO *et al.*, 2015; 2016a; 2022) envolvendo um isolado do gênero *Diaporthe* da planta medicinal *Mikania glomerata* (Asteraceae), foi identificado como *D. citri* isolado G-01 com base no sequenciamento das regiões ITS, TEF1 e β-tubulina, seguido reconstrução taxonômica com inferência Bayesiana. A análise química do extrato bruto demonstrou a presença majoritária da substância ácido 3-nitropropiônico, e que a sua concentração final é influenciada pelo pH inicial do meio de cultivo em sistemas de fermentação em batelada simples, com valores variando entre 400-500 µg/mg de extrato

para pHs iniciais entre 5 e 6, e cerca de 800 µg/mg quando o fungo foi cultivado com pH inicial em 7, indicando que a molécula pode ser utilizada pelo fungo como um agente antimicrobiano e até mesmo como uma forma de ajuste do pH do ambiente para seu melhor estabelecimento e crescimento. Os autores ainda sugerem com base em evidências da literatura, a possibilidade de interações moleculares entre fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (Polonio *et al.*, 2016a).

Estudos metabolômicos associados a ferramentas de quimiometria utilizando este mesmo isolado (*D. citri* G-01) demonstrou que os extratos metabólicos fúngicos podem apresentar diferentes perfis de acordo com o pH do caldo fermentado obtido durante o processo de partição com solventes orgânicos, ou seja, no momento da extração dos compostos, o que pode ser uma condição importante para se incluir durante esses procedimentos, visando a dereplicação química e identificação de novos compostos de origem microbiana (POLONIO *et al.*, 2022).

Balbinot *et al.* (2021) demonstraram que o fungo *Aspergillus flavus* CL-7, isolado da planta *Chromolaena laevigata* (Asteraceae), produz diferentes perfis de metabólitos em decorrência do meio de cultura e condição de incubação (agitação e estado estacionário), sendo este fungo caracterizado como uma linhagem não-aflatoxigênica e com potencial de aplicação em outras áreas como a biorremediação.

Vários trabalhos relatam o isolamento e identificação de substâncias inéditas sendo produzidas por microrganismos endofíticos (Manganyi; Ateba; 2020; Gakuubi *et al.*, 2021; Caruso *et al.*, 2022). Estes dados demonstram a importância e potencial deste nicho de exploração biotecnológica, considerando os diversos e complexos sistemas metabólicos envolvidos em uma comunidade endofítica e suas plantas hospedeiras.

5.3 BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Endofíticos têm sido extensivamente estudados quanto a sua capacidade metabólica, incluindo, além dos já citados metabólitos especializados, a produção de enzimas de interesse industrial ou para aplicações direcionadas, como na biorremediação de ambientes contaminados (Corrêa *et al.*, 2014). Neste sentido, subprodutos de vários setores industriais são frequentemente avaliados como substratos para a produção de enzimas de origem microbiana (Orlandelli *et al.*, 2017; Mateii *et al.*, 2021). Considerando o complexo e seletivo ambiente na qual os microrganismos endofíticos habitam, a possibilidade de identificação de novas enzimas para diversas aplicações se torna um fator que faz deste um nicho de exploração que também tem chamado a atenção de muitos grupos de pesquisa.

Bactérias endofíticas isoladas de guaranazeiros (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Sapindaceae)) de duas regiões produtoras distintas do Brasil (Bahia e Amazonas) demonstraram capacidade de produzir enzimas como amilases, celulases, proteases e pectato liases. Neste trabalho se destacaram vários isolados do gênero *Bacillus* em todas as avaliações para produção enzimática, além de uma do gênero *Ochrobactrum* sp. para atividade proteolítica (Silva *et al.*, 2016).

Dentre os trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, podemos destacar alguns artigos como o de Santos *et al.* (2019) na qual foi avaliado o perfil enzimático de 18 fungos endofíticos isolados de *S. saponaria* (Asteraceae). Neste caso, foram observados a produção de enzimas como amilases, pectinases e celulases por fungos pertencentes aos gêneros *Diaporthe* e *Colletotrichum*.

Orlandelli *et al.* (2015) exploraram a atividade proteolítica de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* (Piperaceae), cultivados em meio indutor e meio indutor suplementado com farinha de arroz e farinha de soja. Os resultados demonstraram-se promissores em especial para fungos como *Colletotrichum* sp., *Phoma herbarum*,

Schizophyllum commune e alguns isolados não identificados, destacando-se o aumento de atividade proteolítica para algumas linhagens quando cultivadas com a suplementação de farinha de arroz ou soja. Resultados como estes ressaltam o potencial de utilização de resíduos agrícolas como substratos para a produção de produtos de origem microbiana, incluindo a utilização de linhagens endofíticas para a obtenção de novas enzimas.

Do ponto de vista de contaminantes orgânicos ambientais, os corantes têxteis merecem atenção não apenas aos diversos problemas à saúde humana, animal e danos gerais em ecossistemas, mas também devido a sua frequente presença como elementos orgânicos recalcitrantes em diferentes ambientes, especialmente em corpos d'água (Lellis *et al.*, 2019). Lellis *et al.* (2019) trazem uma importante revisão sobre o tema, ressaltando os problemas a saúde e ao ambiente que estes compostos causam globalmente, sendo uma das principais classes de poluentes que atualmente são liberados pela atividade industrial humana. Por estes motivos, estratégias que visem a sustentabilidade e segurança ambiental voltadas para o tratamento destes efluentes industriais e de áreas contaminadas por corantes são alvos de intensas pesquisas científicas e tecnológicas.

Tratamentos físico-químicos, embora frequentemente sejam bem sucedidos de acordo com normatizações ambientais, envolvem alguns inconvenientes como os gerados pela disposição de lodo e altos custos energéticos, de insumos e de operação (IMRAN *et al.*, 2015). A biodegradação é considerada como uma proposta mais econômica, utilizando seres vivos, especialmente microrganismos ou enzimas provenientes destes, para a degradação parcial ou total, visando principalmente a redução da toxicidade destes compostos.

Enzimas como azoredutases, lacases e peroxidadeses são frequentemente relatadas como de grande importante na degradação de compostos recalcitrantes devido às suas plasticidades moleculares (Imran *et al.*, 2015; Bulla *et al.*, 2017). Neste sentido, considerando o

potencial de produção de novas enzimas microbianas, os endofíticos também são frequentemente explorados para fins de biorremediação.

Bulla *et al.* (2017) demonstraram o potencial de duas linhagens endofíticas identificadas como *Phlebia* sp. e *Paecilomyces formosus* na descoloração de corantes têxteis reativos e na redução de sua toxicidade em peixes. Neste trabalho foi observada a atividade de produção de enzimas como lacases e peroxidases pelo fungo *Phlebia* sp., porém, em *P. formosus* essas enzimas não apresentaram atividade, o que indica que este isolado tinha atividade de descoloração associada a processos de biosorção (absorção ou adsorção) e que o *Phlebia* já atuava na quebra das moléculas. Como resultados, foram observados valores de 90% de descoloração para o corante Reactive Black 5 (RB5) com 7 dias de incubação para *P. formosus*, enquanto o fungo *Phlebia* sp. atingia valores de aproximadamente 70% para o corante Reactive Blue 19 (RB19) com 15 dias e 90% com 30 dias para o corante RB5. Para ambos os tratamentos, houve reduções na frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes.

Em outro trabalho com fungos endofíticos para descoloração do corante RB5, Polli *et al.* (2023) avaliaram o potencial da linhagem não-aflatoxigênica de *A. flavus* CL-7 na descoloração de meios de cultura contaminados com o corante, atingindo níveis de 90% de descoloração em 7 dias. Ainda, um nanobiocompósito foi desenvolvido, envolvendo a linhagem fúngica e nanopartículas de magnetita de ferro, possibilitando a remoção do micélio do meio em tratamento com a utilização de um imã. Este processo foi patenteado junto ao INPI sob registro BR1020200149300 (Pamphile *et al.*, 2020). Num trabalho semelhante, na patente sob registro BR1020190262311 (Pamphile *et al.*, 2019), é descrita a obtenção de um nanobiocompósito de magnetita associada ao fungo endofítico *Bjerkandera* sp., neste caso isolado de *M. glomerata*, na qual observou-se 90% de descoloração dos corantes têxteis RB5 e RB19 após 30 dias de tratamento.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo de microrganismos endofíticos tem ganhado atenção significativa devido aos seus potenciais aplicações em diversos campos, incluindo agricultura, medicina e biotecnologia (Rani, 2016; Parasuraman; Siddhardha, 2019; Kumar *et al.*, 2021). Esses micróbios possuem a capacidade de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar qualquer dano aparente aos seus hospedeiros, o que os torna um assunto intrigante de pesquisa. À medida que a nossa compreensão das interações endofíticas se aprofunda, as perspectivas futuras para aproveitar as suas capacidades são cada vez mais promissoras.

O potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos apresenta oportunidades interessantes, porém, nessa exploração também se enfrentam vários desafios. Um dos principais desafios é a necessidade de pesquisas mais abrangentes e esforços de isolamento para descobrir toda a diversidade de espécies endofíticas e seus metabólitos associados (Gouda *et al.*, 2016). Embora numerosos estudos tenham sido conduzidos, a maioria se concentrou na catalogação da diversidade de endófitos em vez de explorar suas aplicações potenciais (Parasuraman; Siddhardha, *et al.*, 2019). Superar esse desafio exigiria uma abordagem mais direcionada para identificar endófitos com características desejáveis, como a capacidade de produzir metabólitos secundários valiosos ou de aumentar o crescimento e a resiliência das plantas.

Além disso, a natureza complexa e muitas vezes específica do hospedeiro das interações endofíticas-plantas apresenta outro obstáculo à plena compreensão e aproveitamento do seu potencial. O desenvolvimento de métodos eficazes para o cultivo e manipulação de endófitos fora de seus hospedeiros vegetais naturais continua sendo um obstáculo significativo que deve ser resolvido (Gouda *et al.*, 2016; RANI, 2016; Yadav, 2017; Parasuraman; Siddhardha, *et al.*, 2019).

Apesar dos desafios, o futuro da investigação em microrganismos endofíticos é imensamente promissor. Os avanços nas tecnologias genômicas e metabolômicas têm o potencial de descobrir uma riqueza de vias biossintéticas inexploradas e novos compostos bioativos nestes micróbios (Gouda *et al.*, 2016; Rani, 2016; Yadav, 2017). Explorando a evolução independente dos endófitos e a sua capacidade de integrar informações genéticas das suas plantas hospedeiras podem fornecer informações sobre o desenvolvimento de capacidades metabólicas únicas.

Ainda, os endófitos têm se mostrado promissores no aumento do crescimento das plantas, melhorando a tolerância ao estresse e contribuindo potencialmente para práticas agrícolas sustentáveis. À medida que as alterações climáticas e as pressões ambientais continuam a impactar os sistemas agrícolas, o desenvolvimento de soluções ecológicas, baseadas em plantas, utilizando micróbios endofíticos, poderá tornar-se cada vez mais valioso.

O estudo de microrganismos endofíticos tem potencial para impactar significativamente vários campos, incluindo biotecnologia, agricultura e medicina. A capacidade dos endófitos de produzir novos compostos bioativos com aplicações terapêuticas ou agrícolas é particularmente interessante (Srivastava *et al.*, 2014; Gouda *et al.*, 2016; Rani, 2016; KUMAR *et al.*, 2019; Ikram *et al.*, 2020). Além disso, o potencial dos endófitos para melhorar o crescimento das plantas, promover a tolerância ao estresse e fornecer proteção contra patógenos poderia levar ao desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis e resilientes.

Além dessas aplicações diretas, os insights fundamentais obtidos com a compreensão das interações endófitos-plantas também podem informar nossa compreensão mais ampla da ecologia microbiana, da simbiose e da evolução de sistemas biológicos complexos. À medida que a investigação neste campo continua a progredir, o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos promete tornar-se um recurso cada vez mais valioso para enfrentar os desafios globais nos próximos anos.

7. REFERÊNCIAS

ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological potential of fungal endophytes associated with medicinal plants: A review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 147, 2021.

AHAMED, A.; AHRING, B. K. Production of hydrocarbon compounds by endophytic fungi *Gliocladium* species grown on cellulose. **Bioresource technology**, v. 102, n. 20, p. 9718-9722, 2011.

ALBERTO, R. N.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; SANTOS, M. S.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. gmr15049016, 2016.

ALEYNOVA, O. A.; KISELEV, K. V. Interaction of plants and endophytic microorganisms: molecular aspects, biological functions, community composition, and practical applications. **Plants**, v. 12, n. 4, p. 714, 2023.

ALMEIDA, T. T.; ORLANDELLY, R. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.)(Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.

ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potencial of endophytes from medicinal plants as sources of antimicrobial compounds. **Microbiological Research.** 169: 483-495. 2014.

ANCHEEVA, E.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1836-1854, 2020.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARAUJO, R. Towards the genotyping of fungi: methods, benefits and challenges. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, p. 203-210, 2014.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, A. E. Hidden within our botanical richness, a treasure trove of fungal endophytes. **The Plant Press**, v. 32, p. 13-15, 2008.

ASSUMPÇÃO, L. D. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L. D.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, p. 503-510, 2009.

ATAIDES, D. PAMPHILE, J. A.; GARCIA, A.; DOS SANTOS RIBEIRO, M. A.; POLONIO, J. C.; SARRAGIOTTO, M. H.; CLEMENTE, E. Curvularin produced by endophytic *Cochliobolus* sp. G2-20 isolated from *Sapindus saponaria* L. and evaluation of biological activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 12, p. 032-037, 2018.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L. MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; DE ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes.** CRC Press, Boca Raton. P.189-207. 2007.

AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Ed.). **Diversity and benefits of microorganisms from the tropics**. Cham: Springer, 2017.

BALBINOT, R.B.; OLIVEIRA, J.A.M.; BERNARDI, D.I.; POLLI, A.D.; POLONIO, J.C.; CABRAL, M.R.P.; ZANQUETA, E.B.; ENDO, E.H.; MANEGUELLO, J.E.; CARDOSO, R.F.; AZEVEDO, J.L.; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; DO CARMO, M.R.B.; SARRAGIOTTO, M.H.; PAMPHILE, J.A.; BALDOQUI, D.C. *Chromolaena laevigata* (Asteraceae) as a source of endophytic non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: chemical profile in different culture conditions and biological applications. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 52, n. 3, p. 1201-1214, 2021.

BERALDO-BORRAZZO, J.; POLONIO, J.C.; SCHOFFEN, R. P.; OLIVEIRA, J. A. S.; POLLI, A. D.; ABREU-FILHO, B. A.; CRUZ, E.; CORRÊA, J. L.; MANGOLIN, C. A.; MARIA DE FÁTIMA, P. S. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, 2021.

SUMÁRIO

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C. J.; PRIOLI, A. J.; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martiuset:Zuccarini). **Biological Research (Print)**, v. 43, n. 04, p. 375-384, 2010.

BIANCHET, P.; SANGOI, L.; KLAUBERG FILHO, O.; MIQUELLUTI, D. J.; FERREIRA, M. A.; VIEIRA, J. Formulações simples e mista de inoculantes com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de nitrogênio na cultura do arroz irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2655-2666, 2013.

BONGIORNO, V. A.; RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PEREIRA, J. O.; PAMPHILE, J. A. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 855-865, 2016.

BOSAMIA, T. C.; BARBADIKAR, K.M.; MODI, A. Genomic insights of plant endophyte interaction: prospective and impact on plant fitness. In: **Microbial endophytes.** Woodhead Publishing, 2020. p. 227-249.

BREDOW, C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; MANGOLIN, C. A.; RHODEN, S. A. *In silico* analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria, isolated from the aerial parts and seeds of important agricultural crops. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9703-9721, 2015.

BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; KAVA, V.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, p. 1-11, 2017.

BURRAGONI, S.G.; JEON, J. Applications of endophytic microbes in agriculture, biotechnology, medicine, and beyond. **Microbiological research**, v. 245, p. 126691, 2021.

CARUSO, D. J.; PALOMBO, E. A.; MOULTON, S. E.; ZAFERANLOO, B. Exploring the promise of endophytic fungi: A review of novel antimicrobial compounds. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1990, 2022.

CHEN, C.-Y.; YAN, X.; WANG, S.; JACKSON, C. R. Application of metagenomic technologies for antimicrobial resistance and food safety research and beyond. In: **Antimicrobial Resistance and Food Safety**. Academic Press, 2015. p. 401-422.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, p. 10-16, 1988.

COMPANT, S.; SAIKKONEN, K.; MITTER, B.; CAMPISANO, A.; MERCADO-BLANCO, J. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. **Plant and Soil**, v. 405, p. 1-11, 2016.

COMPANT, S.; CAMBON, M. C.; VACHER, C.; MITTER, B.; SAMAD, A.; SESSITSCH, A. The plant endosphere world–bacterial life within plants. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 1812-1829, 2021.

CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; SOUZA, C. G. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Mangrove derived fungal endophytes–a chemical and biological perception. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 1-27, 2013.

DUBEY, A.; MALLA, M. A.; KUMAR, A.; DAYANANDAN, S.; KHAN, M. L. Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1210-1231, 2020.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 28, n. 7, p. 719-725, 1982.

EMMER, A.; OLIVEIRA, J. A. S.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; ALVES, L. H.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Plant growth-promoting activity in bean plants of endophytic bacteria isolated from *Echeveria laui*. **Acta brasiliensis,** v. 5, n. 2, p. 65-71, 2021.

ESKANDAR, K. Revolutionizing biotechnology and bioengineering: unleashing the power of innovation. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 3, p. 81-88, 2023.

ESPÍRITO-SANTO, B. C.; OLIVEIRA, J. A. S., RIBEIRO, M. A. S., SCHOFFEN, R. P., POLLI, A. D., POLONIO, J. C.; SILVA, A. A.; ABREU-FILHO, B. A. A.; HECK, M. C.; MEURER, E. C.; CONSTANTIN, P. P.; PILEGGI, M.; VICENTINI, V. E. P.; GOLIAS, H. C.; PAMPHILE, J. A. Antitumor and antibacterial activity of metabolites of endophytic *Colletotrichum siamense* isolated from coffee (*Coffea arabica* L. cv IAPAR-59). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 2651-2661, 2023.

FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, *Bordô* and *Concord* cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 765-775, 2016.

FELBER, A. C.; POLONIO, J. C.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; AMBROSIO-ALBUQUERQUE, E. P.; CASTRO, R. A.; QUECINE-VERDI, M. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; MOURÃO, K. S. M. Agrobacterium-mediated transformation of *Diaporthe schini* endophytes associated with *Vitis labrusca* L. and its antagonistic activity against grapevine phytopathogens. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 2, p. 217-224, 2019.

FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. A. S.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Recombinants of *Alternaria alternata* endophytes enhance inorganic phosphate solubilization and plant growth hormone production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 51, p. 102784, 2023.

GAKUUBI, M. M.; MUNUSAMY, M.; LIANG, Z. X.; NG, S. B. Fungal endophytes: A promising frontier for discovery of novel bioactive compounds. **Journal of fungi**, v. 7, n. 10, p. 786, 2021.

GANGWAR, M.; DOGRA, S.; GUPTA, U. P.; KHARWAR, R. N. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 2, p. 184-191, 2014.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; RUBIN-FILHO, C. J.; NAKAMURA, C. V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from medicinal plant *Sapindus saponaria* L .and their localization by scanning electron microscopy. **Biology Research (Print)**. v. 45, n. 2, p. 139-148, 2012.

GARCIA, A.; SANTOS, C. M.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. S.; RIBEIRO, M. A. S.; GOLIAS, H. C.; Pamphile, J. A. *In vitro* antimicrobial activity of the crude extract of the endophytic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (SS93) isolated from *Sapindus saponaria* L. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 45, e65524, 2023.

GARTLAND, K. M. A.; BRUSCHI, F.; DUNDAR, M.; GAHAN, P. B.; MAGNI, M. V.; AKBAROVA, Y. Progress towards the 'Golden Age' of biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. S6-S13, 2013.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015.

GOLIAS, H. C.; POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; POLLI, A. D.; SILVA, A. A.; BULLA, A. M.; VOLPATO, H.; NAKAMURA, C. V.; MEURER, E. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. *Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from *Phyllosticta capitalensis*. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 51, p. 557-569, 2020.

GOMES-DA-SILVA, J. *et al.* "Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network." TAXON (2021). https://doi.org/10.1002/tax.12640.

GOODRICH, J.K.; DI RIENZI, S. C.; POOLE, A. C.; KOREN, O.; WALTERS, W. A.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; LEY, R. E. Conducting a microbiome study. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 250-262, 2014.

GOUDA, S.; DAS, G.; SEN, S. K.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 219261, 2016.

GRABKA, R.; d'ENTREMONT, T. W.; ADAMS, S. J.; WALKER, A. K.; TANNEY, J. B.; ABBASI, P. A.; ALI, S. Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 384, 2022.

HIGGINS, K. L.; ARNOLD, A. E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal Ecology**, v. 8, p. 1-11, 2014.

HUANG, W. Y.: CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal diversity**, v. 33, n. 1560-2745, p. 61-75, 2008.

HUGHES, D.T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 111–120. 2008.

IKRAM, M.; ALI, N.; JAN, G.; JAN, F. G.; KHAN, N. Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 115-123, 2020.

IMRAN, M.; CROWLEY, D. E.; KHALID, A.; HUSSAIN, S.; MUMTAZ, M. W.; ARSHAD, M. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 73-92, 2015.

JOO, H.-S.; DEYRUP, S. T.; SHIM, S. H. Endophyte-produced antimicrobials: a review of potential lead compounds with a focus on quorum-sensing disruptors. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 3, p. 543-568, 2021.

JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011.

KASHYAP, N.; SINGH, S. K.; YADAV, N.; SINGH, V. K.; KUMARI, M.; KUMAR, D.; SHUKLA, L.; KAUSHALENDRA; BHARDWAJ, N.; KUMAR, A. Biocontrol screening of endophytes: applications and limitations. **Plants**, v. 12, n. 13, p. 2480, 2023.

KEKUDA, T.R.P. Isolation, characterization and antimicrobial potential of endophytic actinomycetes. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 57, p. 100-116, 2016.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: **Microbial endophytes.** CRC Press, 2000. p. 213-250.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite–what decides?. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KONG, Z.; GLICK, B. R. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. **Advances in microbial physiology**, v. 71, p. 97-132, 2017.

KUMAR, M.; SAXENA, R.; TOMAR, R. S. Endophytic microorganisms: promising candidate as biofertilizer. In.: **Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production**, p. 77-85, 2017.

KUMAR, V.; SONI, R.; JAIN, L.; DASH, B.; GOEL, R. Endophytic fungi: recent advances in identification and explorations. In: **Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges**, p. 267-281, 2019.

KUMAR, V.; JAIN, L.; KAUSHAL, P.; SONI, R. Fungal endophytes and their applications as growth promoters and biological control agents. In: **Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology.** Academic Press, 2021. p. 315-337.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297-303, 2014.

LACAVA, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.) **Fungos, uma introdução à biologia, química e biotecnologia**, 2nd edn. Universidade Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, p. 533-569, 2010.

LACERDA, I. C. dos S.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Endophytic fungi as a source of antiviral compounds–a review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. e202100971, 2022.

LATZ, M.A.C.; JENSEN, B.; COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5-6, p. 555-567, 2018.

LELLIS, B.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275-290, 2019.

LEME, A. C.; BEVILAQUA, M. R.; RHODEN, S. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; PAMPHILE, J. A. Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8 S-ITS2) analyses. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 4095, 2013.

LI, Z.; XIONG, K.; WEN, W.; LI, L.; XU, D. Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1153, 2023.

LIN, P.; KOOK, M.; YI, T. H.; YAN, Z. F. Current Fungal Taxonomy and Developments in the Identification System. **Current Microbiology**, v. 80, n. 12, p. 375, 2023.

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. S.; COSTA, D. P.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal (Online)**, p. 122-129, 2012.

MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.** 2nd ed. Revisada e ampliada. EDUCS. Caxias do Sul, Brasil, 2010. p. 449-490.

MAIDEN, M.C.J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAIYAPPAN, S.; KUMAR, D.; PRASAD, T.G. Multiple Roles of Endophytes in Modern Agriculture. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,** 9 (8), p. 2269-2278, 2020.

MANGANYI, M. C.; ATEBA, C. N. Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1934, 2020.

MANIAS, D.; VERMA, A.; SONI, D. K. Isolation and characterization of endophytes: Biochemical and molecular approach. In: **Microbial endophytes.** Woodhead Publishing, 2020. p. 1-14.

MATEII, J. C.; OLIVEIRA, J. A. S.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Agro-industrial wastes for biotechnological production as potential substrates to obtain fungal enzymes. **Ciência & Natura**, v. 43, p. e72, 2021.

MAXWELL, T.; BLAIR, R. G.; WANG, Y.; KETTRING, A. H.; MOORE, S. D.; REX, M.; HARPER, J. K. A solvent-free approach for converting cellulose waste into volatile organic compounds with endophytic fungi. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 102, 2018.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.N. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Sociedade Brasileira de Micologia, Recife, Brasil, 2007. P. 129-140.

MONTANARI-COELHO, K. K.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; MARIN, S. R. R.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; PAMPHILE, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Endophytic bacterial microbiome associated with leaves of genetically modified (*AtAREB1*) and conventional (BR 16) soybean plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 56, 2018.

MOOKHERJEE, A.; SINGH, S.; MAITI, M. K. Quorum sensing inhibitors: can endophytes be prospective sources?. **Archives of microbiology**, v. 200, p. 355-369, 2018.

NALINI, M. S.; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of western ghats, India. **International Journal of Biodiversity**, v. 2014, n. 494213, p. 1-9, 2014.

NEGRELLI, J. G. D.; BOEIRA, V. H. P.; ANDRADE, C. O.; MATEUS-CORNIANI, N. J.; MORI, J. C.; POLONIO, J. C.; CONTE, H. Bioestimulantes e seu papel na construção de um futuro sustentável. **Arquivos do Mudi**, v. 27, n. 2, p.12-27, 2023.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as "sources" of bioactive agents. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 34, 2015.

NTUSHELO, K. Identifying bacteria and studying bacterial diversity using the 16S ribosomal RNA gene-based sequencing techniques: A review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 49, p. 5533-5540, 2013.

OHKI, T.; MASUYA, H.; YONEZAWA, M.; USUKI, F.; NARISAWA, K.; HASHIBA, T. Colonization process of the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* in roots of *Chinese cabbage*. **Mycoscience**, v. 43, n. 2, p. 0191-0194, 2002.

OLIVEIRA, R. J. V.; SOUZA, R. G.; LIMA, T. E. F.; CAVALCANTI, M. A. Q. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. **Mycosphere**, v. 5, n. 4, p. 523-530. 2014.

OLIVEIRA, J. A. S.; FERREIRA, A. P.; POLLI, A. D.; SILVA, A. A.; RIBEIRO, A. S.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Plant growth-promoting activity of wild-type and bromate-resistant mutant of the endophytic fungus *Colletotrichum karstii*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 43, p. e55457-e55457, 2021.

ORLANDELLI, R. C., ALBERTO, R. N., RUBIN FILHO, C. J.; PAMPHILE, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics and Molecular Research**. v. 11, p. 1575-1585, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; ALMEIDA, T. T.; ALBERTO, R. N.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 359-366, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Use of agro-industrial wastes as substrates for a-amylase production by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, p. 255-261, 2017.

PAMPHILE, J. A., AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*.L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 18, n. 5, p. 391-396. 2002.

PAMPHILE, J. A.; RIBEIRO, M. A. S.; POLONIO, J. C. Secondary metabolites of endophyte fungi: techniques and biotechnological approaches. *In*: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Ed.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**, p. 185-206, 2017.

PAMPHILE, J. A.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; SCHOFFEN, R. P.; GARCIA, A.; BINI, R. D.; AZEVEDO, J. L.; GOLIAS, H. C.; POLONIO, J.C.; COTICA, L. F. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190262311, título: "Obtenção de nanobiocompósitos de magnetita associados ao fungo endofítico *Bjerkandera* sp. com atividade biorremediadora de corantes têxteis", Instituição de registro: **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.** Depósito: 11/12/2019

PAMPHILE, J.A.; POLLI, A.D.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; RIBEIRO, M. A. S.; POLONIO, J. C.; ROSINI, B.; BINI, R. D.; GOLIAS, H. C.; COTICA, L. F.; PERALTA, R. M.; AZEVEDO, J. L. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200149300, título: "Processo de obtenção de nanobiocompósito de *Aspergillus flavus* endofítico e nanopartículas magnéticas (Fe3O4) com potencial de biorremediação de corante e sua reutilização", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/07/2020.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p.23-54, 1985.

PAPIK, J.; FOLKMANOVA, M.; POLIVKOVA-MAJOROVA, M.; SUMAN, J.; UHLIK, O. The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. **Biotechnology advances**, v. 44, p. 107614, 2020.

PARASURAMAN, P.; SIDDHARDHA, B. Natural Value-Added Compounds from Fungal Communities. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 2: Perspective for Value-Added Products and Environments**, p. 177-193, 2019.

PATHAK, K.; KEHARIA, H.; KHARKWAL, A. C. Isolation, Cultivation and In Planta Visualization of Bacterial Endophytes in Hanging Roots of Banyan Tree (*Ficus bengalensis*). **Symbiotic Fungi: Principles and Practice**, p. 211-225, 2009.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p. 62-76, 2002.

PEREIRA, P.; IBÁÑEZ, S. G.; AGOSTINI, E.; ETCHEVERRY, M. Effects of maize inoculation with *Fusarium verticillioides* and with two bacterial biocontrol agents on seedlings growth and antioxidative enzymatic activities. **Applied soil ecology**, v. 51, p. 52-59, 2011.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Org.). **Microbial ecology of leaves**. New York, NY: Springer New York, 1991. p. 179-197.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology research international**, v. 2011, n. 1, p. 576286, 2011.

POLLI, A. D.; RIBEIRO, M. A. S.; GARCIA, A.; POLONIO, J. C.; SANTOS, C. M.; SILVA, A. A.; ORLANDELLI, R. C.; CASTRO, J. C.; ABREU-FILHO, B. A.; CABRAL, M. R. P.; SARRAGIOTTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Secondary metabolites of *Curvularia* sp. G6-32, an endophyte of *Sapindus saponaria*, with antioxidant and anticholinesterasic properties. **Natural product research**, v. 35, p. 4148-4153, 2021.

POLLI, A. D.; Oliveira-Junior, V. A.; Ribeiro, M. A. S.; Polonio, J. C.; Rosini, B.; Oliveira, J. A. S.; BINI, R. D.; GOLIAS, H. C.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; ORLANDELLI, R. C.; VICENITINI, V. E. P.; CÓTICA, L. F.; PERALTA, R. M.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Synthesis, characterization, and reusability of novel nanobiocomposite of endophytic fungus *Aspergillus flavus* and magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) with dye bioremediation potential. **Chemosphere**, v. 340, p. 139956, 2023.

SUMÁRIO

POLONIO, J. C.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E. G.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7297-7309, 2015.

POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; RHODEN, S. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. **Fungal biology**, v. 120, n. 12, p. 1600-1608, 2016a.

POLONIO, J. C.; POLLI, A. D.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. RNA applications for endophytic research. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016b.

POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. D.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; MEURER, E. C.; AZEVEDO, J. L.; GOLIAS, H. C.; PAMPHILE, J. A. Differential Chemical Profile of Metabolite Extracts Produced by the *Diaporthe citri* (G-01) Endophyte Mediated by Varying the Fermented Broth pH. **Metabolites**, v. 12, n. 8, p. 692, 2022.

RAMADURAI, S.; MOORTHY, A.; BALASUNDARAM, U. Metagenomic Approach in Relation to Plant–Microbe and Microbe–Microbe Interactions. **Omics Science for Rhizosphere Biology**, p. 21-40, 2021.

RANI, V. Endophytes isolated from the plants of Himachal Pradesh and their importance. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 9, p. 105-110, 2016.

RENUGADEVI, R.; AYYAPPADAS, M. P.; PRIYA, V. S.; SHOBANA, M. F.; VIVEKANANDHAN, K. Applications of bacterial endophytes and their advanced identification methodologies. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 51-55, 2021.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C. J.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**. v. 11, p. 2513-2522, 2012.

RHODEN, S.A.; GARCIA, A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. *In silico* analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5,8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. **Gen Mol Res**, v. 12, p. 935-950, 2013.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; SILVA, M. S.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J.A. Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. (Meliaceae). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 1, p. 1515, 2015.

RIBEIRO, A. S.; POLLI, A. D.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, J. A. S.; EMMER, A.; ALVES, L. H.; PEREIRA, O. C. N.; PAMPHILE, J. A. Ornamental plant *Pachystachys lutea* as a source of promising endophytes for plant growth and phytoprotective activity. **Acta Scientiarum. Biological Sciences,** p. e51737-e51737, 2021a.

RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. S.; FERREIRA, A. P.; ALVES, L. H.; MATEUS, N. J.; MANGOLIN, C. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Retrotransposons and multilocus sequence analysis reveals diversity and genetic variability in endophytic fungi-associated with *Serjania laruotteana* Cambess. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 52, p. 2179-2192, 2021b.

RIDOUT, C. J.; COLEY-SMITH, J. R.; LYNCH, J. M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology,** v.10, p.180-187, 1988.

ROCHÍN-HERNÁNDEZ, L.S.; ROCHÍN-HERNÁNDEZ, L.J.; FLORES-COTERA, L. B. Endophytes, a potential source of bioactive compounds to curtail the formation–accumulation of advanced glycation end products: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4469, 2022.

ROMERO, F. M.; MARINA, M.; PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology letters**, v. 351, n. 2, p. 187-194, 2014.

ROSSETO, P.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; DA SILVA, A. A.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Investigation of mycoviruses in endophytic and phytopathogenic strains of Colletotrichum from different hosts. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 15017651, 2016.

SAHOO, S.; SARANGI, S.; KERRY, R. G. Bioprospecting of endophytes for agricultural and environmental sustainability. **Microbial Biotechnology: Volume 1. Applications in Agriculture and Environment**, p. 429-458, 2017.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 319-343, 1998.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, I. C. S.; LOPES-JÚNIOR, M. L.; ARRUDA, M. S. P.; SAILVA, M. N.; SOUZA-FILHO, A. P. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; OLIVEIRA, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii.* **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 539-548, 2008.

SANTOS, C. M.; RIBEIRO, A. S.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta biológica colombiana**, v. 24, n. 2, p. 322-330, 2019.

SANTOS, S. S.; SILVA, A. A., POLONIO, J. C., POLLI, A. D., ORLANDELLI, R. C., OLIVEIRA, J. A. S.; BRANDÃO-FILHO, J. U. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Influence of plant growth-promoting endophytes *Colletotrichum siamense* and *Diaporthe masirevici* on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Mycology**, v. 13, n. 4, p. 257-270, 2022.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753–1760, 2009.

SCHOFFEN, R. P.; RIBEIRO; A. S.; OLIVEIRA-JUNIOR, V. A.; POLONIO, J. C.; POLLI, A. D.; ORLANDELLI, R. C.; RIBEIRO, M. A. S.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Evaluation of *Trichoderma atroviride* endophytes with growth-promoting activities on tomato plants and antagonistic action on *Fusarium oxysporum*. **Ciencia e Natura**, v. 42, p. 47, 2020.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycology Research**. v. 106, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. v. 109, p. 661-686, 2005.

SHARMA, M.; KANSAL, R.; SINGH, D. Endophytic microorganisms: their role in plant growth and crop improvement. In: **Crop improvement through microbial biotechnology.** Elsevier, 2018. p. 391-413.

SILVA, M. C. S.; POLONIO, J. C.; QUECINE, M. C.; ALMEIDA, T. T.; BOGAS, A. C.; PAMPHILE, J. A.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 16-22, 2016.

SILVA, A. A.; POLONIO, J. C., DE OLIVEIRA, J. A. S., BULLA, A. M., GOLIAS, H. C., POLLI, A. D.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P.; OLIVEIRA, A. J. B. GONÇALVES, J. E.; CORREIA-GONÇALVES, R. A.; AZEVEDO, J. L.; ABREU-FILHO, B. A.; PAMPHILE, J. A. Multilocus sequence analysis of endophytic fungi from *Justicia brandegeana* with the culture-dependent method and their bioprospection for health field. **South African journal of botany,** v. 134, p. 359-368, 2020.

SILVA, A. A.; POLONIO, J. C., POLLI, A. D., DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A., SOARES, L. C., OLIVEIRA-JUNIOR, V. A..; VICENTINI, V. E. P.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CORREIA-GONÇALVES, R. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; ABREU-FILHO, B. A. Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in commercial orange juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 109019, 2021.

SILVA, D. P. D.; CARDOSO, M. S.; MACEDO, A. J. Endophytic fungi as a source of antibacterial compounds—A focus on Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1509, 2022.

SINGH, M.; KUMAR, A.; SINGH, R.; PANDEY, K. D. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-14, 2017.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. Secondary metabolites from endophytic fungi: Production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. **Symbiosis**, v. 90, n. 2, p. 111-125, 2023.

SORNAKILI, A.; THANKAPPAN, S.; SRIDHARAN, A. P.; NITHYA, P.; UTHANDI, S. Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101525, 2020.

SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, R. Entophytic Microbes and Biocontrol of Plant Diseases. In.: **Biological Controls for Preventing Food Deterioration**, p. 117-137, 2014.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STONE, J. K.; VIRET, O.; PETRINI, O.; CHAPELA, I. Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. In: PETRINI, O.; OUELLETTE G. B. (Org.). **Host Wall Alterations by Parasitic Fungi**. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN. 1994. p.115–128.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U. Novel natural products from rainforest endophytes. In.: **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**, p. 329-351, 2005.

STROBEL, G. Plant associated microorganisms (endophytes) as a new source of bioactive natural products.In.: **Medical plant biotechnology.** Wiley–VCH Verlag, Weinheim, 2007.

STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 57, 2018.

TING, A. S. Y.; MAH, S. W.; TEE, C. S. Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate *Penicillium citrinum* BTF08 as a control mechanism for *Fusarium* wilt in banana plantlets. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 155-159, 2012.

WANG, J.; LI G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**. v .193, n. 2, p. 249-253, 2000.

WEINROTH, M. D.; BELK, A. D.; DEAN, C.; NOYES, N.; DITTOE, D. K.; ROTHROCK JR., M. J.; RICKE, S. C.; MYER, P. R.; HENNIGER, M. T.; RAMÍREZ, G. A.; OAKLEY, B. B.; SUMMERS, K. L.; MILES, A. M.; AULT-SEAY, T. B.; YU, Z.; METCALF, J. L.; WELLS, J. W. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. **Journal of animal science**, v. 100, n. 2, p. skab346, 2022.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 265-272, 2004.

WU, W.; CHEN, W.; LIU, S.; WU, J.; ZHU, Y.; QIN, L.; ZHU, B. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 646146, 2021.

YADAV, A. N.; KOUR, D.; RANA, K. L.; KUMAR, V.; DHALIWA, S.; VERMA, P.; CHAUAHAN, V. S.; SUGITHA, T.; SAXENA, A. K. Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. **International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources**, v. 3, n. 1, p. 01-08, 2017.

YANG, A.; HONG, Y.; ZHOU, F.; ZHANG, L.; ZHU, Y.; WANG, C.; HU, Y.; YU, L.; CHEN, L.; WANG, X. Endophytic Microbes from Medicinal Plants in Fenghuang Mountain as a Source of Antibiotics. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6301, 2023.

YIN, Y.; WANG, J. Predictive functional profiling of microbial communities in fermentative hydrogen production system using PICRUSt. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 5, p. 3716-3725, 2021.

ZHENG, Y. K.; QIAO, X. G.; MIAO, C. P.; LIU, K.; CHEN, Y. W.; XU, L. H.; ZHAO, L. X. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 529-542, 2016.

ZIMMERMAN, N. B.; VITOUSEK, P. M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 32, p. 13022-13027, 2012.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; BETH HARRIS, N.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

3.2

Luis Felipe Oliva dos Santos
Josiane Rodrigues Rocha da Silva
Julio Cesar Polonio
Rosane Marina Peralta

BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA:

PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA E GENÉTICA E SUAS APLICAÇÕES

1. INTRODUÇÃO

O progresso tecnológico no século XX levou ao desenvolvimento de muitos compostos utilizados para melhorar a vida quotidiana (antibióticos, anti-inflamatórios, anti-tumorais e outros fármacos, herbicidas, pesticidas, corantes sintéticos, aditivos, etc.) que não ocorrem naturalmente no ambiente ou cujas concentrações naturais são significativamente menores daquelas causadas pela atividade antrópica. As características físico-químicas dessas moléculas tais como estabilidade, solubilidade em água, polaridade e volatilidade as tornam difíceis de identificar, quantificar e remover. São denominados de *xenobióticos* (do grego, xenos e bio, vida) todos os produtos químicos encontrados, mas não produzidos em organismos ou no meio ambiente. Alguns produtos químicos naturais (endobióticos) tornam-se xenobióticos quando presentes no ambiente em concentrações excessivas (Stefanac *et al*., 2021). Poluentes provenientes de diferentes processos industriais são as principais fontes de poluição do solo e do ambiente aquático, o que inclui compostos orgânicos e metais pesados (Methneni *et al*., 2021). A aplicação de fertilizantes, pesticidas e herbicidas no setor agrícola também gera diversos poluentes orgânicos e metais (Ayilara *et al*., 2020; Prabagar *et al*., 2021). Poluentes não tratados provenientes de águas residuais das indústrias agroalimentares descartados em canais de rios e outros corpos hídricos têm efeitos nocivos no meio ambiente (Siric *et al*., 2022a; Al-Huqail *et al*., 2022). O petróleo bruto também serve como um importante poluente ambiental, particularmente através de vandalização de oleodutos, vazamento de transporte, e/ou derramamento acidental (Ogunlaja *et al*., 2019). Durante a mineração alguns produtos químicos e vários metais pesados tóxicos também são liberados (Ayangbenro *et al*., 2018; Liu *et al*., 2020; Orlovic-Leko *et al*., 2022).

Para se reduzir a poluição e os consequentes danos causados por ela ao meio ambiente, há necessidade de remover esses poluentes usando métodos físicos, químicos ou biológicos (Ahmed

et al., 2021). Os métodos físicos e químicos têm sido usados há anos, mas apresentam desvantagens que incluem a necessidade de um especialista e equipamentos especiais para o procedimento de biorremediação química, enquanto os procedimentos de biorremediação física são caros (Mahmood *et al*., 2021). Isto exigiu a necessidade da busca por uma alternativa dentro da área biológica, a remediação biológica ou biorremediação. A biorremediação é uma solução mais eficiente, ecológica e econômica para remover, transformar e degradar os poluentes no ambiente (Sonune, 2021; Saeed *et al*., 2022). A remediação biológica pode ser realizada utilizando plantas e microrganismos, mas as plantas demoram mais para crescer e não podem ser facilmente manipuladas como os microrganismos, o que os tornam preferíveis para a finalidade (Hussain *et al*., 2022). Além disso, os microrganismos mitigam metais pesados e melhoram a fertilidade do solo e o desenvolvimento das plantas (Chaudhary *et al*., 2023).

2. ASPECTOS GERAIS DA BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA

A biorremediação microbiana é uma abordagem promissora para mitigar os impactos da contaminação ambiental e é frequentemente usada em combinação com outras técnicas de remediação para tratar problemas específicos de contaminação. Ela demonstra a capacidade da natureza de se autorregenerar e pode ser uma solução valiosa para a restauração de ecossistemas afetados pela atividade humana. Os microrganismos utilizados na biorremediação microbiana possuem a capacidade de metabolizar contaminantes químicos, transformando-os em produtos menos tóxicos ou não tóxicos. Isso ocorre por meio de processos bioquímicos naturais, nos quais as enzimas produzidas pelos microrganismos desempenham

um papel fundamental na quebra das moléculas dos poluentes (Bala *et al*., 2022). Além disso, a técnica de biorremediação microbiana é versátil e pode ser utilizada para tratar diversos tipos de contaminantes, desde poluentes orgânicos até metais pesados. É importante observar que a eficácia da biorremediação microbiana pode variar dependendo das condições ambientais e da disponibilidade de microrganismos adequados. A escolha da abordagem de biorremediação mais apropriada depende das características do contaminante, das condições do local e dos recursos disponíveis (Mendonza-Burguete *et al*., 2023). Essas abordagens incluem atenuação natural, bioaumento ou bioestimulação, envolvendo organismos microscópicos como fungos, algas e bactérias. Os microrganismos são encontrados em uma variedade de habitats, tais como, solo, água, plantas, animais, águas profundas e gelo (Azubuike *et al*., 2016). Os principais contaminantes que podem ser tratados com sucesso pela biorremediação microbiana estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais poluentes passíveis de tratamento por biorremediação microbiana

Poluentes e exemplos de usos	Artigos de revisão
Hidrocarbonetos Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos podem ser usadas para remediar solos e águas contaminados por derivados de petróleo, como óleo cru, gasolina e óleos lubrificantes	Ossai *et al*., 2020
Compostos orgânicos clorados Bactérias anaeróbicas, como as *Dehalococcoides,* são eficazes na degradação de compostos orgânicos clorados, incluindo solventes industriais como tricloroetileno e tetracloroetileno	Dutta *et al*., 2022
Compostos aromáticos policíclicos (PAHs) Bactérias, fungos e algas podem degradar PAHs (benzo-pireno, benzo-antraceno, fenantreno, etc) frequentemente encontrados em solos contaminados por combustíveis fósseis, carvão e resíduos industriais	Mou *et al*., 2023

Poluentes e exemplos de usos	Artigos de revisão
Pesticidas Bactérias e fungos são capazes de degradar pesticidas como atrazina, 2,4 D, glifosato, hexaclorobenzeno, diuron, etc	Gonçalves *et al.*, 2022
Compostos fenólicos Bactérias e fungos são descritos como eficientes decompositores de fenol, cresol, nitrofenol, bisfenol A, etc. Os compostos fenólicos são os poluentes orgânicos mais comuns encontrados em águas residuais produzidas por diversas indústrias, incluindo refinarias de petróleo e mineração de carvão	Panigrahy *et al.*, 2022
Metais pesados Bactérias redutoras de sulfato podem precipitar metais pesados como cádmio, chumbo, mercúrio tornando-os menos solúveis e menos tóxicos	Zhang *et al.*, 2022
Fármacos Microalgas, bactérias e fungos estão sendo usados para biorremediar águas residuais ou ambientes aquáticos contaminados por fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios e vários tipos de fármacos)	Akerman-Sanches; Rojas-Jimenez, 2021; Gayosso-Morales *et al.*, 2023
Corantes sintéticos Bactérias, fungos filamentosos, fungos lignocelulolíticos são utilizados na biorremediação de corantes sintéticos de águas residuais de indústrias têxteis, plásticos, etc	Varjani *et al.*, 2020; Cheute *et al.*, 2024

3. PRINCIPAIS TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA

A escolha da técnica de biorremediação microbiana depende das características do poluente, das condições do local contaminado e da disponibilidade de microrganismos adequados. Além disso, é importante conduzir uma avaliação detalhada do local antes de implementar qualquer técnica de biorremediação. Levando-se em

consideração o local de aplicação, as técnicas de biorremediação podem ser categorizadas como *in situ* e *ex situ* (Bala *et al*., 2022). A natureza química do poluente, profundidade e grau de poluição, tipo de meio ambiente, localização, custo e políticas ambientais, são alguns dos critérios de seleção que são considerados na escolha da técnica de biorremediação a ser usada (Azubuike *et al*., 2018). Critérios de desempenho, tais como concentrações de oxigênio e nutrientes, pH e outros fatores abióticos são, além dos critérios de seleção, critérios de desempenho (concentrações de oxigênio e nutrientes, temperatura, pH e outros fatores abióticos), que determinam o sucesso dos processos de biorremediação também recebem grandes considerações antes do projeto de biorremediação. Alguns dos métodos mais utilizados são descritos a seguir (Bala *et al*., 2022):

1. ***Bioaumentação***: Nesta técnica, microrganismos exógenos (não nativos do ambiente) são adicionados ao local contaminado para acelerar a degradação de poluentes. Estes microrganismos podem ser selecionados por sua capacidade de degradar compostos específicos.

2. ***Bioestimulação***: A bioestimulação envolve a adição de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, ao ambiente contaminado para promover o crescimento dos microrganismos nativos que podem degradar os poluentes.

3. ***Fitorremediação microbiana***: Neste método, plantas que têm uma relação simbiótica com bactérias (micorrizas) são cultivadas em solos contaminados. As bactérias ajudam a degradar os poluentes enquanto as plantas contribuem para a estabilização do solo.

4. ***Atenuação naturalmente induzida***: Esta técnica envolve a criação das condições ideais para o crescimento de microrganismos nativos que podem degradar poluentes de forma natural, sem a necessidade de adição de microrganismos ou nutrientes externos.

5. ***Biorremediação anaeróbica***: Em alguns ambientes contaminados, as condições de ausência de oxigênio (ambientes anaeróbicos) favorecem a atividade de bactérias anaeróbicas que podem degradar contaminantes, como compostos orgânicos clorados.

6. ***Biorremediação aeróbica***: A biorremediação aeróbica envolve a adição de oxigênio ao ambiente para estimular o crescimento de microrganismos aeróbicos que degradam poluentes na presença de oxigênio.

4. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA

As principais vantagens da biorremediação microbiana quando comparada com métodos de degradação químicos e físicos são resumidas no Quadro 1. Neste quadro também são listadas as principais limitações da biorremediação microbiana.

Quadro 1. Principais vantagens e limitações da biorremediação microbiana

Vantagens da biorremediação microbiana	Limitações da biorremediação microbiana
Ambientalmente amigável: Não envolve a remoção física de grandes quantidades de solo ou água contaminados, o que pode causar impactos ambientais adicionais.	**Eficácia variável:** A eficiência da biorremediação depende do tipo de poluente, das condições ambientais e da capacidade dos microrganismos envolvidos.
Custos reduzidos: Geralmente é uma opção mais econômica em comparação com métodos tradicionais de remediação.	**Prazos mais longos:** Em comparação com métodos de remediação mais invasivos, a biorremediação pode levar mais tempo para atingir resultados satisfatórios.
Menos intrusiva: Minimiza a perturbação do ambiente afetado em comparação com a escavação e remoção física de contaminantes.	**Não é adequada para todos os poluentes:** Alguns contaminantes podem ser resistentes à degradação microbiana.
Potencial para tratamento local: Pode ser aplicada diretamente no local contaminado, o que é especialmente útil em áreas urbanas.	

5. PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA E GENÉTICA EM MICRORGANISMOS

A palavra *bioprospecção* vem da junção do radical grego – *bio*, que significa vida, com a palavra que vem do latim *prospectione*, que significa olhar à frente, ou seja, planejar o futuro estrategicamente, gerando riqueza a partir de recursos naturais. As atividades ligadas direta ou indiretamente à bioprospecção se iniciaram no final do século XIX. Três dos primeiros institutos de pesquisa que desenvolveram pesquisas nessa área no Brasil foram, a Imperial Estação Agronômica de Campinas (1887), o Instituto Soroterápico Federal – atual Fiocruz – (1900) e o Instituto Butantan (1901). As pesquisas brasileiras no campo da bioprospecção se firmaram com a criação do Instituto de Química Agrícola no Jardim Botânico do Estado do Rio de Janeiro (Berlinck, 2012).

Tanto a prospecção enzimática quanto a prospecção genética podem ser ferramentas úteis para ampliar a eficácia da biorremediação microbiana, permitindo a identificação e otimização de microrganismos e enzimas mais eficazes na degradação de poluentes específicos.

5.1 BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS

A prospecção de enzimas é uma área da biotecnologia que está em constante crescimento devido a possibilidade de utilização em diversas áreas, bem como na fabricação de produtos tecnológicos e mais recentemente, associada ao tratamento de resíduos (Dannielle *et al*., 2016; Okino *et al*., 2019).

Os microrganismos apresentam uma grande variedade metabólica, constituindo assim, uma importante fonte de enzimas de importância industrial e biotecnológica. Diversas enzimas podem ser produzidas pelas bactérias como lipases, amilases, celulases, etc

(Weiss *et al*., 2020). Entretanto, mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias. Apenas 8% são produzidas por animais e 4% por plantas (Rigo *et al*., 2021).

Os fungos filamentosos são notáveis pela sua habilidade de secretar uma ampla variedade de proteínas, tornando-os uma escolha proeminente na produção de enzimas industriais. Para a hidrólise da parede celular vegetal, cepas mutantes de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* têm sido amplamente estudadas e empregadas (Rigo *et al*., 2021). Outras espécies que se destacam são as pertencentes ao gênero *Penicillium*, com o *P. echinulatum* recebendo especial atenção devido ao seu potencial significativo na produção abundante de celulases. Esta espécie é considerada uma cepa promissora para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, destacando-se no cenário da indústria de etanol de segunda geração (Schneider *et al*., 2018). Segundo Zhan *et al*. (2018), os microrganismos geneticamente modificados emergiram como uma alternativa mais acessível e ecologicamente amigável para abordar a contaminação em diversos meios em comparação às tecnologias de remediação que empregam métodos físico-químicos que são dispendiosas, de difícil implementação e propensas à geração de poluição secundária e capazes de prejudicar a fertilidade do solo (Chang *et al*., 2018).

Diversas enzimas microbianas desempenham um papel crucial na degradação de poluentes (Danso *et al*., 2019; Mousavi *et al*., 2021; Rathore *et al*., 2022; Narayanam *et al*., 2023). A escolha da enzima apropriada depende do tipo de poluente a ser remediado e do microrganismo envolvido no processo de biorremediação. O uso de enzimas microbianas é uma estratégia eficaz e mais rápida na redução da contaminação ambiental, pois permite a degradação e eliminação de poluentes sem a necessidade de produtos químicos tóxicos adicionais. Ao contrário do uso dos microrganismos inteiros, que é um processo mais lento, a aplicação das enzimas isoladas pode acelerar o processo de biorremediação. As enzimas ajudam na biorremediação de muitos poluentes simultaneamente, pois eles têm um ampla especificidade.

Ao contrário dos microrganismos inteiros, as enzimas podem operar sob quaisquer condições e também permanecem constantes frente a mudanças drásticas (Shome, 2020; Dixit *et al*., 2021). Como as enzimas são substâncias biodegradáveis, não representam qualquer ameaça ao ambiente. A atividade catalítica da enzima ocorre em seus sítios ativos quando o substrato poluente se liga a eles. Assim, a biorremediação enzimática depende unicamente da capacidade catalítica da enzima microbiana. Uma importante vantagem de se usar a biorremediação enzimática é que ela inibe a formação de subprodutos tóxicos para o meio ambiente (Chandra *et al*., 2018). Quando comparadas com os microrganismos, as enzimas são muito menores em tamanho e são mais específicas. As enzimas mais utilizadas na biorremediação são as peroxidases e as lacases, pois oxidam uma ampla gama de poluentes químicos devido à sua baixa especificidade de substrato (Morsi *et al*., 2020). Operam facilmente em temperaturas que variam de 25 a 40 °C e pH em torno de 5,0 a 6,0. Para melhorar a estabilidade e capacidade catalítica das enzimas, uma estratégia bastante estudada atualmente é a imobilização em suportes insolúveis, de modo a ampliar seus usos em processos de biorremediação (Samu *et al*., 2022; Wang *et al*., 2023). A atividade observada no sistema imobilizado, em relação à atividade da enzima livre, é altamente dependente de vários fatores, como o ensaio utilizado para medição da atividade (tipo e concentração do substrato e pH e temperatura do meio reacional) e as características físicas do biocatalisador (tamanho de partícula, hidrofobicidade/hidrofilicidade e tamanho de poro). Enzimas imobilizadas com elevada afinidade pelo substrato e alta velocidade de reação não são, necessariamente, as mais estáveis do ponto de vista operacional. Portanto, estudos de otimização mostram-se especialmente úteis no projeto de biocatalisadores imobilizados, de forma que auxiliam na manipulação de todas as variáveis relevantes ao processo de imobilização a fim de atingir uma condição final de operação ideal (Sheldon; Van Pelt, 2013).

No Quadro 2 a seguir, listamos algumas das enzimas mais importantes e úteis na biorremediação (Rathore *et al*., 2022; Samu *et al*., 2022; Narayanan *et al*., 2023).

Quadro 2. Principais enzimas utilizadas em processos de biorremediação

Enzimas do citocromo P450: O citocromo P450 é uma superfamília de enzimas heme presentes em todos os domínios biológicos: células eucarióticas, bactérias, bem como Archaea. Eles são responsáveis por uma variedade de atividades em sistemas biológicos, desde o processo de biossíntese de moléculas orgânicas, bem como o metabolismo de moléculas nocivas. Os P450 têm um potencial inerente para destruir xenobióticos por meio de transformações bioquímicas como hidroxilações alifáticas, desalquilações, epoxidações e desalogenações, bem como inúmeras inativações de vias metabólicas, todas elas essencial no mecanismo de biorremediação.
Oxigenases: As oxigenases pertencem ao grupo de enzimas oxidorredutases. Elas participam da oxidação de substratos reduzidos, transferindo oxigênio do oxigênio molecular (02) utilizando FAD/NADH/NADPH como co-substrato. As oxigenases são agrupadas em duas categorias; as monooxigenases e dioxigenases com base no número de átomos de oxigênio usados para oxigenação. Essas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo dos compostos orgânicos, aumentando a sua reatividade ou solubilidade em água ou provocando a clivagem do anel aromático. As oxigenases possuem uma ampla gama de substratos e são ativas contra uma ampla gama de compostos, incluindo os alifáticos clorados. Geralmente a introdução de átomos de 02 na molécula orgânica pela oxigenase resulta na clivagem dos anéis aromáticos.
Hidrolases: As hidrolases são enzimas que quebram ligações químicas através da adição de moléculas de água. Elas desempenham um papel importante na degradação de compostos orgânicos, como ésteres, poluentes orgânicos persistentes e pesticidas. Esterases, nitrilases, aminohidrolases, lipases, amilases e celulases estão entre as hidrolases utilizadas na biorremediação de diferentes poluentes orgânicos. Ureases podem ser usadas na biorremediação de poluentes contendo ureia, como resíduos de fertilizantes, e as sulfatases desempenham um papel na degradação de compostos contendo enxofre, incluindo poluentes de enxofre.
Desidrogenases: As desidrogenases são responsáveis pela remoção de hidrogênio de compostos orgânicos, muitas vezes convertendo-os em formas menos tóxicas. A enzima desidrogenase pertence à família das oxidoredutases e é conhecida por estar presente em vários organismos, incluindo bactérias, leveduras, plantas, animais e humanos. As aldeído desidrogenases microbianas são usadas para catalisar a reação de oxidação de conversão de aldeído em ácido carboxílico, enquanto as álcool desidrogenases microbianas são capazes de catalisar a reação reversa de conversão de álcool em aldeído/cetona.
Peroxidases: As peroxidases, incluindo a lignina peroxidase, peroxidase dependente de manganês e peroxidase versátil, têm um alto potencial para biorremediação de vários poluentes incluindo corantes, compostos policíclicos aromáticos, fenóis, herbicidas e pesticidas. O grupo das peroxidases utiliza o H202 para oxidase compostos orgânicos e inorgânicos e é largamente utilizado em biorremediação enzimática.
Lacases: As lacases pertencem à família das oxidoredutases que são extensivamente produzidas por vários fungos, bactérias, plantas e insetos, e que podem oxidar uma ampla variedade de substratos aromáticos e fenólicos reduzidos junto com a redução do oxigênio molecular em água. As lacases são altamente conhecidos pela sua estabilidade sob condições extremas de temperatura, sal, concentrações, pH e solventes orgânicos. As lacases não apenas oxidam os grupos metoxi-fenólicos, mas também os submetem a descarboxilação via desmetilação.

5.2 PROSPECÇÃO GENÉTICA E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ESPECIALIZADOS

Em se tratando de microrganismos, são necessárias estratégias para exploração da fração cultivável e da fração não-cultivável da biodiversidade microbiana. A prospecção *in silico* é outra forma de pesquisa que utiliza sequências genômicas dos microrganismos já disponíveis em banco de dados. Tudo isso tem a finalidade de identificar microrganismos, genes, enzimas e/ou vias metabólicas para posterior aplicações biotecnológicas de forma estratégica na indústria ou na própria pesquisa. De acordo com o princípio postulado na ecologia microbiana '*tudo está em todo lugar*', os microrganismos com potencial para degradar contaminantes podem ser encontrados em diversos ambientes. Porém é também proposto que, o ambiente selecione os microrganismos mais bem adaptados (Bouvier 2006; O'Malley, 2008). Os microrganismos encontrados em locais contaminados geralmente são mais resistentes e capazes de efetiva biodegradação do composto tóxico encontrado no ambiente. Entretanto, nem sempre as condições do local contaminado podem permitir que o microrganismo seja capaz de atuar com sua máxima capacidade de biodegradação, podendo muitas das vezes, limitar e reduzir sua capacidade em degradar o composto tóxico de interesse (Camacho-Montealegre *et al*., 2021). Kowalczyk *et al*. (2016), isolaram, fizeram triagem e identificaram cepas de bactérias obtidas em um local contaminado por mercúrio, concluindo que as linhagens selecionadas, apresentaram tanto uma grande resistência a altas concentrações de mercúrio assim como a capacidade de remoção de mercúrio.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS

O aprimoramento de técnicas baseadas em cultivos é de grande importância, porém esses muitas vezes subestimam a diversidade taxonômica e metabólica da microbiota. Com a organização

de novos protocolos independentes de cultivos, é possível o acesso ao genoma de microrganismos não cultiváveis contornando as limitações de métodos tradicionais de cultivo. O sequenciamento direto do DNA proporciona informações importantes sobre a capacidade metabólica e o modo de vida dos microrganismos em mais diversos ambientes (Tringe *et al*., 2005). A tecnologia da metagenômica pode fornecer informações sobre a complexidade de funções e interações entre membros de uma comunidade microbiana, além de sua capacidade inestimável quanto a bioprospecção, proporcionando identificação de enzimas de interesse industrial, como lipases, amilases, esterases, quitinases, celulases, entre outras (Oulas *et al*., 2015). As áreas de aplicação da metagenômica são várias, incluindo identificação de novos antibióticos como na medicina (Bashir *et al*., 2014). A prospecção de bibliotecas genômicas para seleção de genes de interesse, pode ser feita por similaridade de sequência ou por expressão de uma determinada atividade biológica. A estratégia de expressão da atividade biológica, também chamada de triagem funcional, possibilita acesso a genes totalmente desconhecidos, detectando apenas as enzimas que estão expressas (Dellagnezze *et al*., 2016). Os genes mais utilizados em estudos de biodegradação de poluentes incluem genes catabólicos de fenol (*pheA, pheB, pheC*, *pheD e pheR*), além de *merA* e *arsM* para degradação dos metais pesados mercúrio (Hg) e arsênio (As) (Dixit *et al*., 2015). Diversos microrganismos envolvidos na biodegradação já tiveram seu genoma sequenciado (Lasa *et al*., 2017; Rahman *et al*., 2017; Yang *et al*., 2017).

A triagem funcional de bibliotecas metagenômicas representa uma abordagem direta para identificação de funções bioquímicas para milhares de proteínas (Uchiyama; Miyazaki, 2009). Esse método promoveu grande expansão do número de novas enzimas. Estudo que efetivou a triagem de metagenomas nas duas últimas décadas, revelou quase 6 mil genes, sendo 70% deles representantes de carboxilesterases e lipases (Ferrer *et al*., 2016), sendo uma estratégia inovadora com grande potencial de aplicação em biorremediação

(Dellagnezze *et al*., 2014). A análise da sequência do genoma de *Pseudomonas* sp., KT2440 demonstrou a presença de genes de muitas enzimas ou proteínas como as desidrogenases, oxidoredutases, oxigenases, ferredoxinas, citocromo, glutationa-S-transferases, proteínas redutoras de sulfato e bombas de efluxo, etc., que apresentam papel importante na degradação de diversos químicos liberados em efluentes industriais (Belda *et al*., 2016).

6. AVANÇOS DA BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA ATRAVÉS DA ENGENHARIA GENÉTICA

Os microrganismos possuem capacidade de degradação de muitos dos poluentes ambientais, mas os compostos mais recalcitrantes e mais tóxicos tendem a ficar no meio ambiente (Parrilli *et al*., 2010), não sendo biodegradados de maneira eficaz. Uma solução para otimizar esse processo de degradação poderia ser a associação dos microrganismos com suas enzimas. Os avanços nas áreas de biotecnologia e biologia molecular têm possibilitado a aplicação de organismos geneticamente modificados (OGMs) para fins de biorremediação. A engenharia genética possibilita modificar microrganismos possibilitando a expressão em si ou uma maior expressão de enzimas aumentando a capacidade de degradação de poluentes (Wolejko *et al*., 2016). Vários autores têm sugerido maior potencial de degradação pelos OGMs em comparação aos naturais (Rafeeq *et al*., 2023). O uso da engenharia genética para criar bactérias modificadas que possam degradar uma variedade de hidrocarbonetos de petróleo é uma estratégia para reduzir a poluição causada por derrames de petróleo no mar, dado que o petróleo é uma complexa combinação de hidrocarbonetos (n-alcanos, aromáticos, aromáticos policíclicos, etc.). Para a criação de uma cepa de *Acinetobacter*

baumannii S30 pJES com alta eficiência na biodegradação para hidrocarbonetos totais de petróleo, o gene *lux* foi introduzido no cromossomo de *A. baumannii* S30. Como *A. baumannii* S30 pJES é persistente na biorremediação, é possível rastrear sua presença ali (Zakaria *et al*., 2021). Diversos microrganismos como *Rhodococcus, Gordonia, Mycobacterium e Pseudomonas* abrigando genes catabólicos, plasmídeos e genomas expressando P450s eficientemente degradaram xenobióticos do ambiente (Chakraborty & Das, 2016).

A utilização de OGMs apresenta limitações para aplicação em ambientes contaminados, devido à instabilidade do material genético inserido, uma vez que a eficiência dos OGMs depende da sua capacidade de transferir o material genético de maneira estável (Ghosal *et al*., 2016). A transferência horizontal de genes para espécies nativas também é vista como um problema (Perpetuo *et al*., 2011). Assim, a utilização de OGMs no ambiente deve seguir uma rígida verificação de todas as possibilidades de efeitos não desejados que esses microrganismos possam produzir. São necessários estudos para aprofundar os efeitos desses OGMs nos ecossistemas, principalmente em suas interações com as comunidades microbianas naturais dos locais, podendo apresentar perigos as comunidades locais, sendo necessário protocolos de contenção rigorosos ou restrição administrativas para aplicação em campo (Borchert *et al*., 2021).

7. PESQUISAS DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE MICRORGANISMOS DA UEM

O LBM/UEM vem realizando estudos de biorremediação microbiana e biorremediação enzimática utilizando fungos lignocelulolíticos e suas enzimas peroxidases e lacases. Os fungos

ligninolíticos ou fungos da podridão branca são um grupo diversificado e abundante classificado na classe dos *Agaricomycetes*. Estes fungos podem ser encontrados colonizando tanto árvores vivas ou madeira morta (troncos) de climas temperados a tropical, apresentando uma variedade de morfologias. Existem cerca de 10.000 espécies de fungos de podridão branca, com diferentes capacidades para degradar lignina, celulose e hemiceluloses. No entanto, apenas algumas dezenas são adequadamente estudadas. As espécies de fungos de podridão branca mais comumente estudadas estão subdivididas em seis famílias: Phanerochaetaceae (por exemplo, *Phanerochaete chrysosporium*), Polyporaceae (por exemplo, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*), Marasmiaceae (por exemplo, *Lentinula edodes*), Pleurotaceae (por exemplo, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*), Hymenochaetaceae (por exemplo, *Inonotus hispidus* e *Phellinus igniarius*), Ganodermataceae (por exemplo, *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma applanatum*) e Meruliaceae (por exemplo, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* e *Phlebia radiata*) (Uber *et al*., 2023).

O LBM/UEM vem se dedicando aos estudos dos fungos ligninolíticos enfatizando três aspectos: produção e imobilização de enzimas, uso dos fungos ligninolíticos para a degradação de biomassa vegetal e produção de bioenergia, e uso dos fungos ligninolíticos e suas enzimas em processos de biorremediação. Nos últimos 10 anos foram publicados 24 artigos científicos na temática de biorremediação. Listamos nas Tabelas 2 e 3 alguns artigos representativos de biorremediação microbiana e biorremediação enzimática, respectivamente.

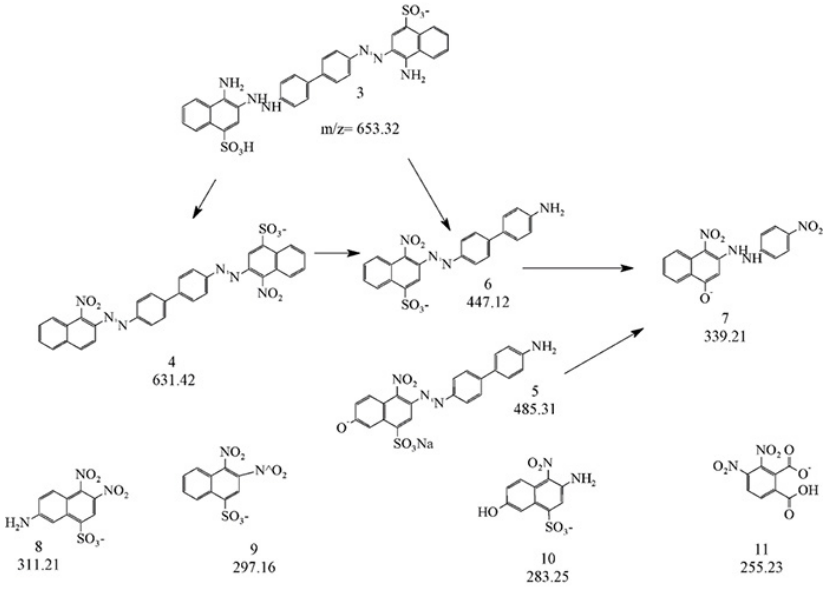
Tabela 2. Estudos representativos de biorremediação microbiana realizados no LBM/UEM

Microrganismos utilizados e principais achados	Referência
Uma revisão dos principais artigos (2014-2023) utilizando *Pycnoporus* sp. em cultivos submersos e em estado sólido avaliando a capacidade desses fungos em degradar diferentes xenobióticos incluindo fármacos, diversos tipos de plásticos, hidrocarbonetos, pigmentos e corantes sintéticos, pesticidas e herbicidas.	Cheute *et al*., 2024
Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius e *Trametes* sp. foram cultivos em meio líquido contendo farelo de trigo como substrato e avaliados quanto à capacidade de remoção simultânea de trimetropim (TMP) e sulfametoxazona (SMX). *Pleurotus* spp. foram mais eficientes que *Trametes* sp. na remoção das drogas. Cerca de 74% de SMX e 40% de TMP foram removidos dos cultivos de *P. ostreatus* após 15 dias.	Araujo *et al*., 2017
A remoção do herbicida picloram foi avaliada com biomassas vivas e tratadas termicamente de *Ganoderma lucidum* e *Trametes* sp. como biossorventes. Os estudos cinéticos mostraram que o processo de biossorção seguiu o mecanismo de pseudo-segunda ordem. *Os dados experimentais do perfil da isoterma foram adequadamente descritos pelo modelo de Langmuir. O modelo Dubinin-Radushkevich sugeriu o envolvimento de um mecanismo químico de permuta iónica no processo de biossorção.	Maciel *et al*., 2013
Ganoderma lucidum foi avaliado quanto à sua capacidade de tolerar e degradar o herbicida diuron em cultivos líquidos estacionários. Após 15 dias, 50% do diorun foi metabolizado gerando dois metabólitos N'-(3,4-diclorofenil)-N-metilureia (DCPMU) e 3,4-diclorofenilureia (DCPU). A adição de inibidores do citocromo P450 reduziu significativamente a capacidade do fungo para degradar o diuron. A lacase também pode degradar o diuron *in vitro* e esta degradação foi aumentada pela adição de mediadores sintéticos, ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico e acetilacetona. *G. lucidum* foi capaz de metabolizar o diuron por mecanismos intra e extracelulares, sem a acumulação de produtos tóxicos.	Coelho-Moreira *et al*., 2018
Cultivos na presença de inibidores do citocromo P450, sugerem que a degradação do diuron pelo fungo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* tem participação de fatores intracelulares (enzimas do citocromo P450) e extracelulares (enzimas ligninolíticas).	Coelho-Moreira *et al*., 2013

Tabela 3. Estudos representativos de biorremediação enzimática realizados no LBM/UEM

Enzimas utilizadas e principais achados	Referência
Lacase de *Trametes versicolor* produzida em cultivos em estado sólido utilizando coroa de abacaxi como substrato foi utilizada na biorremediação do corante verde de malaquita	Backes *et al*., 2022
Lacases de *Ganoderma lucidum* e *Pleurotus ostreatus* (livre e imobilizada em MANAE-agarose) foram utilizadas na biorremediação do disruptor endócrino bisfenol A. Principais metabólitos foram identificados por cromatografia gasosa	Brugnari *et al*., 2018; 2021; Freitas *et al*., 2017
Lacase de *Oudemansiella canarii* foi utilizada na biorremediação do corante antraquinônico azul brilhante de remazol R (RBBR)	Uber *et al*., 2022
Uma lacase de *Oudemansiella canarii* foi utilizada na degradação do corante azo vermelho do Congo (VC). A espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a espectrometria de massa permitiram definir uma proposta mecanística para a degradação do VC apresentada na Figura 1. A ação da lacase provocou uma redução significativa da toxicidade, tal como indicado pelo teste Microtox	Iark *et al*., 2019

Figura 1. Mecanismo proposto para a degradação do corante vermelho do Congo pela lacase de Oudemansiella canarii



Fonte: Iark et al., 2019.

8. MONITORAMENTO AMBIENTAL E CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOSSEGURANÇA

As críticas dirigidas à bioprospecção foram abordadas, em parte, por tratados internacionais e acordos jurídicos destinados a acabar com a biopirataria e muitas atividades são agora financiadas por agências que exigem capacitação e benefícios econômicos nos países anfitriões. Assim, grande parte da bioprospecção contemporânea tem múltiplos objetivos, incluindo a conservação da biodiversidade, a gestão sustentável dos recursos naturais e o desenvolvimento econômico. Os ecologistas estão envolvidos de três formas vitais: primeiro, aplicando princípios ecológicos à descoberta de novos recursos. Neste contexto, a história natural torna-se uma vasta base de dados econômicos. Em segundo lugar, a realização de estudos de campo, a maioria deles demográficos, para ajudar a regular a colheita de espécies selvagens. Terceiro, enfatizar a profunda importância de milhões de espécies, na sua maioria microscópicas, para a economia global.

A ecologia microbiana emergiu como uma disciplina central na bioprospecção. Investigações recentes sobre a ecologia química dos microrganismos do solo sugerem que os antibióticos são frequentemente secretados em concentrações subletais, tornando-os menos importantes para a comunicação intra e interespecífica do que para a inibição competitiva. Isso fornece informações valiosas sobre o combate à resistência aos medicamentos (Mlot, 2009). O monitoramento constante sobre a atividade química de bactérias epibióticas marinhas e a ecofisiologia dos micróbios abrem novas perspectivas para a biorremediação e a mineração biológica. Compreender a ecologia química das interações bactéria-fungo é essencial para a compreensão de algumas doenças humanas, enquanto a ecologia microbiana desempenha um papel crescente no combate à malária (Kambris *et al*., 2009).

Em suma, a exploração da diversidade microbiana, especialmente por meio da ecologia molecular, é estimada por Demain (2000) como geradora de bilhões de dólares em produtos farmacêuticos, atividade clínica, industrial e agrícola. Esses exemplos destacam que a história natural é uma vasta e em grande parte negligenciado conjunto de dados industriais.

Os testes laboratoriais devem sempre preceder a qualquer avaliação da ação dos microrganismos nos ambientes naturais, apesar de eles terem sido coletados e isolados no ambiente por uma questão de segurança. Contudo, a real ação biorremediadora somente será constatada após testes em condições reais. A combinação de testes de laboratório e testes de campo na bioprospecção permite uma abordagem abrangente para a descoberta e desenvolvimento de recursos biológicos, garantindo tanto a eficácia quanto a segurança ambiental e humana. Essa abordagem é fundamental para aproveitar o potencial da biodiversidade de maneira responsável e sustentável. Fragmentos de moléculas de DNA contendo um ou mais nucleotídeos podem ser precisamente inseridos, removidos ou substituídos nas células de um órgão por meio de desenvolvimentos técnicos científicos que permitam engenharia genética racional em nível do genoma, ou gene (Chandrasegaran & Carroll, 2016), assim como produção microbiana de enzimas, incluindo diversos tipos de microrganismos que podem ser isolados de ambientes diversos.

Finalizando, a biossegurança desempenha um papel crucial na bioprospecção, que envolve a busca por novos microrganismos, genes, enzimas ou compostos bioativos em ambientes naturais para aplicações biotecnológicas. Algumas considerações importantes de biossegurança a serem levadas em conta durante o processo de bioprospecção são os riscos biológicos, onde é essencial avaliar os riscos associados aos microrganismos ou materiais coletados durante a bioprospecção. Isso pode incluir a identificação de patógenos humanos, patógenos animais ou plantas, e microrganismos que possam representar riscos para o meio ambiente. A classificação de

microrganismos coletados deve ser de acordo com os níveis de risco associados ao seu manuseio e uso. Isso pode ser feito utilizando sistemas de classificação de biossegurança reconhecidos internacionalmente, como os níveis de biossegurança da OMS ou os níveis de contenção de patógenos da USDA.

É importante garantir que as instalações de laboratório e armazenamento sejam adequadas para lidar com os microrganismos coletados, de forma segura. Isso pode incluir o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), bancadas de trabalho limpas e áreas de contenção apropriadas. Todos os pesquisadores envolvidos na bioprospecção devem receber treinamento adequado em práticas de biossegurança e manuseio seguro de microrganismos, isso ajuda a minimizar o risco de acidentes ou liberações acidentais. Medidas devem ser implementadas para conter e controlar a propagação dos microrganismos coletados, incluindo o uso de técnicas de cultivo seguro, desinfecção de resíduos e procedimentos de eliminação segura.

O monitoramento ambiental deve ser realizado para avaliar o impacto das atividades de bioprospecção no meio ambiente circundante. Isso pode incluir a detecção de liberações acidentais de microrganismos ou produtos químicos e a avaliação do potencial impacto ecológico, além de que todas as atividades de bioprospecção devem estar em conformidade com as regulamentações locais, nacionais e internacionais relacionadas à biossegurança e conservação da biodiversidade. Ao adotar essas considerações de biossegurança, os pesquisadores podem garantir que a bioprospecção seja realizada de forma segura e responsável, minimizando os riscos para a saúde humana, animal e ambiental. Isso permite que os benefícios da biotecnologia sejam alcançados de maneira sustentável e ética.

No Brasil, assim como em vários países da América Latina, foram implementadas normas de biossegurança por meio de legislações específicas para regular o uso da tecnologia recombinante,

bioprospecção e a liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados (OGM). A legislação brasileira de biossegurança, Lei Nº 11.105/05 de 24/03/2005 (Brasil, 2005), que substituiu a Lei Nº 8.974, de 05/01/1995, estabelece diretrizes de segurança e mecanismos de fiscalização para atividades relacionadas a OGM e seus derivados. Além disso, ela regulamenta os incisos II, IV e V do parágrafo 10 do artigo 225 da Constituição Federal, os quais tratam da proteção ao meio ambiente.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A biorremediação microbiana é uma área emergente e promissora na luta contra a poluição ambiental, oferecendo soluções inovadoras para a degradação de poluentes complexos. Alguns dos maiores desafios enfrentados atualmente estão os microplásticos, os fármacos e os pesticidas, que têm um impacto significativo na saúde ambiental e humana. A biorremediação através do uso de microrganismos para tratar e remover esses poluentes, tem se mostrado uma abordagem eficaz e sustentável para mitigar esses problemas. Os conhecimentos aprofundados das vias metabólicas e das enzimas dos microrganismos, associados à descoberta de novos microrganismos e novas tecnologias como imobilização de enzimas, novas técnicas de bioprospecção enzimática e genética, apontam para uma ampliação da biorremediação microbiana como ferramenta de excelência na redução da poluição ambiental. Nosso grupo de pesquisa pretende ampliar sua atuação especialmente na degradação dos microplásticos, fármacos e pesticidas, principalmente ampliando o conhecimento das vias metabólicas envolvidas nos processos degradativos dos xenobióticos e na ampliação de escala dos processos de biorremediação utilizando enzimas imobilizadas.

10. REFERÊNCIAS

AHMED, S.F.; MOFIJUR, M.; NUZHAT, S.; CHOWDHURY, A.T.; RAFA, N.; UDDIN, M.A.; INAYAT, A.; MAHLIA, T.M.I.; ONG, H.C.; CHIA, W.Y.; SHOW, P.L. Recent developments in physical, biological, chemical, and hybrid treatment techniques for removing emerging contaminants from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**. v. 416, p. 125912, 2021.

AKERMAN-SANCHEZ, G.; ROJAS-JIMENEZ, K. Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment, **Environmental Advances**, v. 4, p. 100071, 2021.

AL-HUQAIL, A.A.; KUMAR, P.; EID, E.M.; ADELODUN, B.; ABOU FAYSSAL, S.; SINGH, J.; ARYA, A.K.; GOALA, M.; KUMAR, V.; ŠIRIĆ, I. Risk assessment of heavy metals contamination in soil and two rice (Oryza sativa l.) varieties irrigated with paper mill effluent. **Agriculture** v. 12, n. 11, p. 1864. 2022.

ARAUJO, C.A.V.; MACIEL, G.M.; RODRIGUES, E.A.; SILVA, L.L.; OLIVEIRA, R.F.; BRUGNARI, T.; PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M. Simultaneous removal of the antimicrobial activity and toxicity of sulfamethoxazole and trimethoprim by white rot fungi. **Water Air and Soil Pollution,** v. 228, p. 341-353, 2017.

AYANGBENRO, A.S.; OLANREWAJU, O.S.; BABALOLA, O.O. Sulfate-Reducing Bacteria as an Effective Tool for Sustainable Acid Mine Bioremediation. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, 2018.

AYILARA, M.S.; OLANREWAJU, O.S.; BABALOLA, O.O.; ODEYEMI, O. Waste Management through Composting: Challenges and Potentials. **Sustainability.** v.12, p.4456, 2020.

AZUBUIKE, C.C.; CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v.32, p.180, 2016.

AZUBUIKE, C.C.; CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation: An Eco-friendly Sustainable Technology for Environmental Management. In: SAXENA, G., BHARAGAVA, R. (eds) **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**. Springer, Singapore. 2020. p. 19-39.

BACKES, E.; KATO, C.G.; SILVA, T.B.V.; UBER, T.M.; PASQUARELLI, D.L.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Production of fungal laccase on pineapple waste and application in detoxification of malachite green. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.57, p.90–101, 2022.

BALA, S.; GARG, D.; THIRUMALESH, B.V.; SHARMA, M.; SRIDHAR, K.; INBARAJ, B.S.; TRIPATHI, M. Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. **Toxics**. v. 10, n. 8, p.484, 2022.

BASHIR, Y.; PRADEEP S.S.; KUMAR K.B. Metagenomics: An Application Based Perspective. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

BELDA E.; VAN HECK R.G.; JOSÉ LOPEZ-SANCHEZ, M.; CRUVEILLER, S.; BARBE, V.; FRASER, C.; KLENK, H.P.; PETERSEN, J.; MORGAT, A.; NIKEL, P.I.; VALLENET, D.; ROUY, Z.; SEKOWSKA, A.; MARTINS DOS SANTOS, V.A.; DE LORENZO, V.; DANCHIN, A.; MÉDIGUE, C. The revisited genome of Pseudomonas putida KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. **Environmental Microbiology**. v.18, n. 10, p.3403–3424, 2016.

BERLINCK, R.G.S, 2012. **Bioprospecção no Brasil: um breve histórico**. Ciência e Cultura.v. 64, n. 3. São Paulo. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v64n3/a10v64n3.pdf, Acesso em: 30/06/2024.

BORCHERT, E.; HAMMERSCHMIDT, K.; HENTSCHEL, U.; DEINES, P. Enhancing Microbial Pollutant Degradation by Integrating Eco-Evolutionary Principles with Environmental Biotechnology. **Trends in Microbiology**. v.29, n.10, p. 908-918. 2021.

BRASIL. **Lei nº 11.105/05 de 24/03/2005** (Brasil, 2005) – Acessado em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm. Último acesso: 30/06/2024.

BRUGNARI, T.; PEREIRA, M.G.; BUBNA, G.A.; DE FREITAS, E.N.; CONTATO, A.G.; CORRÊA, R.C.G.; CASTOLDI, R.; DE SOUZA, C.G.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized Pleurotus ostreatus laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, n. 1, p. 1346-1351, 2018.

CAMACHO-MONTEALEGRE, C.M.; RODRIGUES, E.M.; MORAIS, D.K.; TÓTOLA, M.R. Prokaryotic community diversity during bioremediation of crude oil contaminated oilfield soil: effects of hydrocarbon concentration and salinity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.52, p.787–800, 2021.

CHAKRABORTY, M.; DAS, S. 2016. **ASK and PPM Modulation Based FSO System under Varying Weather Conditions.** 2016 IEEE 7th Annual Ubiquitous Computing, Electronics & Mobile Communication Conference (UEMCON), New York, NY, p. 1-7. https://doi.org/10.1109/UEMCON.2016.7777825

CHANDRA, R.; KUMAR, V.; TRIPATHI, S. Evaluation of molasses-melanoidin decolourisation by potential bacterial consortium discharged in distillery effluent. **3 Biotech** v.4, p.187-205, 2018.

CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Origins of programmable nucleases for genome engineering. **Journal of Molecular Biology**. v.428, p.963–89. 2016.

CHANG, B.V.; FAN, S.N.; TSAI, Y.C.; CHUNG, Y.L.; TU, P.X.; YANG, C.W. Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost. **Science of Total Environment**. v.634, p. 922-933, 2018.

CHAUDHARY, S.; SINDHU, S.; DANKER, R.; KUMARI, A. Microbes-mediated sulphur cycling in soil: Impact on soil fertility, crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**. v. 271, p. 127340, 2023.

CHEUTE, V.M.S.; UBER, T.M.; DOS SANTOS, L.F.O.; BACKES, E.; DANTAS, M.P.; CONTATO, A.G.; CASTOLDI, R.; DE SOUZA, C.G.M.; CORRÊA, R.C.G.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Biotransformation of Pollutants by *Pycnoporus* spp. in Submerged and Solid-State Fermentation: Mechanisms, Achievements, and Perspectives. **Biomass**, v. 4, n. 2, p. 313-328, 2024.

COELHO-MOREIRA, JDa.S, BRACHT, A.; DE SOUZA, A.C.; OLIVEIRA, R.F.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; DE SOUZA C.G, PERALTA, R.M. Degradation of Diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: Role of ligninolytic enzymes and cytochrome P450. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

COELHO-MOREIRA, JDa.S.; BRUGNARI, T.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; CASTOLDI, R.; DE SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Evaluation of diuron tolerance and biotransformation by the white-rot fungus *Ganoderma lucidum*. **Fungal Biology**. v. 122, n. 6, p. 471-478, 2018.

DANNIELLE, N.; SOUSA, C.; RIBEIRO, M.B. Prospection technology use of lipase obtained by yeast fermentation. **Revista Geintec-Gestão Inovação e Tecnologias** v. 6, p. 3329–3342, 2016.

DANSO, D.; CHOW, J.; STREIT, W.R. Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.85 n.19 p.01095-19. 2019.

DE WIT R, BOUVIER T. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? **Environmental Microbiology.** v.8 p.755–758, 2006.

DELLAGNEZZE, B.M.; DE SOUSA, G.V.; MARTINS, L.L.; DOMINGOS, D.F.; LIMACHE, E.E.G.; DE VASCONCELLOS, S.P.; DA CRUZ, G.F.; DE OLIVEIRA, V.M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1–2, p. 191–200, 2014.

DELLAGNEZZE, B.M.; VASCONCELLOS, S.P.; DEMELO, I.S.; DE SANTOS NETO, E.V.; DOS OLIVEIRA, V.M. DE. Evaluation of bacterial diversity recovered from petroleum samples using different physical matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 712–723, 2016.

DEMAIN A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 499–514. 2000.

DIXIT, A.M.; BANSAL, P.; JAIN, P.; BAJPAI, P.K.; RATH, R.S.; KHARYA, P. Assessment of Biomedical Waste Management in Health Facilities of Uttar Pradesh: An Observational Study. **Cureus**. v.13, n.12 p.20098, 2021.

DIXIT, R.; WASIULLAH; MALAVIYA, D.; PANDIYAN, K.; SINGH, U.B.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; SINGH, B.P.; RAI, J.P.; SHARMA, P.K.; LADE, H.; PAUL, D. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. **Sustainability**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DUTTA, N.; USMAN, M.; ASHRAF, M.A.; LUO, G.; ZHANG, S. A critical review of recent advances in the bio-remediation of chlorinated substances by microbial dechlorinators. **Chemical Engineering Journal Advances**. v.12. n. 15, p.100359, 2022.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W.R.; GOLYSHINA, O.V.; GOLYSHIN, P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microbial Biotechnology**, v.9, n.1, p. 22–34, 2016.

FREITAS, E. N.; BUBNA, G.A.; BRUGNARI, T.; CONTATO, A.G.; RAUEN, T.G.; MOREIRA, R.F.P.M.; BRACHT, A.; SOUZA, C.G.M.; LOURDES, M.; PERALTA, R.M. Removal of bisphenol A and evaluation of ecotoxicity of degradation products by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, p. 1361-1369, 2017.

GAYOSSO-MORALES, M.A.; RIVAS-CASTILLO, A.M.; LUCAS-GÓMEZ, I.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A.; CALDERÓN, A.V.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E.; BERNAL, J.O.; GONZÁLEZ-PÉREZ, B.K.; Microalgae, a current option for the bioremediation of pharmaceuticals: a review. **Folia Microbiologica.** v. 68, n.2, p.167–179. 2023.

GHOSAL, D.; GHOSH, S.; DUTTA, T.K.; AHN, Y. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1369, 2016.

GONÇALVES, C.R., DELABONA, P.S. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. **Environmental Advances**. v. 8 p.100220, 2022.

SUMÁRIO

HUSSAIN, S.; KHAN, M.; SHEIKH, T.M.M.; MUMTAZ, M.Z.; CHOHAN, T.A.; SHAMIM, S.; LIU, Y. Zinc Essentiality, Toxicity, and Its Bacterial Bioremediation: A Comprehensive Insight. **Frontiers in Microbiology**. v.13. p.900740, 2022.

IARK, D.; BUZZO, A.J.D.R.; GARCIA, J.A.A.; CÔRREA, V.G.; HELM, C.V.; CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; PERALTA MUNIZ MOREIRA, R.F.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii.* **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121655, 2019.

KAMBRIS, Z.; COOK, P.E.; PHUC, H.K.; SINKINS, S.P. Immune activation by life-shortening Walbachia and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science**. v.326, p. 134–6, 2009.

KOWALCZYK, A.; WILIŃSKA, M.; CHYC, M.; BOJKO, M.; LATOWSKI, D. Isolation, screening and identification of mercury resistant bacteria from mercury contaminated soil. **E3S Web of Conferences**. v.10, p. 00042, 2016.

LASA, A.; ROMALDE, J.L. Genome sequence of three Psychrobacter sp. strains with potential applications in bioremediation. **Genomics.** v.12, p.7–1, 2017.

LIU, M. XIAO, W.; ZHANG, Q.; LINLIN, S. Methylmercury bioaccumulation in deepest ocean fauna: implications for ocean mercury biotransport through food webs. **Environmental Science & Technology Letters.** v.7, p.469–476, 2020.

MACIEL, G.M.; SOUZA, C.G.M.; ARAUJO, C.; BONA, E.; HAMINIUK, C.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp.. **Chemical Engineering Journal**, v. 215-216, p. 331-338, 2013.

MAHMOOD, A.; BILAL, B.; NAEEM, Z.; IRAM, S. "Physical, chemical, and biological remediation techniques for textile effluents in context with developed and developing countries," in **Rhizobiont in bioremediation of hazardous waste** (Singapore: Springer), 409–441, 2021.

MENDOZA-BURGUETE, Y.; DE LA LUZ PÉREZ-REA, M.; LEDESMA-GARCÍA, J.; CAMPOS-GUILLÉN, J.; RAMOS-LÓPEZ, M.A.; GUZMÁN, C.; RODRÍGUEZ-MORALES, J.A.; Global Situation of Bioremediation of Leachate-Contaminated Soils by Treatment with Microorganisms: A Systematic Review. **Microorganisms.** v.11, n. 4, p.857, 2023.

METHNENI, N. Persistent organic and inorganic pollutants in the effluents from the textile dyeing industries: Ecotoxicology appraisal via a battery of biotests. **Environmental Research**. v. 196 p. 110956, 2021.

SUMÁRIO

MLOT., C. Antibiotics in Nature: Beyond Biological Warfare. **Science** v. 324, n. 5935, p.1637-1639, 2009.

MORSI, R.; BILAL, M.; IQBAL, H.M.; ASHRAF, S.S. Laccases and peroxidases: The smart, 223 greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging 224 pollutants. **Science of the Total Environment**. v. 714, p. 136572, 2020.

MOU, B.; GONG, G.; WU, S. Biodegradation mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons: Combination of instrumental analysis and theoretical calculation. Chemosphere. v. 341, p. 140017, 2023.

MOUSAVI, S.M.; HASHEMI, S.A.; IMAN MOEZZI, S.M.; RAVAN, N.; GHOLAMI, A.; LAI, C.W.; CHIANG, W.H.; OMIDIFAR, N.; YOUSEFI, K.; BEHBUDI, G. Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants. **Biochemistry Research International**. v.2021, p.5599204. 2021.

NARAYANAN, M. ALI, S.S.; EL-SHEEKH, M. A comprehensive review on the potential of microbial enzymes in multipollutant bioremediation: Mechanisms, challenges, and future prospects. **Journal of Environmental Management**. v.334, p.117532, 2023.

O'MALLEY M.A. 'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**. v.39, p. 314–325, 2008.

OGUNLAJA, A.; OGUNLAJA, O.O.; OKEWOLE, D.M.; MORENIKEJI, O.A. Risk assessment and source identification of heavy metal contamination by multivariate and hazard index analyses of a pipeline vandalised area in Lagos state, Nigeria. **Science of The Total Environment**. v. 651, p. 2943–2952, 2019.

OKINO-DELGADO, C.H.; ZANUTTO-ELGUI, M.R.; DO PRADO, D.Z.; PEREIRA, M.S.; FLEURI, L.F. Enzymatic Bioremediation: Current Status, Challenges of Obtaining Process, and Applications. In: ARORA, P. (eds) **Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds**. Microorganisms for Sustainability, v 10. Springer, Singapore. 2019.

ORLOVIC-LEKO P., FARKAS B., GALIC I. A short review of environmental and health impacts of gold mining. **Reliability: Theory & Applications**. v.17, n.4, p. 242–248, 2022.

OSSAI, I.C.; AHMED, A.; HASSAN, A.; HAMID, F.S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review. **Environmental Technology & Innovation**, v.17, p.100526, 2020.

SUMÁRIO

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G.A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 75–88, 2015.

PANIGRAHY, N., PRIYADARSHINI, A., SAHOO, M., VERMA, A., DAVEREY, A., SAHOO, N. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. **Environmental Technology & Innovation**. v.27, p.102423, 2022.

PARRILLI, E.; PAPA, R.; TUTINO, M.L.; SANNIA, G. Engineering of a psychrophilic bacterium for the bioremediation of aromatic compounds. **Bioengineer Bugs**. v.1, n.3, p.213–216, 2010.

PERPETUO, E.; BARBIERI, C.; NASCIMENTO, C. Engineering Bacteria for Bioremediation In: "Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications. 2011.

PRABAGAR, S.; DHARMADASA, R.M.; LINTHA, A., THURAISINGAM, S.; PRABAGAR, J. Accumulation of heavy metals in grape fruit, leaves, soil and water: a study of influential factors and evaluating ecological risks in jaffna, Sri Lanka. **Environmental and Sustainability Indicators**. v.12, p. 100147. 2021.

RAFEEQ, H.; AFSHEEN, N.; RAFIQUE, S.; ARSHAD, A.; INTISAR, M.; HUSSAIN, A.; BILAL, M.; IQBAL, H.M.N. Genetically engineered microorganisms for environmental remediation. **Chemosphere**. v.310, p.136751. 2023.

RAHMAN, S.F.; KANTOR, R.S.; HUDDY, B.; THOMAS, B.C.; Van Zyl, A.W.; HARRISON, S.T.L.; BANFIELD, J.F. Genome resolved metagenomics of a bioremediation system for degradation of thiocyanate in mine water con taining suspended solid tailings. **Microbiologyopen**. v.6, p.00446, 2017.

RATHORE S., VARSHNEY A., MOHAN S., DAHIYA P. An innovative approach of bioremediation in enzymatic degradation of xenobiotics. **Biotechnology and Genetic Engeneering Reviews**. V.38, p.1–32, 2022.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G.A.; CAMERA, F.Dal.M.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.L; BACKES, G.T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. **Brazilian Journal of Development.** v.7, n.1, p. 9232-9254, 2021.

SAEED, M.; HUSSAIN, N.; SUMRIN, A.; SHABAZ, A.; NOOR, S.; BILAL, M.; ALEYA, L.; IGBAL, H.M.N. Microbial bioremediation strategies with wastewater treatment potentialities – A review. **Science of The Total Environment**. v.818, p.151754. 2021.

SCHNEIDER, W.D.H.; GONÇALVES, T.A.; UCHIMA, C.A.; dos REIS, L.; FONTANA, R.C.; SQUINA, F.M.; PINHEIRO, D.A.J.; CAMASSOLA, M. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by Penicillium echinulatumz strains and its hydrolysis potential for lignocelullosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162 –170, 2018.

SHELDON, R.A. CLEAS, Combi-CLEAs and 'Smart' Magnetic CLEAs: Biocatalysis in a Bio-Based Economy. **Catalysts**, v. 9, n. 261, p. 1-31, 2019.

SHELDON, R.A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.

SHOME, R. Role of microbial enzymes in Bioremediation. **eLifePress**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2020.

ŠIRIĆ, I.; EID, E.M.; EL-MORSY, M.H.E.; OSMAN, H.E.M.; ADELODUN, B.; ABOU FAYSSAL, S.; MIOČ, B.; GOALA, M.; SINGH, J.; BACHHETI, A.; ARYA, A.K.; CHOI, K.S.; KUMAR, V.; KUMAR, P. Health risk assessment of hazardous heavy metals in two varieties of mango fruit (*Mangifera indica* l. var. dasheri and langra). **Horticulturae**. v.8, n.9, p.832, 2022.

SOMU, P.; NARAYANASAMY, S.; GOMEZ, L.A.; RAJENDRAN, S.; LEE, Y.R.; BALAKRISHNAN, D. Immobilization of enzymes for bioremediation: A future remedial and mitigating strategy. **Environmental Research** v.212, p. 113411, 2022.

SONUNE, N. (2021). Microbes: A Potential Tool for Bioremediation. In: KUMAR, V.; PRASAD, R.; KUMAR, M. (eds) **Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste**. Springer, Singapore. 2021, p. 391-407.

ŠTEFANAC, T.; GRGAS, D.; LANDEKA DRAGIČEVIĆ, T. Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. **Journal of Xenobiotics**. V.11, p. 130-141, 2021.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 805–814, 2005.

UBER, T.M.; BACKES, E.; SAUTE, V.M.S.; SILVA, B.P.; CORRÊA, R.C.G.; KATO, C.G; SEIXAS, F.A.V.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Enzymes from basidiomycetes— peculiar and efficient tools for biotechnology. IN: BRAHMACHARI, G **Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis, and Industrial Applications**. Chapter 6, second edition, Elsevier, 2023 p. 129-164.

UBER, T.M.; BUZZO, A.J. DOS R.; SCARATTI, G.; AMORIM, S.M.; HELM, C.V.; MACIEL, G.M.; PERALTA, R.A.; MOREIRA, R.F.P.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Comparative detoxification of Remazol Brilliant Blue R by free and immobilized laccase of *Oudemansiella canarii.* **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, p. 17-28, 2022.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

VARJANI S, UPASANI VN, PANDEY A. Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of Pseudomonas aeruginosa and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination. **Science of the Total Environment**. v. 737, p. 139766, 2020.

WANG, D.; HE, H.; WEI, C. Cellular and potential molecular mechanisms underlying transovarial transmission of the obligate symbiont Sulcia in cicadas. **Environmental Microbiology**, v.25 n.4, p.836–852., 2023.

WEISS, R.; EISCHER, A.; TADIC, T.; GRITSCH, S.M.; ORTNER, M.; PRALL, K.; NEUNTEFEL, E.; PUTZ, R.F.; GUEBITZ, G.M.; NYANHONGO, G.S. Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*. **Journal of Cleaner Production**, v. 275, p. 122882, 2020.

WOŁEJKO, E.; WYDRO, U.; ŁOBODA, T. The ways to increase efficiency of soil bioremediation. **Ecological Chemistry and Engineering S**. v.23., 2016.

YANG, S.; YU, M.; CHEN, J. Draft genome analysis of Dietzia sp. 111N12-1, isolated from the South China Sea with bioremediation activity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.48, p.393–394, 2017.

ZAKARIA, N.N.; CONVEY, P.; GOMEZ-FUENTES, C.; ZULKHARNAIN, A.; SABRI, S.; SHAHARUDDIN, N.A.; AHMAD, S.A. Oil Bioremediation in the Marine Environment of Antarctica: A Review and Bibliometric Keyword Cluster Analysis. **Microorganisms.** v.9, p.419, 2021.

ZDARTA, J.; JANKOWSKA, K.; WYSZOWSKA, M.; KIJEŃSKA-GAWROŃSKA, E.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; PINELO, M.; MEYER, A.S.; MOSZYŃSKI, D.; JESIONOWSKI, T. Robust biodegradation of naproxen and diclofenac by laccase immobilized using electrospun nanofibers with enhanced stability and reusability. **Materials Science & Engineering C**, v. 103, p. 1-10, 2019.

ZHAN, H.; FENG, Y.; FAN, X.; CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation. **Applied Microbiology and. Biotechnology**. v.102 n.12, p. 5033–5043, 2018.

ZHANG, J.; HUANG, B.; TANG, T. Effect of co-culture with *Halomonas mongoliensis* on Dunaliella salina growth and phenol degradation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 10, p. 1072868, 2022.

3.3

Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli
Bruno Vinícius Daquila
Helio Conte

BIOTECNOLOGIA DE INSETOS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

1. INTRODUÇÃO

Os insetos são essenciais para a manutenção do equilíbrio ambiental e sobrevivência das demais espécies, principalmente a humana. Eles surgiram há cerca de 450 milhões de anos, no Ordoviciano, após as plantas ocuparem o ambiente terrestre. No Brasil, eles são considerados o grupo com a maior biodiversidade, correspondendo a 8,4% da fauna mundial (Garcia-Rosello *et al*., 2023). Contudo, estima-se que apenas 10% das espécies estejam catalogadas, defasagem que é ainda mais crítica nos países tropicais, pois apesar de concentrarem a maior biodiversidade (Mannion *et al*., 2013), contam com menor quantidade de recursos financeiros e humanos destinados a essas atividades (Titley *et al*., 2017).

Ainda que muitas espécies de insetos sejam desconhecidas pela ciência, muitas delas podem desaparecer sem nunca terem sido catalogadas (Amorim, 2023; Rafael *et al*., 2024). Esse desaparecimento pode estar associado a condições ambientais adversas, incluindo as mudanças climáticas. Estudos revelam uma queda de 49% no número de insetos em regiões afetadas pelo aumento das temperaturas (Outhwaite *et al*., 2022; Eickermann *et al*., 2023; Subedi *et al*.,2023). Além do risco de extinção, algumas espécies podem migrar para que possam se adaptar para a continuidade da vida, se tornando, em alguns casos, espécies invasivas (O´Shea-Wheller *et al*., 2023).

Diante da diversidade dos insetos ainda pouco explorada e a importância destes organismos, muitas pesquisas e novas tecnologias, utilizando-se de ferramentas multidisciplinares, tem sido desenvolvida nos últimos anos. Neste contexto, surge a biotecnologia aplicada à entomologia, que utiliza os insetos, suas células ou microrganismos simbiontes em pesquisas básicas (estudos

genéticos e moleculares, morfogênese, virologia, bioquímica, patologia e endocrinologia), bem como, a bioprospecção e manipulação das substâncias por eles produzidos, para o desenvolvimento e produção comercial de diversos bioprodutos (Ejiofor, 2016; Rong *et al*., 2019), com aplicações no meio ambiente, indústria, saúde e agricultura (Ikonomou et al., 2003; Drugmand *et al*., 2012; Vilcinskas, 2013, Ratcliffe *et al*., 2014; Caleffe *et al*., 2021).

2. APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA DE INSETOS A SAÚDE

Os insetos produzem moléculas pequenas, catiônicas e anfipáticas denominadas peptídeos antimicrobianos (AMPs). A síntese ocorre em células epiteliais, células do corpo gorduroso e hemócitos, bem como, em glândulas de veneno em Hymenoptera e salivar em Diptera, como resposta sistêmica à infecção por fungos, vírus ou bactérias (Charroux e Royet, 2010; Kang *et al*., 2012; Ejiofor, 2014; Zhai *et al*., 2018; Bai *et al*., 2021; Caleffe *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2021; Moran *et al.,* 2022; Stączek *et al*., 2023; Caleffe *et al*., 2024).

O primeiro AMP foi identificado na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* (Steiner, 1981) (Lepidoptera: Saturniidae). Atualmente, um banco de dados de peptídeos antimicrobianos (APD3) contém 3.146 AMPs, dos quais, 364 obtidos de várias ordens de insetos (Wang *et al*., 2016). A Tabela 1, destaca alguns AMPs identificados nas ordens Hymenoptera, Diptera e Lepidoptera.

Tabela 1 - Peptídeos Antimicrobianos em insetos

Ordem	Peptídeos Antimicrobianos em Insetos	Referências
Hymenoptera	Abaecina, Apidaecina, Defensina e Lisozimas	McMenamin *et al*., 2018
Diptera	Cecropinas, Defensina	Čeřovský *et al*., 2010
	Drosocina, Drosomicina	Díaz-Roa *et al*., 2019
	Diptericinas, Metchnikowin Attacinas, Phormia, Lucifensin, Lucimycin, Lucifensin II e Sarconesin	El Shazely *et al*., 2013
		Hanson; Lemaitre, 2020
		Lambert *et al*., 1989
		Pöppel *et al*., 2014
Lepidoptera	Cecropinas, Defensinas	Cytryńska *et al*., 2007
	Gloverinas, Moricinas	Lu *et al*., 2016
	Peptídeos Ricos em Prolina, Attacinas, Gloverina, Cecropina-1, Galiomicina e Lisozima	Nesa *et al*., 2020
		Wang et al., 2010
		Wojda, 2017
		Wojda *et al*., 2020

Como efetores da resposta imune dos insetos, os AMPs, apresentam importante atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária. Ao interagirem com os fosfolipídeos de membrana alteram a sua estrutura, causando a despolarização e alterações na permeabilidade, o que, consequentemente, pode levar a morte celular microbiana (Van't Hof *et al*., 2001; Splith; Neundorf, 2011; Ntwasa *et al*., 2012; Luo; Song, 2021; Stączek *et al*., 2023). Apesar das membranas celulares serem os principais alvos para os AMPs, muitos deles podem ser translocados para o citoplasma. Ao se ligarem ao DNA podem interferir ou inibir a replicação e transcrição (Bellemare *et al*., 2010), e, do mesmo modo, podem se ligar a outras moléculas intracelulares, interferindo na biossíntese e dobramento de proteínas, bem como, na síntese de componentes da parede celular dos patógenos (Park *et al*., 1998; Hale; Hancock, 2007; Luo; Song, 2021).

Além de participarem da resposta imunitária sistêmica contra organismos patogênicos, os AMPs também contribuem para garantir a sobrevivência dos endossimbiontes. Em algumas espécies de insetos, esses organismos encontram-se compartimentalizados em células especializadas (bacteriócitos) localizadas no intestino médio e células germinativas, formando o bacterioma (Schmidt; Engel, 2021), podem ainda contribuir com o fornecimento de nutrientes, proteção contra patógenos e adaptação dos insetos a diferentes ambientes (Zaidman-Rémy *et al.*, 2018).

Em larvas de *Galleria mellonella,* o aumento na expressão dos genes AMP (*CecD*, *galiomicina*, *galerimicina*, *gloverina* e *6-tox*) no intestino médio, foi associado ao aumento de *Enterococcus mundtii*, bactéria simbionte que predomina na microbiota desta espécie (Krams *et al.*, 2017). Em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), análise transcriptômica revelou que a expressão dos genes AMP (*Apid1*, *Apid73*, *abaecina, Def1*, *Apid* e *himenoptaecina),* aumentaram de acordo com a composição da microbiota e, esses compostos em níveis muito baixos, foram associados a diminuição na capacidade de eliminação de infecções sistêmicas e a sobrevivência desses insetos (Emery *et al.*, 2017; Kwong *et al.*, 2017). Essa associação também foi relatada em *Camptonotus floridanus* (Hymenoptera: Formicidae) (Ratzka *et al.*, 2013), *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) (Yao *et al.*, 2022), *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) (Login *et al.*, 2011) e *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) (Park *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2022).

Ao modular a resposta imunológica, os AMPs também podem contribuir para a regulação de funções como o sono, a aprendizagem não associativa e mudanças comportamentais, como observado em *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) infectada pelo fungo *Metharizium acridum* (Zhang *et al.*, 2017), *G. mellonella* infectada pelo nematoide entomatogênico *Steinernema carpocapse* (Shaik *et al.*, 2020), *A. meliffera* infectada com o vírus da asa deformada (DWV) (Pizzorno *et al.*, 2021) e *Drosophila* (Montanari; Royet, 2021; Van Alphen *et al.*, 2022).

Tendo em vista que essas funções são associadas ao sistema nervoso dos insetos, *Drosophila* tem sido utilizada como organismo modelo para estudos relacionados ao Alzheimer (DA), lesão cerebral traumática (TCE) e ataxia-telangiectasia (AT). Os resultados de vários estudos têm revelado que a supressão das vias que levam a produção de AMPs, confere uma proteção contra a neurodegeneração. Por outro lado, a expressão aumentada de genes AMP (*Cec* , *D pt* , *Att* , *Dpt* , *Def* , *Dro*, *Met e Mtk*) e a superexpressão do fator de transcrição Relish (infecções bacterianas no cérebro), podem resultar em neuroinflamação, neurodegeneração progressiva dependente da idade e redução na expectativa do tempo de vida (Lai *et al.,* 2007; Myllymäki; Rämet, 2013; Kounaditis *et al*., 2017; Hanson; Laimatrie, 2020), devido a alterações nas membranas mitocondriais, levando a apoptose de células em diferentes tecidos (Badinloo *et al*., 2018).

A partir do conhecimento das propriedades desempenhadas pelos AMPs nos insetos, esses compostos vêm sendo isolados por diferentes métodos de extração (Du *et al*., 2015; Tabunoki *et al*., 2019), manipulados por diferentes técnicas moleculares e bioquímicas, e, a bioengenharia desses produtos naturais, tem permitido utilizá-los na obtenção de medicamentos e outros produtos aplicados a saúde (Ratcliffe *et al*., 2014; Torres *et al*., 2019).

Dentre as aplicações, destaca-se o desenvolvimento de formulações tópicas para o tratamento de feridas e infecções (Ongey *et al*., 2018; Thapa *et al*., 2020), bem como, produção de biomateriais a serem utilizados em dispositivos médicos visando prevenir o crescimento de biofilmes bacterianos (Brady *et al.,* 2019). Essas atividades se devem ao amplo espectro de ação dos AMPs contra patógenos humanos incluindo *Escherichia coli* multirresistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus coagulans*, *Citrobacter freundii*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus sanguinis* e *S. aureus* (Vilcinskas, 2011; Vonkavaara *et al*., 2013), e os fungos *Pichia pastoris*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Neurospora crassa* e *Trichoderma viride* (Langen *et al*., 2006; Imamura *et al*., 2009; Pöppel *et al*., 2014),

bem como, menor capacidade de selecionar cepas de microrganismos resistentes, podendo ser empregados como substitutos aos antibióticos convencionais (Manniello *et al*., 2021).

Além disso, vários estudos têm demonstrado ação dos AMPs de insetos na prevenção e tratamento do câncer (Tonk *et al*., 2016; Brady *et al*., 2019). A atividade antitumoral associada a regressão de tumores, tem sido relacionada a indução da apoptose, parada do ciclo celular e angiogênese em diferentes linhagens celulares (Araki *et al*., 2019; Parvy *et al*., 2019; Jacqueline *et al*., 2020), incluindo as de melanoma, linfoma, leucemia, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de bexiga (Suttmann *et al*., 2008; Kao *et al*., 2012; Tonk *et al*., 2016; Ramos-Martín *et al*., 2022).

Dentre os AMPs de insetos, a melitina isolada do veneno de abelhas, vespas e formigas destaca-se devido ao potencial antitumoral contra cânceres de próstata, carcinoma de ovário, glioma, astrocitoma, carcinoma hepatocelular, leucemia, pulmão, carcinoma escamoso, osteossarcoma e câncer renal (Gajski; Garaj-Vrhovac, 2013; Xu *et al*., 2017; Soliman *et al*., 2019; Yu et al., 2020), o poecilocorisina-1 (PCC-1) isolado do percevejo *Poecilocoris lewisi* (Hemiptera: Scutelleridae), pela atividade antiproliferativa em linhagens celulares de melanoma (Lee *et al*., 2021) e as cecropinas obtidas de *Bombix mori* com efeito inibitório sobre a proliferação, formação de colônias, invasão e a migração de células cancerosas do esôfago (Xu *et al*., 2020).

Endossimbiontes que compõe a microbiota intestinal dos insetos, além de estarem associados a melhorias nos processos digestivos e saúde (Moran *et al*., 2019), proteção do sistema digestório (Royan, 2019) e estabelecimento de interações benéficas e patológicas (Yun *et al*., 2014), podem produzir várias moléculas bioativas com potencial biotecnológico e aplicações diversas em várias áreas (Xie *et al.,* 2019). Essa microbiota intestinal, estabelecida ao longo do tempo por meio de processos evolutivos e ecológicos, tem sido relatada nas ordens Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera,

Hymenoptera, Blattodea e Isoptera. Dentre os organismos identificados, destacam-se os fungos, Archaea, protozoários, vírus e, mais abundantemente, as bactérias (Flórez *et al*., 2015; Berasategui *et al*., 2016; Rajashekhar *et al*., 2017; Gurung *et al*., 2019).

Na medicina, diversas moléculas produzidas pelos endossimbiontes vem sendo empregadas na produção de fármacos. Dentre eles, destacam-se os antibióticos produzidos a partir de *Streptomyces* sp., *Kitasatospora* sp. e *Mycobacterium* sp. isolados do intestino de várias espécies de cupins (Matsui *et al.,* 2012), antifúngicos candicidina isolado de *Streptomyces* e a selvamicina produzida a partir de cepas de *Pseudonocardia*, ambos obtidos de formigas cortadeiras (Haeder *et al.,* 2009; Van Arnam *et al*., 2016) e lagriamida produzido por *Burkholderia gladioli* Lv-StB associado ao besouro escuro *Lagria villosa* (Flórez *et al*., 2018), bem como, a toxina pederina produzida pelo *Paederus fuscipes* empregada como agente antitumoral por atuar como inibidor da biossíntese de proteínas e da mitose (Piel, 2002).

Muitas dessas bactérias simbiontes, encontradas em insetos vetores de doenças como malária, doença de Chagas, leishmaniose e dengue, têm sido alvos de manipulação genética (McMeniman *et al*., 2009; Akhoundi *et al*., 2016; Monteiro *et al.,* 2018). Aliado a isso, os próprios insetos vetores vêm sendo modificados por meio de microrganismos que interrompem o seu ciclo de vida ou diminuem a suscetibilidade infecção por patógenos, como estratégias promissoras na redução da transmissão de patógenos para os humanos e, consequentemente, na incidência dessas doenças (Dong *et al.,* 2009; Berasategui *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2020).

Associados as modificações de bactérias simbiontes ou dos insetos vetores por microrganismos, espécies como *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), transmissor de arboviriroses causadores da dengue, Zika e Chikungunya, vem sendo manipulados geneticamente. Diferentes tecnologias moleculares e de edição gênica, incluindo o

silenciamento gênico por RNAi (Buchman *et al*., 2019), MicroRNAs (Yen *et al*., 2018; Dexheimer; Cochella, 2020), CRISPR/Cas9 (O'Leary; Adelman, 2020; Kumar *et al*., 2022; Ranian *et al*., 2022) e tecnologias Gene Drive (Sánchez *et al*., 2020), vem sendo utilizadas e podem se tornar as estratégias mais promissoras e eficientes para o controle destes mosquitos e outros vetores transmissores de doenças.

3. CULTURA DE CÉLULAS DE INSETOS (ICS) PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As culturas de células de insetos (ICs) foram estabelecidas a partir das ordens Diptera, Lepidoptera e Hemiptera. A partir de então, vetores de expressão de baculovírus (IC-BEVS) foram estabelecidos (O'Reilly *et al*., 1992), visando a produção de proteínas biologicamente ativas, bem como, proteínas recombinantes funcionais em escala industrial (Correia *et al*., 2020; Fernandes *et al*., 2020).

A construção dos IC-BEVS levou em consideração a especificidade dos baculovírus sobre as células dos insetos (Shokrollahi *et al*., 2021), não oferecerem nenhum risco a saúde humana (Premanand *et al*., 2018), a possibilidade de realização de modificações pós traducionais das proteínas sintetizadas (Gomez *et al*., 2014), bem como, a manipulação genética or meio de tecnologias como o RNA de interferência (RNAi) e CRISPR-Cas9, visando a produção de proteínas complexas e de difícil expressão em grande quantidade (Hong *et al*., 2022).

Dentre elas, destacam-se proteínas heterólogas, partículas semelhantes a vírus, vetores de proteína/antígeno exibidos na superfície incluindo antígenos diagnósticos (Ebihara *et al*., 2021), enzimas

citosólicas, vetores virais heterólogos, produtos utilizados na terapia gênica, bem como, vetores de entrega de genes incluindo várias vacinas humanas e veterinárias (Mishra, 2020).

As vacinas, são produzidas principalmente em células Sf21 e Sf9, desenvolvidas a partir do ovário de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e culturas de células High Five™ desenvolvidas a partir tecido embrionário de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). A primeira vacina produzida em CIs e comercializada para uso humano foi a Cervarix aprovada em 2009 nos EUA para a prevenção do câncer cervical (Cox; Hollister, 2008; Dunkle *et al*., 2017).

Na sequência, foram desenvolvidas vacinas Chimigen para hepatite B e C, bem como, a avId para linfoma não-Hodgkin de células B (Granados *et al*., 1994, Flublok e Flublok Quadrivalent para o vírus da gripe humana (Cox; Hollister, 2008; Dunkle *et al*., 2017) e Nuvaxovid/Covovax (Guebre-Xabier *et al*., 2020) e a vacina bivalente D614G e Beta (Pavot *et al*., 2022) para a prevenção da doença coronavírus 2019 (COVID-19). Do mesmo modo, foram produzidas as vacinas veterinárias Porcilis Pesti, BAYOVAC CSF E2, Circumvent PCV, Ingelvac CircoFLEX e Porcilis PCV (Felberbaum, 2015) e VLP H7N9 contra o vírus da gripe aviária H7N9 (Li *et al*., 2021).

Além das vacinas, outros produtos biológicos vêm sendo produzidos por meio do sistema de expressão IC-BEVS. Dentre eles, destaca-se o Provenge, medicamento imunoterápico para o tratamento de câncer de próstata (Cheever; Higano, 2011) e o Glybera como produto de terapia genética para o tratamento da deficiência hereditária de lipoproteína lipase (LPLD) (Steinhagen-Thiessen *et al*., 2017).

4. APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA DE INSETOS NA INDÚSTRIA E MEIO AMBIENTE

Nos últimos anos, os insetos têm se tornado uma alternativa viável para alimentação humana e animal, sendo propostos como o alimento do futuro, por serem ricos em nutrientes, inofensivos e produzirem peptídeos antimicrobianos com propriedades funcionais (Ordõnez-Araque *et al*., 2022).

Estima-se que mais de 2.205 espécies de insetos sejam consumidas em 128 países, sendo a maioria delas pertencente às ordens Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera. Os registros indicam a ocorrência de 932, 529, 464, 300 e 107 espécies de insetos comestíveis na Ásia, América do Norte, África, América do Sul e Oceania, respectivamente. Os países com pelo menos 100 espécies de insetos comestíveis relatadas são México (450), Tailândia (272), Índia (262), RDC (255), China (235), Brasil (140), Japão (123) e Camarões (100) (Omuse *et al*., 2024). Dentre eles, os grilos *Acheta domesticus* (Orthoptera; Gryllidae), as larvas de farinha *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Tenebrionidae) e as larvas da mosca soldado negro *Hermetia illucens* (Diptera; Stratiomyidae), são os mais utilizados.

Esses insetos comestíveis são ricos em nutrientes. Estudos tem demonstrado que o teor de proteínas é comparável ou maior do que aquele encontrado em legumes, laticínios, carnes (frango, bovina, cordeiro ou porco) e ovos (Gahukar, 2016). Dados mencionam gafanhotos, grilos e gafanhotos (Orthoptera) como fontes ricas e alternativas de proteínas (Yi *et al.,* 2016). E, apesar do conteúdo de aminoácidos essenciais variar de acordo com a espécie e estágios metamórficos (Raksakantong *et al.,* 2010; Chakravorty *et al*., 2016; Devi *et al.*, 2022), altas concentrações de lisina, valina, metionina, arginina e tirosina, já foram descritas na ordem Blattodea quando comparada a outras ordens (Tang *et al*., 2019).

Os lipídios constituem a segunda maior percentagem nos insetos comestíveis (Yi *et al.*, 2016). Os ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (Chakrayorty *et al.*, 2014), incluindo ácidos linoléico e linolênico são descritos em várias espécies (Ochiai; Komiya, 2021), sendo que, cupins, lagartas e larvas do gorgulho-da-palmeira, são as que apresentam os maiores teores de gordura. Nas larvas e pupas, as concentrações são diferenciadas, com teores de gordura variando de 7 a 77 g/100 g de peso seco (Bukkens *et al.*, 1997; Melo-Ruiz *et al.,* 2016).

Mesmo com a comprovação da qualidade nutricional de algumas espécies de insetos, ainda existe a aversão ao seu consumo *in natura.* Deste modo, eles têm sido inseridos na alimentação humana na forma de farinhas. Os petiscos granulados suplementados com farinha de insetos podem ser uma alternativa nova e atraente aos atuais lanches ricos em proteínas. A fortificação de salgadinhos granulados com 10 a 30% de farinha de insetos leva a um aumento no processamento do PME (mapeamento de processos). Além disso, as pesquisas mostram que a farinha de críquete poderia ser considerada um substituto de farinha multiuso sustentável, com baixo teor de carboidratos, alto teor de proteína e sustentável para muffins (Burt *et al.,* 2020; Wójtowicz *et al.*, 2023).

Do mesmo modo, a farinha e óleos derivados de insetos, tem sido utilizada na fabricação sustentável de rações destinadas a alimentação de animais em substituição as fontes primárias de proteína já utilizadas, como a soja, as ervilhas e a farinha de peixe (De Souza-Vilela *et al.,* 2019). Além da riqueza em proteínas e lipídios, incluindo os ácidos graxos poli-insaturados, esse produto apresenta custo reduzido de produção quando comparado a outras fontes naturais e boa palatabilidade para os animais (Penazzi *et al.*, 2021). Dentre as espécies utilizadas, *T. molitor* vem sendo considerada a melhor opção para substituição do farelo de soja ou peixes na dieta de ruminantes (Toral *et al.*, 2022) e suínos (Hong *et al.*, 2022), devido a maior digestibilidade intestinal. Para aves, *H. illucens* tem apresentado

resultados promissores para incorporação em rações de frangos (Schiavone *et al*., 2016). Além disso, a criação de *H. illucens* pode fornecer uma variedade de produtos valiosos, incluindo uma mistura de excrementos larvais, exúvias larvais e sobras de matéria-prima, que podem ser usados como fertilizante na agricultura, os quais, podem contribuir com o desenvolvimento de bactérias benéficas e materiais orgânicos para o solo, melhorando sua saúde e fertilidade (Lomonaco *et al*., 2024).

Além do emprego dos insetos na alimentação humana e animal, novas técnicas que utilizam os insetos, suas células, bem como, microrganismos simbiontes, baseadas em processos biomoleculares e celulares, buscam pela utilização de moléculas bioprospectadas. Vários estudos têm demonstrado a produção de enzimas em algumas espécies de insetos, por meio de microrganismos que compõem o microbioma intestinal. Dentre essas enzimas, destacam-se as celulases e xilanases (Scully *et al*., 2013), lipases e proteases (Veja; Vega e Dowd, 2005; Park *et al*., 2007; Feng *et al*., 2011; Scully *et al*., 2012; Kaltenpoth; Steiger, 2014), que vem sendo empregadas na produção de detergentes, biomedicamentos, alimentos e biocombustíveis (Kannan *et al*., 2019).

A produção de biocombustíveis tem evoluído no sentido da sustentabilidade e na utilização dos fluxos de subprodutos, e, além disso, os bio-óleos obtidos podem representar uma nova fonte de inseticidas bioracionais para insetos agrícolas e, especificamente, para produtos armazenados (Bruce *et al*., 2022). Em insetos ricos em gordura (oleaginosos), a produção enzimática de biodiesel, foi obtida utilizando a gordura extraída das larvas da mosca soldado negro *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomydae). Neste estudo, utilizaram a enzima lipase para catalisar a transesterificação da gordura com metanol, resultando em rendimento acima de 95%. O biodiesel obtido atendeu às especificações internacionais, e mostrou ser possível a reutilização das enzimas por até vinte ciclos, o que caracteriza indicativo de viabilidade econômica do processo

(Nguyen *et al.*, 2018). Do mesmo modo, biocombustíveis celulósicos também têm sido produzidos a partir da sacarificação de celulose, obtida da biomassa vegetal, por meio de enzimas secretadas por bactérias simbióticas celulolíticas isoladas do intestino de larvas de Lepidoptera, Coleoptera e adultos de Isoptera (Mika *et al.*, 2013; Manfredi *et al.*, 2015).

Além da celulose que é muito abundante na natureza, biopolímeros como quitina e a quitosana que são constituintes do exoesqueleto de insetos e de crustáceos, despertaram grande interesse biotecnológico. Esses compostos, inicialmente extraídos por processamento dos exoesqueletos por meio de tratamentos químicos, eram pouco aproveitados industrialmente. Com o desenvolvimento de processos que utilizam enzimas, bem como, microrganismos como bactérias ou fungos fermentadores, para produção de tais enzimas, o processamento tradicional vem sendo substituído, resultando no maior aproveitamento destes biopolímeros pela indústria, bem como, na redução dos impactos ambientais causados por métodos químicos convencionais (Pankai *et al.*, 2018; Mei *et al.*, 2024).

Dentre os insetos, representantes das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hymenoptera, Diptera, Hemiptera, Dictyoptera, Odonata e Ephemeropter, tem sido utilizado para extração de quitina e quitosona. Esses biopolímeros são biodegradáveis, biocompatíveis com outras biomoléculas, apresentam baixa toxicidade e, por isso, vem sendo utilizadas em diversas aplicações (Essawy *et al.*, 2019).

Dentre essas aplicações, podemos destacar o uso desses biopolímeros na produção de defensivos e adubos para plantas, floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores utilizados no tratamento de água, produção de fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas, esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental, biofármacos imunológicos, antitumorais, hemostáticos e

anticoagulantes e suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais (Rinaudo, 2006).

Mais recentemente, estudos demonstraram que alguns insetos podem atuar na degradação de plásticos, processo associado tanto a ação do aparelho bucal mastigador como a atividade metabólica de endossimbiontes que compõem a microbiota intestinal (Cucini *et al*. 2020; Cucini *et al*., 2022). Dentre eles, larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) na biodegradação de polietileno (PE), possivelmente, por ação de bactérias YP1 *e Enterobacter asburiae* YT1 (Yang *et al*., 2014; Morohoshi *et al*., 2018), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) na degradação de poliestireno (PS) e polietileno (PE) (Yang *et al*., 2021), sugerindo a participação de *Citrobacter* sp. e *Kosakonia* sp. na biodegradação (Brandon *et al*., 2021).

Do mesmo modo, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) também apresentaram capacidade de degradação do poliestireno presente na dieta e bactérias *Cronobacter, Kocuria* e *Pseudomonas*, bem como, os fungos *Aspergillus, Hyphodermella, Trichoderma* identificados no microbioma, podem estar associados a esse processo. *G. mellonella* alimentadas com polietileno e poliestireno apresentaram modificações na microbiota intestinal, com predomínio de *Pseudomonas,* o que sugere que a dieta influencia na composição endossimbiontes e, portanto, no maior ou menor consumo de plásticos (Lou *et al*., 2020; Barrionuevo *et al*., 2022). Apesar da importância que vem sendo atribuída a esses insetos na degradação de plásticos e a possibilidade da aplicação em processos de biorremediação (Jang; Kikuchi, 2020), mais estudos são necessários tanto para análise dos microbiomas insetos e isolamento dos microrganismos que atuam neste processo (Barrionuevo *et al*., 2022), para aplicá-los de forma industrial no ambiente, a fim de reduzir de forma sustentável o acúmulo desses contaminantes no ambiente.

5. APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NA BIOPROTEÇÃO DE CULTURAS, ANIMAIS E SERES HUMANOS

A bioproteção é um conceito abrangente que envolve diversas estratégias utilizando agentes vivos e não vivos, para o controle de insetos que podem ser pragas em culturas de interesse econômico, assim como vetores ou agentes patogênicos em animais de abate e seres humanos. Quando se empregam agentes vivos, são utilizados os termos 'controle biológico' ou 'biocontrole' (Eilenberg *et al*., 2001; Stenberg *et al*., 2021). Por outro lado, o uso de agentes não vivos deve ser referido como a utilização de 'substâncias de origem natural' (Figura 1) (Stenberg *et al*., 2021; 2023). Nos últimos anos, houve um esforço para promover o uso adequado desses termos, devido emprego indiscriminado por parte de agências governamentais e setores industriais, que buscam obter vantagens e benefícios aproveitando a percepção positiva da sociedade em relação à adoção e implementação de estratégias de controle biológico (Stenberg *et al*., 2021; 2023).

5.1 CONTROLE BIOLÓGICO

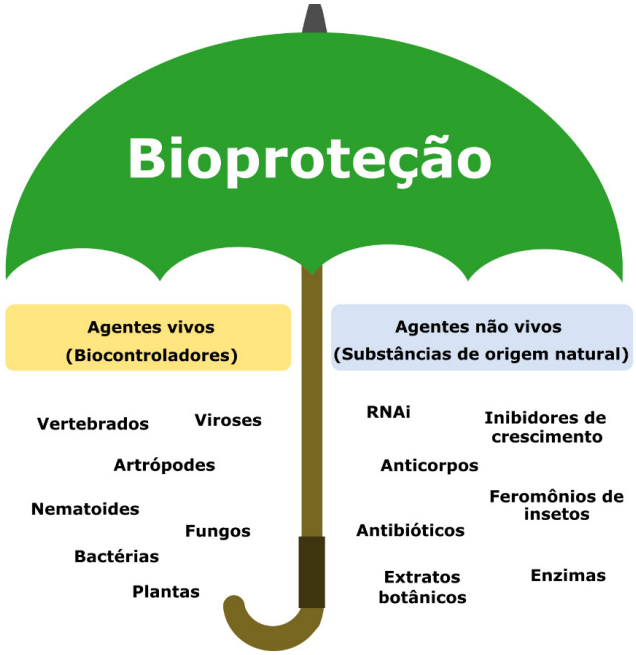
O controle biológico representa uma das estratégias de bioproteção mais utilizadas no planeta. Nela, macro e microrganismos, como artrópodes, bactérias, fungos, nematoides, plantas, vertebrados e vírus (exceção), são empregados como agentes biocontroladores no manejo de patógenos e pragas. Essa abordagem não apenas oferece um serviço ecossistêmico importante, mas também desempenha um papel significativo na promoção da sustentabilidade agrícola

(Polanczyk e Pratissoli, 2009; Heimpel; Mills, 2017; Van Lenteren *et al*., 2017; Daquila e Conte, 2019; Fontes e Laumann, 2019; Snyder, 2019; Parra *et al*., 2023; Stenberg *et al*., 2023).

De acordo com Stenberg *et al*. (2021), 'os princípios do controle biológico são fundamentados em ações antagonistas e protetoras da cadeia alimentar, estabelecidos por três premissas essenciais: (i) apenas agentes vivos são capazes de realizar o controle biológico; (ii) tais estratégias exercem efeitos diretos ou indiretos sobre pragas alvo; (iii) todas as abordagens devem ser categorizadas em pelo menos uma das quatro modalidades principais de controle biológico: (a) natural; (b) clássico; (c) conservativo; (d) aumentativo.'

Em termos gerais, o controle biológico se destaca como uma estratégia robusta e eficaz para o manejo sustentável de pragas. Ao adotar os princípios delineados por Stenberg *et al*. (2021) e as recomendações de Barratt *et al*. (2018), é possível otimizar as práticas de controle biológico, superando as limitações existentes e agilizando os processos com as agências reguladoras. A variedade de estratégias empregadas pelo controle biológico não apenas protege as culturas agrícolas, mas também fortalece os serviços ecossistêmicos, aumentando a resiliência dos sistemas de produção diante dos desafios contemporâneos.

Figura 1. O guarda-chuva da bioproteção engloba tanto agentes vivos, como no caso dos biocontroladores, quanto não-vivos, como as substâncias de origem natural. Ambas as abordagens são capazes de fornecer proteção contra pragas agrícolas e patógenos, porém é crucial manter uma distinção conceitual clara entre elas, tanto por motivos científicos quanto regulatórios



Fonte: Adaptado de Stenberg et al. (2023).

5.1.1 Macrorganismos aplicados ao controle biológico

O uso de macrorganismos, como parasitoides e predadores, no controle biológico de insetos-pragas é amplamente reconhecido e adotado em diversos setores, incluindo a agricultura, a pecuária e a saúde pública (De Abreu *et al*., 2015; Endo *et al*., 2018; Snyder, 2019; Parra *et al*., 2023). Esses organismos desempenham um papel fundamental na regulação natural das populações de pragas, oferecendo uma alternativa sustentável e ecologicamente segura aos métodos tradicionais de controle, como os que se baseiam em agentes químicos.

Insetos parasitoides são agentes que se desenvolvem no interior (endoparasitoide) ou exterior (ectoparasitoide) de outro organismo, conhecido como hospedeiro, do qual extraem alimento e eventualmente o eliminam como resultado direto ou indireto de seu desenvolvimento parasitário (Eggleton; Belshaw, 1992). Esses agentes são altamente eficazes no controle biológico de pragas específicas, devido à sua habilidade de localizar e atacar os hospedeiros de maneira precisa. Entre as microvespas, destacam-se os endoparasitoides *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Muscidifurax raptor* Girault & Sanders, 1910 (Hymenoptera: Pteromalidae), *Spalangia cameroni* Perkins, 1910 (Hymenoptera: Pteromalidae) e o ectoparasitoide *Anisopteromalus calandrae* Howard, 1881 (Hymenoptera: Pteromalidae).

Cotesia flavipes é utilizado como agente biocontrolador das larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em culturas de Poáceas (Lv *et al*., 2011; Arboleda e Vargas, 2019; Parra; Junior, 2019). Após realizar a oviposição no interior do hospedeiro, as larvas do parasitoide consomem o tecido gorduroso, levando o hospedeiro à exaustão e subsequentemente a morte. Esse processo envolve manipulações fisiológicas e bioquímicas que interferem no sistema imunológico do hospedeiro, assegurando seu desenvolvimento endoparasitário seguro (Rigoni; Conte, 2014).

Trichogramma galloi também é empregado no controle biológico de *D. saccharalis*. Esse parasitoide utiliza os ovos da praga como hospedeiros, uma fase de desenvolvimento que é considerada crucial para o controle populacional eficaz (Botelho *et al*., 1995). Modelos computacionais indicam que o uso isolado de *T. galloi* ou em combinação com *C. flavipes* podem proporcionar resultados promissores no controle biológico das populações de *D. saccharalis* (Molnár *et al*., 2016; Garcia *et al*., 2024).

Muscidifurax raptor e *S. cameroni* têm como hospedeiros as pupas de dípteros vetores de doenças, como *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), uma praga urbana que atua como vetor mecânico de patógenos prejudiciais a humanos e animais de abate (Rueda; Axtell, 1985; Geden; Hogsette, 1994; Geden *et al*., 2021). No entanto, há uma carência significativa de informações sobre o uso desses agentes na literatura, com registros limitados a descrições de ocorrências em sistemas de produção animal, como aviários e granjas. Esta lacuna destaca a necessidade urgente de desenvolver estudos para padronização de metodologias de criação massal e utilização desses parasitoides em sistemas de produção animal (Geden *et al*., 2021).

Anisopteromalus calandrae é um ectoparasitoide que detecta seus hospedeiros por meio de sons emitidos durante a alimentação ou por odores liberados (Press, 1988; Menon *et al*., 2002). Essas habilidades sensoriais, combinadas com sua capacidade de se locomover em espaços reduzidos, contribuem significativamente para seu sucesso como agente biocontrolador de pragas de grãos armazenados, especialmente as espécies dos gêneros *Lasioderma* (Coleoptera: Anobiidae), *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) e *Rhyzopertha* (Coleoptera: Bostrichidae) (Gredilha *et al*., 2006; del Arco *et al*., 2023).

Por outro lado, os predadores são organismos que se alimentam de outros insetos, desempenhando um papel crucial no controle populacional de pragas. Esses agentes são amplamente empregados em sistemas agrícolas, controlando uma ampla gama de pragas. Além disso, na saúde pública, os predadores desempenham um papel significativo no controle de vetores de doenças, como mosquitos transmissores de patógenos humanos.

Os crisopídeos verdes, *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae), *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Ceraeochrysa cornuta* (Navás, 1925) (Neuroptera: Chrysopidae), têm sido eficazes no controle biológico

de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), uma das principais pragas em culturas de café (Dami *et al*., 2023). Em estudos realizados em culturas de cana-de-açúcar, *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae) mostrou resultados promissores no controle de *D. saccharalis* (Souza *et al*., 2022).

Na pecuária e na saúde pública, a utilização de parasitoides e predadores tem se mostrado eficaz no controle de populações de dípteros vetores de doenças (Caleffe *et al*., 2019), como *M. domestica* e *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae). *Carcinops pumilio* (Erichson, 1834) (Coleoptera: Histeridae) e *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli, 1772) (Acari: Macrochelidae) são predadores que se alimentam de ovos e larvas de *M. domestica* (Geden e Axtell, 1988). Além desses, os indivíduos da ordem Odonata demonstram hábitos predatórios durante todos seus estágios de desenvolvimento, atacando larvas de mosquitos e moscas (Gullan; Cranston, 2012). O emprego de ninfas das famílias (Aeshnidae, Libellulidae, Corduliidae, Gomphidae, Calopterigidae, Coenagrionidae e Megapodagrionidae) para o controle de larvas de *A. aegypti*, vetor de doenças como Dengue, Zika e Chikungunya, resultou em potenciais de biocontrole diários médios superiores a 23,60% para indivíduos das famílias Aeshnidae, Libellulidae e Megapodagrionidae, respectivamente (Silva-Filho *et al*., 2021).

De modo geral, a utilização de macrorganismos no controle de insetos-pragas representa uma abordagem holística e sustentável para o manejo integrado de pragas em diversos contextos. A integração desses agentes de controle biológico nos sistemas agrícolas, pecuários e de saúde pública não apenas promove a saúde dos ecossistemas, mas também contribui significativamente para a redução dos impactos ambientais e para a proteção eficaz dos recursos naturais.

5.1.2 Microrganismos aplicados ao controle biológico

O emprego de microrganismos entomopatogênicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus, no controle de insetos-pragas tem emergido como uma estratégia altamente promissora em diversos setores. A prospecção desses microrganismos tem sido realizada por décadas para ampliar o entendimento da biodiversidade microbiana em diferentes regiões do planeta, visando identificar agentes com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de produtos que beneficiem os seres humanos sem causar danos ao meio ambiente (Azevedo *et al*., 2018; Rosini *et al*., 2021; Boro *et al*., 2022; Cavalcante *et al*., 2022; Negrelli *et al*., 2023).

Bacillus thuringiensis (Bt) (Bacillales: Bacillaceae) é um agente bacteriano amplamente reconhecido por sua eficácia no controle biológico de pragas, especialmente insetos. Esta bactéria possui a capacidade de produzir diversas proteínas inseticidas (Crickmore *et al*., 2021), que agem especificamente nas células epiteliais do sistema digestivo das fases larvais dos insetos-alvo, interferindo nos processos fisiológicos e resultando na morte dos indivíduos afetados (Bravo *et al*., 2007; Soberón *et al*., 2018; Daquila; Conte, 2019; Daquila *et al*., 2019).

A aplicação do produto comercial Agree® (contendo esporos e proteínas inseticidas de Bt isolado *aizawai* GC-91) para o controle de larvas neonatas de *D. saccharalis* resultou na mortalidade de 100% dos insetos 144 horas após a aplicação de soluções nas concentrações de 2,50 e 5 g/L^{-1} do produto. Após os tratamentos, os insetos apresentaram melanizações tegumentares e danos nas células epiteliais do intestino médio, levando à morte das larvas por inanição e septicemia (Daquila *et al*., 2019). Entretanto, o mercado de bioinsumos está interessado no desenvolvimento de metodologias inovadoras. Portanto, estudos recentes estão focados no desenvolvimento de análises sobre a bioatividade *de B. thuringiensis* em ovos de insetos-pragas, visando eliminar os embriões antes da eclosão larval.

Estudos recentes utilizando o produto comercial Agree® aplicado sobre ovos de *D. saccharalis* revelaram uma inibição de 34,78% no desenvolvimento embrionário, 144 horas após tratamento com uma solução na concentração de 20 g/L^{-1}. Observou-se alterações nas camadas coriônicas e membranas extraembrionárias dos ovos, o que pode ter interferido no processo de embriogênese. Adicionalmente, foram observadas melanizações próximas ao córion e danos ao sistema digestório dos embriões (Daquila *et al*., 2021). Taxas de inibição semelhantes (<30%) foram descritas após a aplicação do produto comercial Xentari® (contendo esporos e proteínas inseticidas de Bt isolado *aizawai*) e do isolado *kurstaki*, nas concentrações de 5 g/L^{-1} e 3.10^8 esporos/mL^{-1}, respectivamente, sobre ovos de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Machado, 2024), uma praga polífaga que afeta diversas culturas de interesse econômico.

Os fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados pela indústria de bioinsumos como agentes biocontroladores (Bergamo *et al*., 2019). Dentre eles, destacam-se os isolados de *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) e *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae). Estudos têm demonstrado a eficácia desses agentes no controle biológico de pragas como *D. saccharalis*. Em particular, a aplicação de dois isolados de *M. anisopliae* (MT e E9) em concentrações de 10^7 conídios/mL^{-1}, resultou na inviabilidade de 100% dos ovos tratados com o isolado MT. Os ovos tratados com o isolado E9 também apresentaram elevada taxa de inviabilidade, alcançando até 93,75% 144 horas após os tratamentos (da Silva *et al*., 2022). Em pupas de *D. saccharalis*, esses mesmos isolados, *M. anisopliae* (MT e E9), eliminaram 100% dos insetos em fase de pré-pupa (Schneider *et al*., 2013). Esses resultados destacam o potencial desses fungos como alternativas eficientes e sustentáveis no controle de pragas agrícolas.

A eficácia de entomopatógenos sobre dípteros foi revisada por Caleffe *et al*. (2019). Estudos sobre a aplicação do produto comercial Ballvéria® (contendo o isolado IBCB-66 de *B. bassiana*)

no controle de larvas da mosca-varejeira, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), foi avaliada em concentrações de 2 e 4%. Observou-se mortalidade de larvas em taxas de 26 e 36%, respectivamente. Análises dos insetos tratados revelaram melanizações tegumentares, presença de conídios no intestino médio, espaçamentos no labirinto basal, degeneração das microvilosidades, ausência da membrana peritrófica, extrusão fúngica na superfície externa do intestino médio, além da dispersão de hifas, conidióforos e conídios próximos às fibras musculares (Deves *et al*., 2022).

Entre os agentes entomopatogênicos, também podem ser incluídas algumas espécies de protozoários do filo Apicomplexa, que são parasitas animais heterotróficos, evoluídos a partir de algas marinhas fotossintéticas (Nitsche *et al*., 2023). Os parasitas do grupo gregarinas (Gregarinasina) são particularmente interessantes do ponto de vista evolutivo, sendo considerados a linhagem mais antiga dos Apicomplexa. Eles exibem uma alta diversidade e infectam uma ampla gama de invertebrados em ecossistemas marinhos, de água doce e terrestres. As interações entre as gregarinas e seus hospedeiros são complexas e variam de mutualismo a parasitismo (Wolz *et al*., 2022). Estudos dos Apicomplexa são de significativo interesse médico, uma vez que patógenos humanos importantes como *Toxoplasma* e *Plasmodium* (Martin *et al*., 2022).

Contudo, a biodiversidade das gregarinas ainda é subestimada e o entendimento de seu papel na moldagem de características relacionadas à aptidão de seus hospedeiros em função das condições ambientais é limitado. Esses protozoários habitam os intestinos e cavidades corporais de diversos artrópodes, e sua função não está completamente elucidada. Estudos indicam que as gregarinas encontradas em *Tenebrio molitor* (Fabricius, 1798) (Tenebrionidae: Coleoptera) podem atuar como simbiontes, potencialmente beneficiando a longevidade e o crescimento do hospedeiro (Sumner, 1933; Rueckert *et al*., 2019). Contudo, em pesquisa anterior realizada por Harry (1967), demonstrou que coleópteros infectados,

não apresentaram diferenças significativas na duração do período larval ou no peso final das pupas, em comparação com besouros não infectados quando alimentados com uma dieta ideal. No entanto, foi observado um impacto negativo significativo nas larvas infectadas quando alimentadas com uma dieta subótima, embora uma parte delas tenham apresentado sobrevivência maior sob essas condições adversas. Estudos adicionais de Rodriguez *et al*. (2007), não encontraram efeitos consideráveis das infecções durante os primeiros dois meses de vida dos coleópteros, mas relataram um impacto negativo na longevidade dos adultos infectados.

Tribolium castaneum (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma praga comum de grãos armazenados que pode ser infectada pelo protozoário *Gregarina cuneata* Stein, 1848 (Apicomplexa: Gregarinidae), por meio da ingestão de oocistos presentes nos alimentos. Após a ingestão, os esporozoítos, produzidos nos oocistos, são liberados e atravessam a membrana peritrófica para invadir as células do sistema digestório, onde se transformam em trofozoítos, iniciando o estágio extracelular do ciclo (Gigliolli *et al*., 2016). Durante esse estágio extracelular, as gregarinas aderem às células digestivas do coleóptero hospedeiro, absorvendo os nutrientes necessários para seu metabolismo. O desenvolvimento dos protozoários causa danos morfológicos e funcionais significativos nesta região do trato digestório, afetando a fisiologia da digestão e outros processos fisiológicos essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do hospedeiro (Gigliolli *et al*., 2015). Apesar das evidências dos danos causados, as interações entre os coleópteros hospedeiros e as gregarinas ainda requerem estudos mais aprofundados para uma compreensão abrangente dos diversos papéis desempenhados por esses protozoários em suas interações com o hospedeiro. Isso pode eventualmente levar ao desenvolvimento de tecnologias que explorem as gregarinas em programas de controle biológico contra pragas de grãos armazenados.

No entanto, é crucial destacar que o sucesso do controle biológico utilizando microrganismos depende de diversos fatores,

incluindo a seleção adequada do agente de controle, sua eficácia contra a praga-alvo, condições ambientais favoráveis e a implementação de práticas de manejo integrado de pragas. Além disso, é fundamental realizar estudos de segurança ambiental para avaliar os possíveis impactos não intencionais do uso desses microrganismos no ecossistema. Em resumo, a utilização de microrganismos no controle biológico de insetos-pragas representa abordagens promissoras e sustentáveis para o manejo de pragas.

6. SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL

Substâncias de origem natural, como antibióticos, anticorpos, bioestimulantes, enzimas, extratos botânicos, feromônios, inibidores de crescimento e RNAi, têm recebido um destaque crescente como alternativas sustentáveis e eficazes aos pesticidas químicos (Stenberg *et al*., 2021; 2023). Dentre esses agentes, os óleos essenciais têm recebido destaque, pois são amplamente estudados e aplicados em diferentes culturas (Marcílio *et al*., 2020; Lima *et al*., 2024).

O óleo de Neem, extraído da planta *Azadirachta indica* (Meliaceae) é um agente muito utilizado para a bioproteção de culturas e animais de corte (Campos *et al*., 2016; Camarda *et al*., 2018; Ferreira *et al*., 2019). Tratamentos realizados em *Pachycoris torridus* Scopoli, 1772 (Hemiptera: Scutelleridae), resultaram em até 78,75% de mortalidade dos insetos. Além disso, o agente causou uma série de anormalidades morfológicas, especialmente nas pernas, asas e élitros dos insetos (Ramos *et al*., 2020). Demonstrando o potencial bioprotetor do óleo de Neem em culturas de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), matéria-prima para a produção de biodiesel (Rocha, 2011; Ramos *et al*., 2020).

Em pupas de *D. saccharalis*, os tratamentos com solução de Neem resultaram em múltiplas anormalidades, afetando o desenvolvimento de adultos com comprometimento na reprodução, destacando o potencial para o controle eficaz do estágio mais resistente deste inseto (Schneider *et al*., 2017). Larvas de *C. megacephala*, tratadas com óleo de Neem apresentaram mortalidade de até 37% dos insetos ao atingirem o estágio de pupa (Luz *et al*., 2020). O controle de ácaros da espécie *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Mesostigmata: Dermanyssidae) em granjas, com aplicações de óleo de Neem resultaram em taxas próximas a 100%, demonstrado a eficiência e persistência da ação bioprotetora desse agente (Camarda *et al*., 2018).

O óleo essencial de alho, proveniente de *Allium sativum* (Amaryllidaceae), é outro agente promissor com propriedades bioprotetoras. Este composto contém a alicina como seu principal ativo, uma molécula que interfere em fatores bioquímicos e fisiológicos dos insetos. A aplicação de soluções de óleo de alho nas concentrações de 0,10, 0,50 e 1% sobre ovos de *D. saccharalis* inibiu a eclosão de 80, 91,70 e 89,20% dos ovos do inseto, respectivamente. Além disso, os tratamentos causaram rupturas e protrusões na região coriônica dos ovos e inibição parcial das esterases EST-9, EST-10 e EST-11, indicando sua possível interferência em fatores imunológicos do inseto (Canazart *et al*., 2021).

Outro agente que tem demonstrado efeitos significativos no controle de pragas é o óleo essencial de laranja doce, obtido a partir da prensagem das cascas de *Citrus aurantium* var. *dulcis* (Rutaceae). Em estudos envolvendo ovos e larvas neonatas de *D. saccharalis* tratados com soluções nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1% do óleo essencial, foram registradas mortalidades de 71,11, 93,33 e 100% para ovos, e 26, 58 e 89% para as larvas, respectivamente (Matos *et al*., 2023; Bergamo, 2024).

Além dos agentes botânicos mencionados, o uso de pós-inertes como a terra de diatomácea comercial Diatomite CI/325® e

a dolomita também podem ser empregadas como uma alternativa promissora para o controle populacional de *D. saccharalis* (Oliveira *et al*., 2020) e de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) (Freitas *et al*., 2020). É fundamental ressaltar que o sucesso da bioproteção utilizando substâncias de origem natural depende de vários fatores. Isso inclui a seleção adequada da substância, sua eficácia contra a praga-alvo, a seletividade em relação a organismos não alvo, condições ambientais favoráveis e a implementação de práticas adequadas de manejo integrado de pragas.

7. SELETIVIDADE DE AGENTES BIOPROTETORES SOBRE ORGANISMOS NÃO ALVO

A seletividade dos agentes bioprotetores, sejam eles vivos ou não vivos, é um aspecto crucial no manejo integrado de pragas. Essa seletividade refere-se à capacidade desses agentes em controlar eficazmente as pragas-alvo, ao mesmo tempo em que minimizam os efeitos negativos sobre organismos não-alvo, como parasitoides, predadores, polinizadores, e organismos do solo ou aquáticos (Ndakidemi *et al*., 2016; Giunti *et al*., 2022; Chavana; Joshi, 2024).

O crisopídeo verde, *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae), é um predador polífago encontrado naturalmente em culturas de interesse econômico, sendo valorizado por sua capacidade incessante de procurar presas e por desempenhar um papel crucial na regulação das populações de insetos-pragas em agroecossistemas (Scudeler *et al*., 2019; Scudeler *et al*., 2020). Bioensaios avaliando a seletividade de produtos comerciais sobre a biologia de *C. claveri* revelaram que o produto comercial Agree® não demonstra efeitos negativos sobre o ciclo de vida ou reprodução deste predador (Daquila *et al*., 2023). Por outro lado, o produto

comercial Natuneem® (óleo de Neem) demonstrou efeitos adversos significativos sobre a biologia de *C. claveri*. O produto resultou em danos ao sistema digestório das larvas (Scudeler; Santos, 2013; Scudeler *et al*., 2017) e adultos (Scudeler *et al*., 2016), interferiu na formação dos casulos (Scudeler *et al*., 2013) e afetou sua capacidade reprodutiva (Garcia *et al*., 2019).

Hymenoptera endoparasitoides das espécies *Leptopilina heterotoma* (Thompson, 1862) e *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pillault, 1979) (Figitidae), demonstram susceptibilidade a Bt isolado *kurstaki*, tanto por meio de ação direta quanto indireta. Isso inclui a contaminação crônica de seus hospedeiros ou a ingestão de alimento contaminado com doses recomendadas para o controle de pragas (Babin *et al*., 2022). Já em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), a contaminação de ração com os produtos comerciais Dipel® (contendo esporos e proteínas inseticidas de Bt *kurstaki* HD1) e Xentari® não demonstraram alterações nas taxas de sobrevivência de forrageiras recém emergidas (Libardoni *et al*., 2021). No entanto, a contaminação experimental de ração com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* revelaram a baixa seletividade desses agentes (Libardoni *et al*., 2023).

A seletividade dos agentes microbianos também deve considerar os organismos que desempenham papéis fundamentais na cadeia alimentar, como os dípteros da espécie *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera: Chironomidae). Estudos laboratoriais expuseram larvas de *C. xanthus* a diferentes concentrações dos produtos comerciais Bac-Control® (contendo esporos e proteínas inseticidas de Bt *kurstaki* HD1) e Boveril® (contendo conídios de *B. bassiana* isolado ESALQ PL63), revelando a ação tóxica desses produtos mesmo em concentrações baixas, o que ressaltou a necessidade de estudos em nível ecossistêmico (Dornelas *et al*., 2019). Estudos sobre os efeitos adversos de produtos comerciais contendo entomopatógenos em organismos não-alvo destaca a importância de avaliar os impactos em todos os níveis da cadeia alimentar. Assim, destacamos a

complexidade do manejo de pragas e a necessidade de adotar abordagens ecossistêmicas para garantir a eficácia e a sustentabilidade das práticas agrícolas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A diversidade dos insetos e a importância dessas espécies para manutenção do equilíbrio ambiental e sobrevivência de outros animais, inclusive os humanos, resultaram em avanços científicos e desenvolvimento de estratégias biotecnológicas, que utilizam esses organismos ou suas células, na produção de bioprodutos com aplicações diversas na saúde, indústria, meio ambiente e agricultura. Dentre esses, destacam-se os fármacos, vacinas humanas e veterinárias, dispositivos médicos, biocombustíveis, defensivos agrícolas, conservantes e outras proteínas.

Alguns insetos são comestíveis e tem sido apontado como alternativa viável para alimentação humana e animal, devido a riqueza nutricional e a produção de peptídeos antimicrobianos com propriedades funcionais. Enquanto outros, tem demonstrado importante papel na degradação de plástico, e, por isso, vem se tornando fortes candidatos a biorremediadores ambientais, em um futuro bem próximo.

As técnicas para criação de insetos em laboratório, bem como, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, modificações genéticas e tecnologia do DNA recombinante, tem sido essencial para avanços nas estratégias de controle biológico de pragas agrícolas e urbanas, fornecendo uma gestão eficiente em relação ao problema da resistência aos inseticidas e contaminação ambiental resultantes do uso desenfreado desses químicos no manejo de pragas.

Apesar dos avanços obtidos com a biotecnologia de insetos, no que diz respeito ao uso dos recursos naturais, a produção de bioprodutos de forma sustentável e controle biológico de pragas, ainda faltam investimentos em infraestrutura, pesquisas e profissionais qualificados. Contudo, o estudo e emprego dos insetos por meio das diferentes estratégias biotecnológicas em progresso, tem consolidado esses organismos como importantes ferramentas para o enfrentamento de questões globais emergentes como saúde pública, conservação ambiental e segurança alimentar, considerando-se as questões ecológicas, éticas e econômicas, bem como, a manutenção da nossa biodiversidade entomológica.

9. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v. 3, n. 10(3):e0004349, 2016.

AMORIM, D. S. O lugar dos insetos na biodiversidade (2023). Disponível em https://jornal.usp.br/?p=608274. Acesso em: 01 de Jun. 2024.

ARAKI, M.; KURIHARA, M.; KINOSHITA, S.; AWANE, R.; SATO, T.; OHKAWA, Y.; INOUE, Y. H; Anti-tumour effects of antimicrobial peptides, components of the innate immune system, against haematopoietic tumours in *Drosophila mxc* mutants. Disease Models & Mechanisms, v. 12, 2019.

ARBOLEDA, B., VARGAS, G. *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) in reducing *Diatraea tabernella* (Lepidoptera: Crambidae) injury in sugar cane. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 520-525, 2019.

AZEVEDO, J. L. D.; PAMPHILE, J. A.; QUECINE-VERDI, M. C.; LACAVA, P. T.; COSTA, S. O. P. D. **Biotecnologia microbiana ambiental**. Maringá: Eduem, p. 331, 2018.

BABIN, A.; LEMAUF, S.; REBUF, C.; POIRIÉ, M.; GATTI, J. L. Effects of *Bacillus thuringiensis kurstaki* bioinsecticide on two non-target *Drosophila* larval endoparasitoid wasps. **Entomologia Generalis**, v. 42, n. 4, p. 611-620, 2022.

SUMÁRIO

BADINLOO, M.; NGUYEN, E.; SUH, W.; ALZAHRANI, F.; CASTELLANOS, J.; KLICHKO, V. I.; ORR, W. C.; RADYUK, S. N. Overexpression of antimicrobial peptides contributes to aging through cytotoxic effects in *Drosophila* tissues. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 98, e21464, 2018.

BAI, S.; YAO, Z.; RAZA, M. F.; CAI, Z.; ZHANG, H. Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut. **Insect Science**, v.28, p. 286–301, 2021.

BARRATT, B. I. P.; MORAN, V. C.; BIGLER, F.; VAN LENTEREN, J. C. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, p. 155-167, 2018.

BARRIONUEVO, J. M. R.; VILANOVA-CUEVAS, B.; ALVAREZ, A.; MARTÍN, E.; MALIZIA, A.; GALINDO-CARDONA, A.; CRISTÓBAL, R. E.; OCCHIONERO m. A.; CHALUP, A.; MONMANY-GARZIA, A. C.; GODOY-VITORINO, F. The Bacterial and Fungal Gut Microbiota of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. Consuming Polyeethylene and Polystyrene. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 13, 918861, 2022.

BELLEMARE, A.; VERNOUX, N.; MORIN, S.; GAGNÉ, S. M.; BOURBONNAIS, Y. Structural and antimicrobial properties of human pre-elafin/trappin-2 and derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 253, 2010.

BERASATEGUI, A.; SHUKLA, S.; SALEM, H.; KALTENPOTH, M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n. 4, p. 1567–1577, 2016.

BERGAMO, R. H. S. **Efeitos do óleo essencial à base de limoneno sobre o epitélio do intestino médio de larvas neonatas da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e da *Spodoptera eridania* (Stoll, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2024. 51 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2024.

BERGAMO, R. H. S.; DAQUILA, B. V.; CONTE, H. Sustentabilidade agrícola com fungos entomopatogênicos. *In*: SILVA, B. R. (org.). **Principais grupos e aplicações biotecnológicas dos fungos**. Ponta Grossa: Atena Editora. 2019. cap. 5, p. 41-52.

BORO, M.; SANNYASI, S.; CHETTRI, D.; VERMA, A. K. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. **Archives of Microbiology**, v. 204, p. 666, 2022.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; MAGRINI, E. A.; HADDAD, M. L.; RESENDE, L. C. L.Effect of the number of *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) releases on egg parasitization of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 65-69, 1995.

BRADY, D.; GRAPPUTO, A.; ROMOLI, O.; SANDRELLI, F. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n.23, p. 5862, 2019.

BRANDON, A. M.; GARCIA, A. M.; KHLYSTOV, N. A.; WU, W. M.; CRIDDLE, C. S. Enhanced bioavailability and microbial biodegradation of polystyrene in an enrichment derived from the gut microbiome of *Tenebrio molitor* (mealworm larvae). **Environmental Science Technology**, v.55, p. 2027–2036, 2021.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRUCE, A.; WILSON, A. N.; RANABHAT, S.; MONTGOMERY, J., NICHOLSON, S., HARRIS, K.; MORRISON III, W. R. A. Biomass Pyrolysis Oil as a Novel Insect Growth Regulator Mimic for a Variety of Stored Product Beetles. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 3, p.877–887, 2022.

BUCHMAN, A.; GAMEZ, S.; LI, M.; ANTOSHECHKIN, I.; LI, H. H.; WANG, H. W.; CHEN, C. H.; KLEIN, M. J.; DUCHEMIN, J. B.; PARADKAR, P. N.; AKBARI, O. S. Engineered resistance to Zika virus in transgenic *Aedes aegypti* expressing a polycistronic cluster of synthetic small RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 9, p. 3656-3661, 2019.

BUKKENS, S.G.F. Nutritional value of edible insects. **Ecological of Food and Nutrition**, v. 36, p. 287–319, 1997.

BURT, K. G.; KOTAO, T.; LOPEZ, I.; KOEPPEL, J.; GOLDSTEIN, A.; SAMUEL, L.; STOPLER, M. Acceptance of using cricket flour as a low carbohydrate, high protein, sustainable substitute for all-purpose flour in muffins. **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 201-213, 2020.

CALEFFE, R. R. T.; DE OLIVEIRA, S. R.; AMAT, E.; GOMEZ-PIÑEREZ, L. M.; DAQUILA, B. V.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; CONTE, H. Larval internal morphology of the introduced blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 310, p. 23-33, 2024.

SUMÁRIO

CALEFFE, R. R. T.; DE OLIVEIRA, S. R.; POLONIO, J. C.; DAQUILA, B. V.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; PAMPHILE, J. A.; CONTE, H.; MEURER, E. C. Bioprospection of antimicrobial peptides in Calliphoridae (Diptera) maggots: a review on extraction, purification and detection methodologies. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 47, n. 1, p. e49767, 2021.

CALEFFE, R. R. T.; DE OLIVEIRA, S. R.; SCHOFFEN, R. P.; DE OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; CONTE, H. Biological control of Diptera Calliphoridae: A Review. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 21, n. 2, p. 145-155, 2019.

CAMARDA, A.; PUGLIESE, N.; BEVILACQUA, A.; CIRCELLA, E.; GRADONI, L.; GEORGE, D.; SPARAGANO, O.; GIANGASPERO, A. Efficacy of a novel neem oil formulation (RP03™) to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, n. 3, p. 290-297, 2018.

CAMPOS, E. V.; DE OLIVEIRA, J. L.; PASCOLI, M.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F., Neem oil and crop protection: From now to the future. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1494, 2016.

CANAZART, D. A.; DAQUILA, B. V.; SCHNEIDER, L. C. L.; DA SILVA, C. V.; GIGLIOLLI, A. A. S.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; CONTE, H. Insecticidal effect of garlic essential oil on *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 7, p. 435-447, 2021.

CAVALCANTE, J. K. G.; CONTE, H.; DAQUILA, B. V.; CALEFFE, R. R. T. Potencial biotecnológico de *Chromobacterium subtsugae*: uma breve revisão voltada ao manejo biológico de artrópodes-praga. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 13, n. 3, p. 200-211, 2022.

ČEŘOVSKÝ, V.; ŽĎÁREK, J.; FUČÍK, V.; MONINCOVÁ, L.; VOBURKA, Z.; BÉM, R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p.455–466, 2010.

CHAKRAVORTY, J.; GHOSH, S.; MEGU, K.; JUNG, C.; MEYER-ROCHOW, V. B. Nutritional and anti-nutritional composition of *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae) and *Odontotermes* sp. (Isoptera: Termitidae): Two preferred edible insects of Arunachal Pradesh, India. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 3, p. 711-720, 2016.

CHARROUX, B.; ROYET, J. *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. **Fly**, v. 4, n. 1, p. 40-47, 2010.

CHAVANA, J., JOSHI, N. K. Toxicity and risk of biopesticides to insect pollinators in urban and agricultural landscapes. **Agrochemicals**, v. 3, n. 1, p. 70-93, 2024.

CHEEVER, M. A.; HIGANO, C. S. Provenge (Sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. **Clinical Cancer Research**, *v.*17, p. 3520–3526, 2011.

CORREIA, R.; FERNANDES, B.; ALVES, P. M.; CARRONDO, M. J.; ROLDÃO, AImproving influenza HA-VIps production in insect high five cells via adaptive laboratory evolution. **Vaccines**, v. *8*, p. 589, 2020.

COX, M. M.; HOLLISTER, J. R. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. **Influenza Other Respir Viruses**, v. 2, n. 6, p. 211–219, 2008.

CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T. R.; BONNING, B. C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, p. 107438, 2021.

CUCINI, C.; FUNARI, R.; MERCATI, D.; NARDI, F.; CARAPELLI, A.; MARRI, L. Polystyrene shaping effect on the enriched bacterial community from the plastic-eating *Alphitobius diaperinus* (Insecta: Coleoptera). **Symbiosis**, v. 86, p. 305–313, 2022.

CUCINI, C.; LEO, C.; VITALE, M.; FRATI, F.; CARAPELLI, A.; NARDI, F. Bacterial and fungal diversity in the gut of polystyrene-fed *Alphitobius diaperinus* (Insecta: Coleoptera). **Animal Gene**, v. 17, 200109, 2020.

CYTRYŃSKA, M.; MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; SUDER, P.; JAKUBOWICZ, T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**, v. *28*, p.533–546, 2007.

DA SILVA, C. V.; DAQUILA, B. V.; SCHNEIDER, L. C. L.; CALEFFE, R. R. T.; POLONIO, J. C.; CANAZART, D. A.; NANYA, S.; CONTE, H. Potential of two *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) isolates for biological control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) Eggs. **Advances in Entomology**, v. 10, p. 63-76, 2022.

DAMI, B. G.; DOS SANTOS, J. A.; BARBOSA, E. P.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; VACARI, A. M. Functional response of 3 green lacewing species (Neuroptera: Chrysopidae) to *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Insect Science**, v. 23, n. 3, p. 1-8, 2023.

DAQUILA, B. V.; CONTE, H. Biotecnologia ambiental e o desenvolvimento agrícola sustentável. *In*: AGUILERA, J. G., ZUFOO, A. M. (org.). **A Preservação do Meio Ambiente e o Desenvolvimento Sustentável**. Ponta Grossa: Atena Editora. 2019. cap. 10, p. 92-105.

DAQUILA, B. V.; MOI, D. A.; SCUDELER, E. L.; OLIVEIRA, J. A. D. S.; POLANCZYK, R. A.; CONTE, H. Selectivity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) to the polyphagous predator *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 147, n. 7, p. 499-510, 2023.

DAQUILA, B. V.; SCUDELER, E. L.; DOSSI, F. C. A.; MOREIRA, D. R.; PAMPHILE, J. A.; CONTE, H. Action of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in the midgut of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 19642, 2019.

DAQUILA, B. V.; SCUDELER, E. L.; DOSSI, F. C. A.; MOREIRA, D. R.; PAMPHILE, J. A.; CONTE, H. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 2019-2028, 2021.

DE ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. D. S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão de literatura. **Uningá Review**, v. 22, n. 2, 2015.

DE SOUZA-VILELA J., ANDREW N. R., RUHNKE I. (2019) Insect protein in animal nutrition. *Animal Production Science* **59**, 2029-2036.

DEL ARCO, L.; RIUDAVETS, J.; CAMPOS-RIVELA, J. M.; MARTÍNEZ-FERRER, M. T.; AGUSTÍ, N.; CASTAÑÉ, C. Effectiveness of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) in the control of *Sitophilus zeamais* and *Rhyzopertha dominica* in paddy rice. **Biological Control**, v. 181, p. 105216, 2023.

DEVES, V. J.; DAQUILA, B. V.; SCUDELER, E. L.; CALEFFE, R. R. T.; CONTE, H. Effects of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on the midgut of the *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) maggots. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e313111436389, 2022.

DEVI, W. D.; BONYSANA, R.; KAPESA, K.; RAI, A. K.; MUKHERJEE, P. K.; RAJASHEKAR, Y. Potential of edible insects as source of functional foods: Biotechnological approaches for improving functionality. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 2, n. 3, p. 461-472, 2022.

DEXHEIMER, P.J.; COCHELLA, L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology,** v. 8, p. 409, 2020.

DÍAZ-ROA, A.; ESPINOZA-CULUPÚ, A.; TORRES-GARCÍA, O.; BORGES, M. M.; AVINO, I. N.; ALVES, F. L.; MIRANDA, A.; PATARROYO, M. A.; SILVA-JUNIOR, P. I.; BELLO, F. J. Sarconesin II, a New Antimicrobial Peptide Isolated from *Sarconesiopsis magellanica* Excretions and Secretions. **Molecules**, 31, n. 24(11), p. 2077, 2019.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against Malaria parasites. **PLOS Pathogens**, v. 5, e1000423, 2009.

DRUGMAND, J. C.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1140–1157, 2012.

DU, F.; GUO, L.; QIN, Q.; ZHENG, X.; RUAN, G.; LI, J.; LI, G. Recent advances in aptamer-functionalized materials in sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 134-146, 2015.

DUNKLE, L. M.; IZIKSON, R.; PATRIARCA, P. A.; GOLDENTHAL, K. L.; MUSE, D.; COX, M. M. Randomized comparison of immunogenicity and safety of quadrivalent recombinant versus inactivated influenza vaccine in healthy adults 18-49 Years of age. **The Journal of Infectious Diseases,** v. 216, p. 1219–1226, 2017.

EBIHARA, T., MASUDA, A., TAKAHASHI, D., HINO, M., MON, H., KAKINO, K., FUJII, T.; FUJITA, T.; UEDA, T.; LEE, J. M.; KUSAKABE, T. Production of scFv, fab, and IgG of CR3022 antibodies against SARS-CoV-2 using silkworm-baculovirus expression system. **Molecular Biotechnology**, *v.* 63, p. 1223–1234, 2021.

EGGLETON, P., BELSHAW, R. Insect parasitoids: an evolutionary overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 337, n. 1279, p. 1-20, 1992.

EICKERMANN, M.; JUNK, J.; RAPISARDA, C. Climate Change and Insects. **Insects**, v. 14, n. 678, 2023.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, p. 387-400, 2001.

EJIOFOR, A. O. Insect biotechnology. *In:* **Short Views on Insect Genomics and Proteomics: Insect Proteomics,** v. 2, p. 185-210, 2016.

EL SHAZELY, B.; VEVERKA, V.; FUČÍK, V.; VOBURKA, Z.; ŽĎÁREK, J.; ČEŘOVSKÝ, V. Lucifensin II, a Defensin of Medicinal Maggots of the Blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 571-578, 2013.

EMERY, O.; SCHMIDT, K.; ENGEL, P. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee *Apis mellifera*. **Molecular Ecology**, v. 26, p.2576–2590, 2017.

ENDO, K. M.; HERNANDES, E. P.; CONTE, H. Pupal parasitoids for the biological control of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Biotemas**, v. 31, n. 4, p. 1-13, 2018.

ESSAWY, A. A.; HEFNI, H.; EL-NGGAR, A. M. Biocompatible and Biodegradable Chitosan Composites in Wound Healing Application: In Situ Novel Photo-Induced Skin Regeneration Approach. **Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites**, p.143–183, 2019

FELBERBAUM, R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. **Biotechnology Journal**, v. 10, p. 702–714, 2015.

FENG, W.; WANG, X. Q.; ZHOU, W.; LIU, G. Y.; WAN, Y. J. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. **Journal Insect Science**, v. 11, n. 135, 2011.

FERNANDES, B.; VIDIGAL, J.; CORREIA, R.; CARRONDO, M. J.; ALVES, P. M.; TEIXEIRA, A. P.; ROLDÃO, A. Adaptive laboratory evolution of stable insect cell lines for improved HIV-Gag VLPs production. **Journal of Biotechnology**, v. 307, p. 139–147, 2020.

FERREIRA, A. P. P.; DE MENDONÇA, D. E. A.; DE OLIVEIRA, J. A. D. S.; CONTE, H. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) as a biotechnological tool: A short review. **Luminária**, v. 21, n. 2, p. 28-35, 2019.

FLÓREZ, L. V.; BIEDERMANN, P. H.; ENGL, T.; KALTENPOTH, M. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 904–936, 2015.

FLÓREZ, L. V.; SCHERLACH, K.; MILLER, I. J.; RODRIGUES, A.; KWAN, J. C.; HERTWECK, C.; KALTENPOTH, M. An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in *Lagria villosa* beetles**. Nature Communications,** v. 9, p. 2478, 2018.

FONTES, E. M. G., LAUMANN, R. Special section on biological control. **Neotropical Entomology**, v. 48, p. 873-874, 2019.

FREITAS, A. C. O.; GIGLIOLLI, A. A. S.; CALEFFE, R. R. T. C.; CONTE, H. Insecticidal effect of diatomaceous earth and dolomite powder against Corn weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae). **Turkish Journal of Zoology**, v. 44, n. 6, p. 490-497, 2020.

GAHUKAR, R. T. **Edible insects farming: efficiency and impact on family livelihood, food security, and environment compared with livestock and crops**. *In*: Insects as sustainable food ingredients. Academic Press, 2016. p. 85-111.

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVA, C, V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environmental Toxicological Pharmacology**, v. 36, n. 2, p.697-705, 2013.

GARCIA, A. S. G.; SCUDELER, E. L.; PINHEIRO, P. F. F.; DOS SANTOS, D. C. Can exposure to neem oil affect the spermatogenesis of predator *Ceraeochrysa claveri*?. **Protoplasma**, v. 256, p. 693-701, 2019.

GARCIA, A. G.; WAJNBERG, E.; PARRA, J. R. P. Optimizing the releasing strategy used for the biological control of the sugarcane borer Diatraea saccharalis by Trichogramma galloi with computer modeling and simulation. **Scientific Reports**, v. 14, p.9535, 2024.

GARCIA-ROSELLO, E.; GONZALEZ-DACOSTA, J.; GUISANDE, C.; LOBO, J. M. GBIF falls short of providing a representative picture of the global distribution of insects. **Systematic Entomology**, v. 48, p. 1-9, 2023.

GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C. Predation by *Carcinops pumilio* (Coleoptera: Histeridae) and *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae) on the house fly (Diptera: Muscidae): Functional response, effects of temperature, and availability of alternative prey. **Environmental Entomology**, v. 17, n. 4, p. 739-774, 1988.

GEDEN, C. J.; NAYDUCH, D.; SCOTT, J. G.; BURGESS IV, E. R.; GERRY, A. C.; KAUFMAN, P. E.; THOMPSON, J.; PICKENS, V.; MACHTINGER, E. T. House fly (Diptera: Muscidae): Biology, pest status, current management prospects, and research needs. **Journal Integrated Pest Management**, v. 12, n. 1, p. 39, 2021.

GEDEN, C.; HOGSETTE, J. Research and extension needs for integrated pest management for arthropods of veterinary importance. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 1039, 1994. Disponível em: https://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1039. Acesso de junho de 2024.

GIGLIOLLI, A. A. S.; JULIO, A. H. F.; CONTE, H. The life cycle of *Gregarina cuneata* in the midgut of *Tribolium castaneum* and the effects of parasitism on the development of insects. **Bulletin of Entomological Research**, v. 106, n. 2, p. 258-267, 2016.

SUMÁRIO

GIGLIOLLI, A. A. S.; LAPENTA, A. S.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; ABRAHÃO, J.; CONTE, H. Morpho-functional characterization and esterase patterns of the midgut of *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitized by *Gregarina cuneata* (Apicomplexa: Eugregarinidae). **Micron**, v. 76, p. 68-78, 2015.

GIUNTI, G.; BENELLI, G.; PALMERI, V.; LAUDANI, F.; RICUPERO, M.; RICCIARDI, R.; MAGGI, F.; LUCCHI, A.; GUEDES, N. C. G.; DESNEUX, N.; CAMPOLO, O. Non-target effects of essential oil-based biopesticides for crop protection: Impact on natural enemies, pollinators, and soil invertebrates. **Biological Control**, v. 176, p. 105071, 2022.

GOMES GARCIA, A.; WAJNBERG, E.; PARRA, J. R. P. Optimizing the releasing strategy used for the biological control of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* by *Trichogramma galloi* with computer modeling and simulation. **Scientific Reports**, v. 14, 9535 p. 2024.

GRANADOS, R. R. *Trichoplusia ni* Cell Line which Supports Replication of Baculoviruses. U.S. Patent 5,300,435, 5 April 1994.

GREDILHA, R.; CARVALHO, A. R.; LIMA, A. F.; MELLO, R. P. Parasitismo de *Anisopteromalus calandrae* Howard, 1881 (Hymenoptera: Pteromalidae) sobre formas imaturas de *Lasioderma serricorne* Fabricius, 1792 (Coleoptera: Anobiidae) na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 489-491, 2006.

GUEBRE-XABIER, M.; PATEL, N.; TIAN, J. H.; ZHOU, B.; MACIEJEWSKI, S.; LAM, K.; PORTNOFF, A. D.; MASSARE, M J.; FRIEMAN, M. B.; PIEDRA, P. A.; ELLINGSWORTH, L.; GREGORY G.; SMITH, G. NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge. **Vaccine**, v. 38, p.7892–7896, 2020.

GULLAN, P. J., CRANSTON, P.S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo: Roca, p. 496, 2012.

GURUNG, K.; WERTHEIM, B.; FALCAO SALLES, J. The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 167, n. 3, p. 156-170, 2019.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p.4742–4746, 2009.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951-9, 2007.

HANSON, M. A; LEMAITRE, B. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. **Current Opinion in Immunology**, v. 62, p.22-30, 2020.

HARRY, O. G. The effect of a eugregarine *Gregarina polymorpha* (Hammerschmidt) on the mealworm larva of *Tenebrio molitor* (L.). **The Journal of Protozoology**, v. 14, n. 4, p. 539-547, 1967.

HEIMPEL, G. E., MILLS, N. J. **Biological Control - Ecology and Applications**. University Press: Cambridge, 2017, 386 p.

HONG, M.; LI, T.; XUE, W.; ZHANG, S.; CUI, L.; WANG, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; GU, Y.; XIA, N.; LI, S. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 994743, 2022.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p.1–20, 2003.

IMAMURA, M. Multipeptide precursor structure of acaloleptin A isoforms, antibacterial peptides from the Udo longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p.1120–1127, 2009.

JACQUELINE, C.; PARVY, J. P.; ROLLIN, M. L.; FAUGÈRE, D.; RENAUD, F.; MISSÉ, D.; THOMAS, F.; ROCHE, B. The role of innate immunity in the protection conferred by a bacterial infection against câncer: Study of an invertebrate model. **Scientific Reports**, v. 10, 10106, 2020.

JANG, S.; KIKUCHI, Y. Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. **Current Opinion in Insect Science**, v. 41, p. 33–39, 2020.

KALTENPOTH, M.; STEIGER, S. Unearthing carrion beetles' microbiome: characterization of bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae. Molecular Ecology, v. 23, p. 1251–1267, 2014.

KANG, B. R., KIM, H., NAM, S. H., YUN, E. Y., KIM, S. R., AHN, M. Y., HWANG, J. S. CopA3 peptide from *Copris tripartitus* induces apoptosis in human leukemia cells via a caspase-independent pathway. **BMB Reports**, v. 45, n. 2, p. 85–90, 2012.

KANNAN, M.; MUBARAKALI, D.; THIYONILA, B.; KRISHNAN, M.; PADMANABAN, B.; SHANTKRITI, S. Insect gut as a bioresource for potential enzymes - an unexploited area for industrial biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.18, 101010, 2019.

KAO, F. S.; PAN, Y. R.; HSU, R. Q.; CHEN, H. M. Efficacy verification and microscopic observations of an anticancer peptide, CB1a, on single lung cancer cell. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. *1818*, p. 2927–2935, 2012.

KRAMS, I. A.; KECKO, S.; JÕERS, P.; TRAKIMAS, G.; ELFERTS, D.; KRAM, R.; LUOTO, S.; RANTALA, M. J.; INASHKINA, I., GUDRĀ, D.; FRIDMANIS, D.; CONTRERAS-GARDUÑO, J., GRANTIŅA-IEVIŅA, L.; KRAMS, R.; KRAMA, T. Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. **Journal of Experimental Biology,** v.15, n. 220(Pt 22), p.4204-4212, 2017.

KWONG, W. K.; MANCENIDO, A. L.; MORAN, N. A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. **Royal Society Open Science**, v. 8, n. 4(2):170003, 2017.

LAI, C. Q.; PARNELL, L. D.; LYMAN, R. F.; ORDOVAS, J. M.; MACKAY, T. F. Candidate genes affecting *Drosophila* life span identified by integrating microarray gene expression analysis and QTL mapping. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 28, p. 237–249, 2007.

LAMBERT, J.; KEPPI, E.; DIMARCQ, J. L.; WICKER, C.; REICHHART, J. M.; DUNBAR, B.; LEPAGE, P.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J.; FOTHERGILL, J. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 262–266, 1989.

LANGEN, G.; IMANI, J.; ALTINCICEK, B.; KIESERITZKY, G.; KONGEL, K-H.; VILCINSKAS, A. Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 549–557, 2006.

LEE, J.; CHA, W. H.; LEE, D-W. Multiple precursor proteins of thanatin isoforms, an antimicrobial peptide associated with the gut symbiont of *Riptorius pedestris*. F**rontiers in Microbiology**, v. 12, 796548, 2022.

LEE, R. H.; OH, J-D.; HWANG, J. S.; LEE, H-K.; SHIN, D. Antitumorigenic effect of insect-derived peptide poecilocoris in-1 in human skin cancer cells through regulation of Sp1 transcription factor. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 18445, 2021.

LI, J.; LI, R.; ZHANG, Q.; PENG, P.; WANG, X.; GU, M.; HU, Z.; JIAO, X.; PENG, D.; HU, J.; LIU, X. H7N9 influenza virus-like particle based on BEVS protects chickens from lethal challenge with highly pathogenic H7N9 avian influenza virus. **Veterinary Microbiology**, v. 258, 109106, 2021.

LIBARDONI, G.; NEVES, M. O. J.; ABATI, R.; LOZANO, E. R.; VISMARA, E. S.; COSTA-MAIA, F. M.; RIBEIRO, L. S.; ESCHER, B. L.; POTRICH, M. Selectivity of fungi used in pest control to Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-9, 2023.

LIBARDONI, G.; NEVES, P. M. O. J.; ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; COSTA-MAIA, F. M.; VISMARA, E. S.; LOZANO, E. R.; POTRICH, M. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, p. 3482, 2021.

LIMA, V. O.; BRAGHINI, A.; PAULA, F. C.; SOUZA, J. M. R.; FIGUEIREDO, G. P.; VACARI, A. M. Toxicity of botanical insecticides at different developmental stages of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lynetiidae), and their side effects on predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). **Crop Protection**, v. 181, p. 106678, 2024.

LOGIN, F. H.; VALLIER, S. B. A.; VICENT-MONÉGAT, C.; VIGNERON, A.; WEISS-GAYET, M.; ROCHAT, D.; HEDDI, A. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. **Science**, v. 334:362–365, 2011.

LOMONACO, G.; FRANCO, A.; SMET, J.; SCIEUZO, C.; SALVIA, R.; FALABELLA, P. Larval Frass of *Hermetia illucens* as Organic Fertilizer: Composition and Beneficial Effects on Different Crops. **Insects**, v. *15*, p. 293, 2024.

LOU, Y.; EKATERINA, P.; YANG, S-S.; LU, B.; LIU, B.; REN, N.; CORVINI, P. F-X.; XING, D. Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 5, p. 2821–2831, 2020.

LU, D.; GENG, T.; HOU, C.; HUANG, Y.; QIN, G.; GUO, X. *Bombyx mori* Cecropin A has a high antifungal activity to entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Gene**, v. 583, p.29–35, 2016.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. *22*, 22(21):11401, 2021.

LUZ, D. S.; OLIVEIRA, A. E. M.; CALEFFE, R. R. T.; CONTE, H. Efeitos do óleo de Neem (*Azadirachta indica* A. JUSS.) no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). *In*: PEREIRA, A. M.; FEITOSA, L. C. S.; REIS, S. S. (orgs.). **A pesquisa nos diferentes campos da medicina veterinária**. Ponta Grossa: Editora Atena. 2020. cap. 4, p. 35-46.

SUMÁRIO

LV, J.; WILSON, L. T.; BEUZELIN, J. M.; WHITE, W. H.; REAGAN, T. E.; WAY, M. O. Impact of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) as an augmentative biocontrol agent for the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) on rice. **Biological Control**, v. 56, n. 2. p. 159-169, 2011.

MACHADO, F. S. **Potencial inseticida de *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) sobre ovos de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2024. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Entomologia Agrícola) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2024.

MANFREDI, A.P.; PEROTTI, N. I.; MARTÍNEZ, M. A. Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p.1384–1393, 2015.

MANNIELLO, M. D.; MORETTA, A.; SALVIA, R.; SCIEUZO, C.; LUCCHETTI, D., VOGEL, H.; SGAMBATO, A.; FALABELLA, P. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. **Cellular and Molecular Life** Sciences, v. 78, p. 4259–4282, 2021.

MANNION, P. D.; UPCHURCH, P.; BENSON, R. B. J.; GOSWAMI, A. The latitudinal biodiversity gradient through deep time. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 1, p. 42-50, 2013.

MARCÍLIO, T.; DAQUILA, B. V.; CONTE, H. Extratos vegetais no manejo alternativo da *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *In*: REDIN, E. (org.). **Meio ambiente e seus desafios: Estudos Contemporâneos**. Belo Horizonte: Editora Poisson. 2020. cap. 4, p. 46-57.

MARTIN, E.; VALLON, L.; CARVALHO, C. S.; GIRALD, M.; MINARD, G. Gregarine parasites are adapted to mosquito winter diapause. **Parasites & Vectors**, v. 15, p. 249, 2022.

MATOS, G. G. F.; BERGAMO, R. H. S.; DAQUILA, B. V.; CONTE, H. Efeito inseticida do óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *Dulcis* sobre ovos da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). *In*: 7º Simpósio Nacional de Biotecnologia Ambiental & IX Encontro de Graduandos e Pós-graduandos em Biotecnologia, 42., 2023, Maringá. **Anais** [...]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2023.

MATSUI, T.; TANAKA, J.; NAMIHIKI, T.; SHINZATO, N. Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p.731–735, 2012.

McMENAMIN, A. J.; DAUGHENBAUGH, K. F.; PAREKH, F.; PIZZORNO, M. C.; FLENNIKEN, M. L. Honey bee and bumble bee antiviral defense. **Viruses**, v. 10, n. 8, p. 395, 2018.

McMENIMAN, C. J.; LANE, R. V.; CASS, B. N.; FONG, A. W. C.; SIDHU, M.; WANG, Y-F.; O'NEILL, S. L. O. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 2, n. 323(5910), p.141-4, 2009.

MEI, Z.; KUZHIR, P.; GODEAU, G. Update on Chitin and Chitosan from Insects: Sources, Production, Characterization, and Biomedical Applications. **Biomimetics**, v. 9, n. 5, p. 297, 2024.

MELO-RUÍZ, V.; MORENO-BONETT, C.; SÁNCHEZ-HERRERA, K.; DÍAZ-GARCÍA, R.; GAZGA-URIOSTE, C. Macronutrient composition of giant water bug (Lethocerus sp.) edible insect in Mexico and Thailand. **Journal of Agricultural Science and Technology A**, v. 6, n. 5, 2016.

MENON, A.; FLINN, P. W.; DOVER, B. A. Influence of temperature on the functional response of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Product Research**, v. 38, p. 463-469, 2002.

MIKA, N.; ZORN, H.; RÜHL, M. Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. **Yellow Biotechnology II: Insect Biotechnology in Plant Protection and Industry**, p. 1-17, 2013.

MISHRA, V. A comprehensive guide to the commercial baculovirus expression vector systems for recombinant protein production. **Protein & Peptide Letters**, *v.* 27, p. 529–537. 2020.

MOLNÁR, S.; LÓPEZ, I.; GÁMEZ, M.; GARAY, J. A two-agent model applied to the biological control of the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) by the egg parasitoid *Trichogramma galloi* and the larvae parasitoid *Cotesia flavipes*. **Biosystems**, v. 141, p. 45-54, 2016.

MONTANARI, M.; ROYET, J. Impact of microorganisms and parasites on neuronally controlled *Drosophila* behaviours. **Cells,** v. *10*, 2350, 2021.

MONTEIRO, F. A.; WEIRAUCH, C.; FELIX, M.; LAZOSKI, C.; ABAD-FRANCH, F. **Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease** (2018). *In*: Advances in Parasitology, Academic Press, v. 99, p. 265-344.

MORAN, D.; DUTTA, U.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AIMARI, E.; DEKA, B. Insect venoms and their bioactive components: A novel therapeutic approach in chronic diseases and cancer. **Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics**, v. 6, p. 360-382, 2022.

MORAN, N.; OCHMAN, H.; HAMMER, J. Evolutionary and ecological consequences of gut microbial communities. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 50, p. 451–475, 2019.

SUMÁRIO

MYLLYMÄKI, H.; RÄMET, M. Transcription factor zfh1 downregulates *Drosophila* Imd pathway. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, p.188–197, 2013.

NDAKIDEMI, B.; MTEI, K.; NDAKIDEMI, P. A. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. **Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 364-374, 2016.

NEGRELLI, J. G. D.; BOEIRA, V. H. P.; ANDRADE, C. O.; CORNIANI, N. J. M.; MORI, J. C.; POLONIO, J. C.; CONTE, H. Bioestimulantes e seu papel na construção de um futuro sustentável. **Arquivos do Mudi**, v. 27, n. 2, p. 12-27, 2023.

NESA, J.; SADAT, A. BUCCINI, D. F.; KATI, A.; MANDAL, A. K.; FRANCO, O. L. Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: A splendid immune defense response in silkworms. **RSC Advances**, v. 10, p. 512–523, 2020.

NGUYEN, N.; OZARSKA, B.; FERGUSSON, M.; VINDEN, P. -European Journal of Wood and Wood Products. Holz als Roh- und Werkstoff, 2018.

NITSCHE, F.; CARDUCK, S.; VON AMELN, J.; MACH, N.; DORADOR, C.; PREDEL, R.; RUECKERT, S.; ARNDT, H. Gregarines from darkling beetles of the Atacama Desert, *Atacamagregarina paposa* gen. et sp. nov. from *Scotobius* and *Xiphocephalus ovatus* sp. nov. from *Psectrascelis* (Coleoptera, Tenebrionidae). **European Journal of Protistology**, v. 90, p. 126008, 2023.

NTWASA, M.; GOTO, A.; KURATA, S. Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, n. 2012:101989, 2012.

O'SHEA-WHELLER, T.A.; CURTIS, R.J.; KENNEDY, P.J.; GROOM, E.K.J.; POIDATZ, J.; RAFFLE, D.S.; RIHAS-NOSS, S.V.; BARTOLOMÉ, C.; DASILVA-MARTINS, D.; MASIDE, X.; MATO, S.; OSBORNE, J.L. Quantifying the impact of an invasive hornet on *Bombus terrestris* colonies. **Communications Biology,** v. 6, n. 990, 2023.

O'LEARY, S.; ADELMAN, Z. N. CRISPR/Cas9 knockout of female-biased genes AeAct-4 or myofem in *Ae. aegypti* results in a flightless phenotype in female, but not male mosquitoes. Benoit JB, editor. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 12, p. e0008971, 2020.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L.; LUCKOW, V. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992. 347p.

OCHIAI, M.; KOMIYA, Y. Detection of edible insect derived phospholipids with polyunsaturated fatty acids by thin-layer chromatography, gas chromatography, and enzymatic methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 99, p. 103869, 2021.

SUMÁRIO

OLIVEIRA, J. A. S.; MAGATÃO, A. C.; RAUJO, L. A.; LUPEPSA, L., CONTE, H. Screening test of diatomaceous earth as an alternative control method for *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Luminária**, v. 22, n. 1, p. 6-16, 2020.

OMUSE, E. R.; TONNANG, H. E. Z.; YUSUF, A. A.; MACHEKANO, H.; EGONYU, J. P.; KIMATHI, E.; MOHAMED, S. F.; KASSIE, M.; SUBRAMANIAN, S.; ONDITI, J.; MWANGI, S., EKESI, S.; NIASSY, S. The global atlas of edible insects: analysis of diversity and commonality contributing to food systems and sustainability. **Scientific Reports**, v. 14, 5045, 2024.

ONGEY, E. L.; GIESSMANN, R. T.; FONS, M.; RAPPSILBER, J.; ADRAIN, L.; NEUBAUER, P. Heterologous Biosynthesis, Modifications and Structural Characterization of Ruminococcin-A, a Lanthipeptide from the Gut Bacterium *Ruminococcus gnavus* E1, in *Escherichia coli*. **Front Microbiology**, v. 26; n. 9, p.1688, 2018.

ORDOÑEZ-ARAQUE, R.; QUISHPILLO-MIRANDA, N.; RAMOS-GUERRERO, L. Edible insects for humans and animals: Nutritional composition and an option for mitigating environmental damage. **Insects**, v. 13, p. 944, 2022.

OUTHWAITE, C. L.; MCCANN, P.; NEWBOLD, T. Agriculture and climate change are reshaping insect biodiversity worldwide. **Nature**, v. 605, p.97-102, 2022.

PANKAI, N.; MOLOVA, G.; PREMILA, L. B.; IMTINARO, L.; PARYEEZ, P.; SUBHA, G. **Edible Insects as Sources of Novel Bioactive Compounds Recent Research Trends in Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 2, Ganguly, S. (editor), pp.55-70, 2018.

PARK C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, p. 253–257, 1998.

PARK, D. S.; OH, H. W.; BAE, K. S.; KIM, H-M.; HEO, S-Y.; KIM, N-J.; SEOL, K-Y.; PARK, H-Y. Screening of bacteria producing lipase from insect gut: isolation and characterization of a strain, *Burkholderia* sp. HY-10 producing lipase. **Korean Journal of Applied Entomology**, v. 46, p. 131–139, 2007

PARK, K-E.; JANG, S. H.; LEE, J.; LEE, S. A.; KIKUCHI, Y.; SEO, Y-S.; LEE, B. L. The roles of antimicrobial peptide, rip-thanatin, in the midgut of *Riptortus pedestris*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. *78*, p. 83–90, 2018.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: state of art and perspectives. **Scientia Agricola**, v. 80, p. e20230080, 2023.

PARRA, J. R. P.; JUNIOR, A. C. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 1-6, 2019.

PARVY, J-P. YU, Y.; DOSTALOVA, A.; KONDO, S.; KURJAN, A.; BULET, P.; LEMAÎTRE, B.; VIDAL, M.; CORDERO, J. B. The antimicrobial peptide defensin cooperates with tumour necrosis factor to drive tumour cell death in *Drosophila*. **eLife**, v. *8*, e45061, 2019.

PAVOT, V.; BERRY, C.; KISHKO, M.; ANOSOVA, N. G.; HUANG, D.; TIBBITTES, T.; RAILLARD, A.; GAUTHERON, S.; GUTZEIT, C.; KOUTSOUKOS, M.; CHICZ, R. M.; LECOUTURIER, V. Protein-based SARS-CoV-2 spike vaccine booster increases cross-neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern in non-human primates. **Nature Communications**, v. 13, p.1699, 2022.

PIEL, J. A. polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 4002–14007, 2002.

PIZZORNO, M.C.; FIELD, K.; KOBOKOVICH, A. L.; MARTINs, P. L.; GUPTA, R. A.; MAMMONE, R.; RAVNYAK, D.; CAPALDI, E. A. Transcriptomic responses of the honey bee brain to infection with deformed wing virus. **Viruses**, v. *13*, n. 2, p. 287, 2021.

POLANCZYK, R. A., PRATISSOLI, D. Biological control of agricultural pests: principles and field applications. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 410-419, 2009.

PÖPPEL, A. K.; KOCH, A.; KOGEL., K-H.; VOGEL, H.; KOLLEWE, C.; WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. **Biological Chemistry**, v. 395, p. 49–656, 2014.

PREMANAND, B.; WE, P. Z.; PRABAKARAN, M. Baculovirus surface display of immunogenic proteins for vaccine development. **Viruses**, *v.* 10, p. 298, 2018.

PRESS, J. W. Movement of a weevil parasitoid, *Anisopteromalus calandrae* (Howard), within a column of wheat in relation to host location. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 5, p. 205-208, 1988.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 2ª Ed. Manaus: Editora INPA, 2024.

RAJASHEKHAR, M.; SHAHANAZ; KALIA, V. K. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 5, p. 581-588, 2017.

RAMOS, W. L. P.; RAMOS, A. C.; DAQUILA, B. V.; SCUDELER, E. L., MOREIRA, D. R.; NANYA, S.; CONTE, H. Sustentabilidade ambiental: Controle alternativo de *Pachycoris torridus* Scopili, 1772 (Hemiptera: Scutelleridae) com *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *In*: SILVA-MATOS, R. R. S.; OLIVEIRA, A. R. F.; MATOS, S. S. (orgs.). **Meio Ambiente Sustentável 2**. Ponta Grossa: Editora Atena. 2020. cap. 14, p. 172-182.

RAMOS-MARTÍN, F.; HERRERA-LEÓN, C.; D'AMELIO, N. *Bombyx mori* Cecropin D could trigger cancer cell apoptosis by interacting with mitochondrial cardiolipin. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembrane**, v. 1864, 184003, 2022.

RANIAN, K. HERRERA-LEÓN, C.; D'AMELIO, N. CRISPR/Cas9 mediated sexratio distortion by sex specific gene editing in *Aedes aegypti*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p.3015–22, 2022.

RATCLIFFE, N.; AZAMBUJA, P.; MELLO, C. B. Recent advances in developing insect natural products as potential modern day medicines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014: 904958, 2014.

RATZKA, C.; GROSS, R.; FELDHAAR, H. Gene expression analysis of the endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 611–623, 2013.

RIGONI, G. M., CONTE, H. Malpighian tubules in larvae of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae): A morphological comparison between non-parasitized and parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera; Braconidae). **Advances in Entomology**, v. 2, n. 4, p. 24029, 2014.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. Progress in Polymer, **Science,** v. 31, p. 603-632, 2006.

ROCHA, M. A. M. **Instruções técnicas para a cultura do pinhão manso**. Vitória: Incaper. 2011. Doc. 196, 28 p.

RODRIGUEZ, Y.; OMOTO, C. K.; GOMULKIEWICZ, R. Individual and population effects of eugregarine, *Gregarina niphandrodes* (Eugregarinida: Gregarinidae), on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Environmental Entomology**, v. 36, n. 4, p. 689-693, 2007.

RONG, R.; LI, T.; ZHANG, Y.; GU, Y.; XIA, N.; LI, S. Progress in vaccine development based on baculovirus expression vector system. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 35, p. 577–588, 2019.

SUMÁRIO

ROSINI, B.; COTRIM, G. S.; SILVA, A. F.; CAGNI, G. S.; CONTE, H. Micoparasitismo no controle biológico da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*). *In*: ZUFFO, A. M.; AGUILERA, J. G. (orgs.). **Pesquisas agrárias e ambientais**. Nova Zavantina: Pantanal Editora. 2021. cap. 10, p. 102-109.

ROYAN, M. Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. **Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression**, v. 29, n. 2, p.95-103, 2019.

RUECKERT, S.; BETTES, E.; TSAOUSIS, A. D. the symbiotic spectrum: where do the gregarines fit?. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 687-694, 2019.

RUEDA, L. M.; AXTELL, R. C. Comparison of hymenopterous parasites of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), pupae in different livestock and poultry production systems. **Enviromental Entomology**, v. 14, n. 3, p. 217-222, 1985.

SÁNCHEZ C. H.S.; WU, S. L.; BENNETT, J. B.; MARSHALL, J. M. MGD riv E: A modular simulation framework for the spread of gene drives through spatially explicit mosquito populations. **Methods Ecological and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 229–39, 2020.

SCHIAVONE, A.; CULLERE, M.; MARCO, M.; MENEGUZ, M.; BIASATO, I.; BERGAGNA, S.; DESSUTTO, D.; GAI, F.; DABBOU, S.; GASCO, L.; ZOTTE, A. D. Partial or total replacement of soybean oil by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) fat in broiler diets: effect on growth performances, feed-choice, blood traits, carcass characteristics and meat quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 1, p. 93-100, 2016.

SCHMIDT, K.; ENGEL, P. Mechanisms underlying gut microbiota-host interactions in insects. **Journal of Experimental Biology**, v. 224, jeb207696, 2021

SCHNEIDER, L. C. L.; SILVA, C. V.; CONTE, H. Toxic effect of commercial formulations of neem oil, *Azadirachta indica* A. Juss., in pupae and adults of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 1-8, p. e0432014, 2017.

SCHNEIDER, L. C. L.; SILVA, C. V.; PAMPHILE, J. A.; CONTE, H. Infection, colonization and extrusion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Entomology and Nematology**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2013.

SCUDELER, E. L.; DAQUILA, B. V.; CONTE, H.; SANTOS, D. C. Crisopídeos: Interface entre biologia e ambiente agrícola. *In*: SILVA, C. D. D. (org.). **Coletânea Nacional sobre Entomologia**. Ponta Grossa: Atena Editora. 2020. cap. 8, p. 86-104.

SCUDELER, E. L.; DAQUILA, B. V.; SANTOS, D. C.; CONTE, H. Crisopídeos: Interface entre biologia e ambiente agrícola. *In*: SILVA, C. D. D. (org.). **Coletânea Nacional sobre Entomologia 3**. Ponta Grossa: Editora Atena. 2019. cap. 8, p. 86-104.

SCUDELER, E. L.; GARCIA, A. S. G.; PADOVANI, C. R.; PINHEIRO, P. F. F.; SANTOS, D. C. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*. **Micron**, v. 80, p. 96-111, 2016.

SCUDELER, E. L.; GARCIA, A. S. G.; PADOVANI, C. R.; SANTOS, D. C. Action of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on cocoon spinning in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 176-182, 2013.

SCUDELER, E. L.; GARCIA, A. S. G.; PINHEIRO, P. F. F.; SANTOS, D. C. Neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) affects the ultrastructure of the midgut muscle of *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Acta Histochemica**, v. 119, p. 84-91, 2017.

SCUDELER, E. L.; SANTOS, D. C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, v. 44, p. 125-132, 2013.

SCULLY, E. D.; GEIB, S. M.; HOOVER, K.; TIEN, M.; TRINGE, S. G.; BARRY, K.W.; RIO, T. G.; CHOVATIA, M., HERR, J. R.; CARLSON, J. E. Metagenomic profiling reveals lignocellulose degrading system in a microbial community associated with a wood-feeding beetle. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73827, 2013.

SCULLY, E. D.; HOOVER, K.; CALSON, J.; TIEN, M.; GEIB, S. M. Proteomic analysis of *Fusarium solani* isolated from the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis*. **PLoS One**, v. 7, e32990, 2012.

SHAIK, H.A.; MISHRA, A.; SEHADOVÁ, H.; KODRÍK, D. Responses of sericotropin to toxic and pathogenic challenges: Possible role in defense of the wax moth *Galleria mellonella*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,** v. *227*, 108633, 2020.

SHOKROLLAHI, N.; HABIBI-ANBOUHI, M.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A.; ALIRAHIMI, E.; BEHDANI, M. Expressing of recombinant VEGFR2-specific nanobody in baculovirus expression system. **Iranian Journal of Biotechnology**, *v.* 19, e2783, 2021.

SILVA-FILHO, E. D.; ARAÚJO-PIOVEZAN, T. G.; DANTAS, J. O.; SILVESTRE, M. J.; ALVES, A. E. O.; RIBEIRO, G. T. Controle de larvas *de Aedes aegypti* por ninfas de libélula (Odonata) sob condições laboratoriais. **Ensaios e Ciência**, v. 25, n. 2, p. 239-242, 2021.

SNYDER, W. E. Give predators a complement: Conserving natural enemy biodiversity to improve biocontrol. **Biological Control**, v. 135, p. 73-82, 2019.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. *In*: STILES, B.; ALAPE-GIRÓN, A., DUBREUIL, J.; MANDAL, M. (eds). **Microbial Toxins**. Springer, 2018, p. 1-13.

SOLIMAN, C.; EASTWOOD, S.; TRUONG, V. K.; RAMSLAND, P. A.; ELBOURNE, A. The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer. **PLoS One**, v. 14, e0224028, 2019

SOUZA, J. M.; SELEGHIM, A. R.; NUNES, G. S.; TRUZI, C. C.; VIEIRA, N. F.; BORTOLI, S. A. Predation of *Diatraea saccharalis* eggs and neonates by the earwig *Euborellia annulipes*. **Biological Control**, v. 172, p. 104953, 2022.

SPLITH, K.; NEUNDORF, I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. **European Biophysics Journal,** v. 40, p. 387–397, 2011.

STĄCZEK, S.; MALGORZATA, C.; ZDYBICKA-BARABAS, A. Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5753, 2023.

STEINHAGEN-THIESSEN, E.; STROES, E.; SORAN, H.; JOHNSON, C.; MOULIN, P.; LOTTI, G.; ZIBELLINI, M.; OSSENKOPPELE, B.; DIPPEL, M.; AVERNA, M. R.; GENIALL Investigators. The role of registries in rare genetic lipid disorders: Review and introduction of the first global registry in lipoprotein lipase deficiency. **Atherosclerosis**, v. 262, p. 146–153, 2017.

STENBERG, J. A.; BECHER, P. G.; JONSSON, M.; KARLSSON, M.; SUNDH, I.; VIKETOFT, M. Political deafness may impede transition to biological control. **Trends in Plant Science**, v. 28. n. 5, p. 498-500, 2023.

STENBERG, J. A.; SUNDH, I.; BECHER, P. G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A.; FRIBERG, H.; GIL, J. F.; JENSEN, D. F.; JONSSON, M.; KARLSSON, M.; KHALIL, S.; NINKOVIC, V.; REHERMANN, G.; VETUKURI, R. R.; VIKETOFT, M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, p. 665-676, 2021.

SUBEDI, B.; POUDEL, A.; ARYAL, S. The impact of climate change on insect pest biology and ecology: Implications for pest management strategies, crop production, and food security. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, p. 100733, 2023.

SUMNER, R. Influence of gregarines on growth in the mealworm. **Science**, v. 78, p. 125, 1933.

SUTTMANN, H.; RETZ, M.; PAULSEN, F.; HARDER, J.; ZWERGEL, U.; KAMRADT, J.; WULLICH, B.; UNTEREGGER, G.; STÖCKLE, M.; LEHMANN, J. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. **BMC Urology**, v. 8, n. 5, 2008.

TABUNOKI, H.; DITTMER, N. T.; GORMAN, M. J.; KANOST, M. R. Development of a new method for collecting hemolymph and measuring phenoloxidase activity in *Tribolium castaneum*. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 7, 2019.

TANG, C.; YANG, D.; LIAO, H.; SUN, H.; LIU, C.; WEI, L.; LI, F. Edible insects as a food source: a review. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 1, n. 8, 2019.

THAPA, R. K.; DIEP, D. B.; TONNESEN, H. H. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects. **Acta biomaterialia**, v.103, p.52–67, 2020.

TITLEY, M. A.; SNADDON, J. L.; TURNER, E. C. Scientific research on animal biodiversity is systematically biased towards vertebrates and temperate regions. **PLoS One**, v.12, n. 12, p.1-14, 2017.

TONK, M.; VILCINSKAS, A.; RAHNAMAEIAN, M. Insect antimicrobial peptides: Potential tools for the prevention of skin cancer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *v.* 100, 7397–7405, 2016.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; GONZÁLEZ-ROSALES, M. G.; MENDOZA, A. G.; ROBLES-JIMÉNEZ, L. E.; FRUTOS, P. Insects as alternative feed for ruminants: comparison of protein evaluation methods. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 21, 2022.

TORRES, M. D. T.; SOTHISELVAM, S.; LU, T. K.; FUENTE-NUNEZ, C. Peptide design principles for antimicrobial applications. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3547-3567, 2019.

VAN ALPHEN, B.; STEWART, S.; IWANASZKO, M.; XU, F.; LI, K.; ROZENFELD, S.; RAMAKRISHNAN, A.; ITOH, T. Q.; SISOBHAN, S.; QIN, Z.; LEAR, B. C.; ALLADA, R. Glial immune-related pathways mediate effects of closed head traumatic brain injury on behavior and lethality in *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 20, e3001456, 2022.

VAN ARNAM, E. B. RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; HORN, H.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Selvamicin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 113, p. 12940–12945, 2016.

VAN LENTEREN, J. C., BUENO, V. H. P., LUNA, M. G., COLMENAREZ, Y. C. **Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future**. Boston: CABI, 2017. 509 p.

VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; HELMERHORST, E. J.; AMERONGEN, A. V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 4, p. 597-619, 2001.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. **The role of yeasts as insect endosymbionts**. *In*: Blackwell M, Vega FE (eds) Insect-fungal associations: ecology and evolution. Oxford University Press, Oxford, 2005, pp. 211–243

VILCINSKAS, A. Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. (13), p.1240-5, 2011.

VILCINSKAS A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, v.59, n. 2, p.123-9. 2013.

VONKAVAARA, M.; PAVEL, S. T. I.; HÖLZL, K.; NORDFELTH, R.; SJÖSTEDT, A.; STÖVEN, S. *Francisella* is sensitive to insect antimicrobial peptides. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, p. 50–59, 2013.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**. v. 44, p.1087–1093, 2016.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, p.342–357, 2017.

WOJDA, I.; CYTRYŃSKA, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; KORDACZUK, J. **Insect Defense Proteins and Peptides**. *In*: Hoeger, U., Harris, J. (eds) Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. Subcellular Biochemistry, v. 94, Springer, 2020.

WÓJTOWICZ, A.; COMBRZYŃSKI, M.; BIERNACKA, B.; ONISZCZUK, T.; MITRUS, M.; RÓŻYŁO, R.; MITRUS, M.; RÓŻYŁO, R.; GANCARZ, M.; ONISZCZUK, A. Application of Edible Insect Flour as a Novel Ingredient in Fortified Snack Pellets: Processing Aspects and Physical Characteristics. **Processes**, v. 11, n. 9, p. 2561, 2023.

WOLZ, M.; RUECKERT, S.; MÜLLER, C. Fluctuating starvation conditions modify host-symbiont relationship between a leaf beetle and its newly identified gregarine species. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 850161, 2022.

XIE, S.; LAN, Y.; SUN, C.; SHAO, Y. Insect microbial symbionts as a novel source for biotechnology. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 35, n. 25, 2019.

XU, P.; LV, D.; WANG, X.; WANG, Y.; HOU, C.; GAO, K.; GUO, X. Inhibitory effects of *Bombyx mori* antimicrobial peptide cecropins on esophageal cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 887, p. 173434, 2020.

XU, T.; CUI, T.; PENG, L.; KONG, S.; ZOU, J.; TIAN, X. The anti-hepatocellular carcinoma activity of Mel-P15 is mediated by natural killer cells. **Oncology Letters**, v. 14, p.6901–6906, 2017.

YANG, J.; YANG, Y.; WU, W. M.; ZHAO, J.; JIANG, L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. **Environmental Science Technology**, v. 48, p.13776–13784, 2014.

YANG, L.; GAO, J.; LIU, Y.; ZHUANG, G.; PENG, X.; WU, W. M.; ZHUANG, X.; Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae): broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence. **Chemosphere,** v. 262,127818, 2021

YAO, Z.; CAI, Z.; MA, Q.; BAI, S.; WANG, Y.; ZHANG, P.; GUO, Q.;GU, J.; LEMAITRE, B.; ZHANG, H. Compartmentalized PGRP expression along the dipteran *Bactrocera dorsalis* gut forms a zone of protection for symbiotic bacteria. **Cell Reports**, v. 41, n. 3, 2022.

YEN, P. S.; JAMES, A.; LI, J. C.; CHEN, C. H.; FAILLOUX, A. B. Synthetic miRNAs induce dual arboviral-resistance phenotypes in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, v. 1, n.1, p. 11, 2018.

YI, L.; VAN BOEKEL, M. A.; BOEREN, S.; LAKEMOND, C. M. Protein identification and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor.* **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 8, p. 1285-1297, 2016.

YU, R.; WANG, M.; WANG, M.; HAN, L. Melittin suppresses growth and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via down-regulation of TGF-beta-mediated ERK signal pathway. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, e9017–e9025, 2020.

YUN, J. H.; ROH, S. W.; WHON, T. W.; JUNG, M. J.; KIM, M. S.; PARK, D. S.; YOON, C.; NAM, Y. D.; KIM, Y. J.; CHOI, J. H.; KIM, J. Y.; SHIN, N. R.; KIM, S. H.; LEE, W. J.; BAE, J. W. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p.5254-64, 2014.

ZAIDMAN-RÉMY, A.; VIGNERON, A.; WEISS, B. L.; HEDDI, A. What can a weevil teach a fly, and reciprocally? Interaction of host immune systems with endosymbionts in *Glossina* and *Sitophilus*. **BMC Microbiology**, v. 18, n.150, 2018.

ZHAI, Z.; HUANG, X.; YIN, Y. Beyond immunity: The Imd pathway as a coordinator of host defense, organismal physiology and behavior. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 83, p.51–59, 2018.

ZHANG, W.; CHEN, J.; KEYHANI, N. O.; JIN, K.; WEI, Q.; XIA, Y. Central nervous system responses of the oriental migratory, *Locusta migratoria* manilensis, to fungal infection. **Scientific Reports**, v. *7*, n. 10340, 2017.

ZHANG, W.; TETTAMANTI, G.; BASSAL, T.; HERYANTO, C.; ELEFTHERIANOS, I.; MOHAMED, A. Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. **Cellular signalling**, v. 83, p. 110003, 2021.

ZHANG, Z. J.; HUANG, M. F; QIU, L. F.; SONG, R. H.; ZHANG, Z. X.; DING, Y. W.; ZHOU, X.; ZHANG, X.; ZHENG, H. L. Diversity and functional analysis of Chinese bumblebee gut microbiota reveal the metabolic niche and antibiotic resistance variation of *Gilliamella*. **Insect Science**, v. 28, n. 2, p. 302-314, 2020

3.4

Andressa Domingos Polli
Elisa Parcero Hernandes
Luiz Fernando Cótica

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS E NANOPARTÍCULAS NA BIOTECNOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

A nanobiotecnologia é um campo interdisciplinar que combina a nanotecnologia e a biotecnologia, proporcionando uma série de avanços científicos e tecnológicos. Este campo envolve o design, a fabricação e a aplicação de nanomateriais e nanodispositivos para diversos propósitos biológicos e médicos. Utiliza técnicas da nanotecnologia, como síntese de nanopartículas, fabricação de nanoestruturas e manipulação em escala nanométrica, integrando-as com princípios e métodos biológicos (Malik *et al.*, 2023). Além disso, possibilita o desenvolvimento de novos nanomateriais e nanodispositivos com propriedades e funcionalidades únicas para aplicações biológicas, incluindo, mas não se limitando, ao uso de nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanofios e nanomembranas. Estes materiais são feitos de diversos componentes como metais, polímeros e biomoléculas, cada um com suas próprias vantagens e aplicações específicas (Malik *et al.*, 2023).

Considerando as aplicações médicas, a nanobiotecnologia possui um potencial significativo para o avanço da ciência médica e das práticas de saúde, oferecendo novas formas de diagnóstico e tratamento (Haleem *et al.*, 2023). Nanopartículas e nanocarreadores podem ser utilizados para a entrega direcionada de medicamentos, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo efeitos colaterais. Além disso, nanobiossensores podem ser desenvolvidos para a detecção e monitoramento *in vivo* e *in vitro* de biomoléculas, metabólitos e biomarcadores de doenças. Isso permite um monitoramento mais preciso e detalhado da saúde do paciente. Nanodispositivos podem ser projetados para imagem molecular, diagnósticos e intervenções terapêuticas em níveis celulares e subcelulares, ampliando as possibilidades de tratamento em nível microscópico (Haleem *et al.*, 2023).

A nanobiotecnologia pode atuar como um escudo para várias aplicações biomédicas, sendo muito útil para o organismo vivo

contra doenças como tumores ou câncer. O uso de várias bionanopartículas e nanomateriais para a entrega de medicamentos no local de ação, sob aplicação controlada de medicamentos desejados, pode ser utilizado para o tratamento de inúmeras doenças ou síndromes, proporcionando uma abordagem mais direcionada e eficaz. A biocompatibilidade e bioadaptabilidade dos nanomateriais usados são extremamente importantes e abrem caminho para pesquisas médicas mais precisas, utilizando nanotecnologia e biotecnologia. Isso pode resultar em tratamentos mais seguros e personalizados (Soni *et al.*, 2023).

Da mesma forma, a nanobiotecnologia oferece diversos benefícios potenciais ambientais. Nanomateriais e nanopartículas podem ser empregados para a remediação eficaz de água e solo, removendo contaminantes, metais pesados e poluentes de fontes de água e solos. Nanobiossensores podem ser desenvolvidos para a detecção e monitoramento de poluentes ambientais e substâncias tóxicas no meio ambiente, permitindo uma vigilância ambiental mais eficaz. A nanobiotecnologia pode viabilizar processos industriais mais eficientes e sustentáveis, processos enzimáticos e técnicas agrícolas, aprimorando métodos biotecnológicos tradicionais. Nanopartículas e nanomateriais podem ser utilizados para desenvolver tecnologias ecologicamente corretas e verdes para diversas aplicações, reduzindo o impacto ambiental dos processos convencionais, promovendo assim a sustentabilidade (Malik *et al.,* 2023).

É evidente a vasta gama de aplicações de nanomateriais e nanopartículas na biotecnologia para melhoria da vida e na preservação ambiental. Portanto, este capítulo explora essas possibilidades nos ramos da nanobiorremediação e da nanobiotecnologia aplicada à saúde, além de apresentar trabalhos relacionados a esta temática desenvolvidos junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental (PBA) da Universidade Estadual de Maringá. Através destas explorações, espera-se fornecer uma compreensão mais profunda das capacidades e potencialidades da nanobiotecnologia em diversas áreas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E EXEMPLIFICAÇÃO

Nanopartículas magnéticas de ferro zero-valente e magnetita são eficazes na rápida degradação de poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, em solos e águas contaminados (Kumari; Singh, 2016; Singh; Saxena, 2022). Além disso, nanopartículas como TiO_2 e cobre-PEI têm a capacidade de reduzir as meias-vidas de poluentes orgânicos específicos, aumentando a eficácia do processo de biorremediação. Outra aplicação inovadora das nanopartículas magnéticas é na imobilização de enzimas como peroxidases e lipases, que são utilizadas em diversas aplicações de biorremediação (Kumari; Singh, 2016).

Devido à sua alta área de superfície e capacidade de serem facilmente separadas magneticamente, as nanopartículas magnéticas possuem diversas aplicações significativas na biorremediação de poluentes ambientais. Elas podem adsorver e extrair seletivamente uma variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas residuais, incluindo corantes, fenóis, metais pesados, óleos e derivados, micotoxinas, pesticidas e produtos farmacêuticos, tanto de alimentos quanto do meio ambiente (Shukl *et al.*, 2021; Targuma *et al.*, 2021; Hidangmayum *et al.*, 2023). Essa capacidade proporciona uma alternativa mais ecológica, econômica e eficiente em comparação com os métodos de extração convencionais.

Nanopartículas de Fe_3O_4 são ferramentas versáteis e eficazes, capazes de extrair, degradar, imobilizar enzimas e microrganismos, aprimorar a fitorremediação e tratar águas residuais contaminadas com uma ampla gama de poluentes orgânicos e inorgânicos. Suas propriedades únicas e multifuncionais as tornam promissoras para o desenvolvimento de tecnologias de remediação que são eficientes, econômicas e ecologicamente corretas, contribuindo significativamente para a sustentabilidade ambiental (Bekhit et al., 2020; Rakhshaee; Ertegha, 2024).

A biorremediação desponta como uma das alternativas mais promissoras para a redução e/ou eliminação de poluentes, em especial quando utiliza microrganismos como agentes de biodegradação ou biotransformação dos compostos presentes no resíduo tóxico em formas inócuas que não ofereçam riscos de impacto ambiental. Os microrganismos podem realizar a biorremediação por meio de diferentes mecanismos, incluindo a bioconversão, a biodegradação e a biossorção. A bioconversão está associada ao importante mecanismo de economia circular e sustentável, no qual os resíduos podem ser transformados em produtos úteis, materiais bioativos e de valor agregado. Na biodegradação, a ação dos microrganismos resulta na quebra ou conversão de moléculas orgânicas complexas em formas mais simples, comumente utilizando diferentes processos enzimáticos. Já a biossorção está relacionada com o aprisionamento e acúmulo, envolvendo a absorção e/ou adsorção dos poluentes na biomassa devido à formação de ligações covalentes ou trocas iônicas. Quando utilizada a biomassa viva, podem ocorrer os três processos, e quando inativados, realizam apenas a biossorção (Akar *et al.*, 2006; Ning *et al.*, 2018; Navina *et al.*, 2024).

A utilização de microrganismos, como fungos e bactérias com reconhecida capacidade biorremediadora, em conjunto com a nanotecnologia vem sendo estudada de diferentes formas, tanto para a produção de nanomateriais quanto acerca da interação entre as células e as nanopartículas para obtenção de materiais biossorventes ou com capacidade de remoção e/ou degradação destes compostos xenobióticos (Prasad, 2018).

Nanopartículas em associação com microrganismos podem resultar na formação de nanobiocompósitos (NBCs), obtidos por meio da ligação destas à parede celular ou sua incorporação pelas células (Li *et al.*, 2015). A incorporação de microrganismos, como a bactéria *Rhodococcus erythropolis*, com nanopartículas magnéticas pode melhorar significativamente a degradação de poluentes (Kumari; Singh, 2016). Já o estudo de Ren *et al.* (2022) relata a associação

de esporos do fungo *Aspergillus niger* com nanopartículas magnéticas, obtendo um material com melhora na capacidade de biossorção utilizado para o tratamento de águas residuais industriais contaminadas com cromo (Cr(VI)), um metal pesado perigoso que é solúvel em água e muito prejudicial às células. Kori *et al.* (2024) também descreveram a associação da biomassa de *A. flavus* com nanopartículas de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$) e estrutura metal-orgânica de ZIF-67 (ZIF - zeólita imidazol), com alta capacidade de adsorção do antibiótico tetraciclina (THC) de soluções aquosas e águas residuais.

Além da associação e formação de nanobiocompósitos, os microrganismos também podem estar relacionados com a síntese de nanopartículas. Eshghi e Kashi (2022) relatam a síntese extracelular de nanopartículas de ferro (FeNPs), de tamanho de 20-70 nm com formato de losango, por uma cepa bacteriana hipertermófila tolerante ao ferro, identificada como *Bacillus zhangzhouensis*. As FeNPs obtidas foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio (Ca-Alg), formando esferas FeNPs/Ca-Alg com capacidade de descoloração e degradação completa do corante Vermelho ácido 88 (Acid Red 88) em 24h. Ainda, as FeNPs isoladas apresentaram atividade antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas e alta atividade anticancerígena contra artêmia (*Artemia salina*) com valor de CL50 de 0,5 μg/ml.

A nanobiotecnologia pode servir em diversas aplicações biomédicas, sendo especialmente eficaz no combate a doenças como tumores e câncer. Nanopartículas podem ser desenvolvidas para encapsular e direcionar medicamentos a locais específicos do corpo. Esses nanocarreadores aumentam a estabilidade dos medicamentos, permitem uma liberação controlada e uma entrega direcionada, diminuindo os efeitos colaterais e melhorando os resultados terapêuticos (Davis *et al.*, 2008; Farrokhzad; Langer, 2009).

Além de sua aplicação na administração de medicamentos, a nanotecnologia é fundamental em diagnósticos e imagens. *Probes* e

sensores em escala nanométrica permitem a detecção de biomarcadores e interações moleculares com alta sensibilidade e especificidade. Exemplos de nanomateriais utilizados em técnicas de imagem incluem pontos quânticos, nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas, que são empregados em métodos como imagem por fluorescência, ressonância magnética (MRI) e tomografia computadorizada (CT). Além disso, a nanotecnologia transformou o campo dos biossensores. Sensores em escala nanométrica conseguem detectar e quantificar biomoléculas, patógenos e poluentes ambientais com excelente sensibilidade. Nanobiossensores, como nanofios e nanotubos oferecem tempos de resposta rápidos, utilizam pequenos volumes de amostra e permitem monitoramento em tempo real (Eskandar, 2023).

Nanopartículas metálicas são extremamente pequenas (menos de 50 nm) e têm uma grande área superficial. Devido ao seu diminuto tamanho, conseguem penetrar nos capilares de tecidos e células. Sua ampla área de superfície e a possibilidade de modificar sua química superficial permitem que carreguem diversos medicamentos. Estas nanopartículas têm sido aplicadas na liberação controlada de fármacos para tratar câncer (Chandrakala *et al.*, 2022). As características de superfície das nanopartículas também influenciam o tempo de circulação no sangue (Sharma *et al.*, 2018). Após serem administradas, podem se ligar a proteínas séricas conhecidas como opsoninas, que incluem imunoglobulinas e proteínas do complemento, auxiliando os macrófagos a reconhecerem as nanopartículas. Assim, a opsonização é crucial para determinar se as nanopartículas permanecem no fluxo sanguíneo ou são fagocitadas pelos macrófagos. Portanto, modificar a superfície das nanopartículas é uma técnica eficiente para ajustar seu tempo de retenção no sangue. Apesar da intenção de que esses metais permaneçam inertes, pode haver bioacumulação e toxicidade (Medici *et al.*, 2021).

As nanopartículas metálicas podem ser fabricadas com diversos grupos funcionais químicos, permitindo sua ligação a anticorpos,

ligantes e medicamentos específicos. Isso resulta em uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, incluindo separação magnética, pré-concentração de analitos-alvo, entrega de medicamentos específicos e transportadores para terapia gênica (Wei *et al.*, 2019; Kaur, 2021; Liu *et al.*, 2021). Uma das principais vantagens das nanopartículas metálicas é sua capacidade de converter energia eficientemente em calor. Assim, algumas podem ser utilizadas na terapia de hipertermia para o tratamento de tumores, onde a energia térmica é gerada para melhorar a especificidade do tratamento. Compreender as propriedades físicas e químicas das nanopartículas inorgânicas é essencial para sua aplicação (Desai *et al.*, 2021).

3. MECANISMOS DE AÇÃO E METODOLOGIA

3.1 TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

Para compreender melhor as propriedades dos nanomateriais e garantir sua eficácia em aplicações biotecnológicas, várias técnicas de caracterização são empregadas. Dentre estas técnicas podemos citar:

– **Difração de Raios X (XRD)**: é uma técnica fundamental na caracterização de nanomateriais, utilizada para determinar a estrutura cristalina, o tamanho dos cristais e a composição de fases dos materiais. Ao incidir raios X sobre uma amostra, a interação desses raios com os átomos do material gera um padrão de difração que é característico da estrutura atômica do material analisado. Esse padrão, conhecido como

difratograma, consiste em picos de intensidade que correspondem às distâncias interplanares no cristal, permitindo a identificação de diferentes fases cristalinas presentes na amostra. A XRD é essencial para identificar a composição e pureza dos nanomateriais. Através da análise dos picos de difração, é possível determinar a presença de diferentes fases cristalinas e avaliar a porcentagem de cada uma delas na amostra. Além disso, a largura dos picos de difração pode ser usada para estimar o tamanho dos cristais, através da equação de Scherrer, que relaciona a largura dos picos à dimensão dos grãos cristalinos. Essa técnica é amplamente utilizada na ciência dos materiais, química, física e biologia, pois fornece informações detalhadas sobre a estrutura interna dos materiais sem a necessidade de preparações destrutivas. No contexto da nanobiotecnologia, a XRD é crucial para assegurar que os nanomateriais produzidos possuam as propriedades desejadas e que estejam livres de impurezas que possam comprometer sua eficácia em aplicações biomédicas e ambientais.

– **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**: é uma técnica avançada de obtenção de imagens que utiliza um feixe de elétrons para varrer a superfície de uma amostra, gerando imagens com alta resolução e grande profundidade de campo. Diferente da microscopia óptica, que utiliza luz visível, o MEV emprega elétrons devido ao seu menor comprimento de onda, permitindo uma maior resolução e a visualização de detalhes em escala nanométrica. No processo de obtenção das imagens, um feixe de elétrons é focado e direcionado para a superfície da amostra. Quando os elétrons interagem com os átomos da superfície, eles produzem vários sinais, incluindo elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios X característicos. Esses sinais são coletados por detectores específicos, que os convertem

em imagens detalhadas ou dados de composição química. A MEV é fundamental para observar a morfologia e topografia dos nanomateriais. As imagens geradas fornecem informações precisas sobre o tamanho, a forma e a distribuição das partículas ou estruturas analisadas. Além disso, a MEV pode ser utilizada para examinar a homogeneidade da amostra e detectar defeitos superficiais ou variações na estrutura. Uma das grandes vantagens da MEV é sua capacidade de fornecer imagens tridimensionais da superfície da amostra, permitindo uma análise mais completa e detalhada. Além disso, a combinação da MEV com espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) possibilita a análise composicional, identificando os elementos presentes na amostra e suas respectivas distribuições. Essas características tornam a MEV uma ferramenta indispensável em diversas áreas da ciência e engenharia, incluindo nanobiotecnologia, ciência dos materiais, física, química e biologia. No contexto da nanobiotecnologia, a MEV é crucial para a caracterização de nanomateriais, assegurando que eles possuam as propriedades desejadas para aplicações.

– **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**: é uma técnica poderosa e avançada que oferece imagens com resolução extremamente alta, muito superior à da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Ao contrário da MEV, que escaneia a superfície da amostra, a MET trabalha transmitindo um feixe de elétrons através de uma amostra ultrafina, geralmente com espessura de menos de 100 nanômetros. Essa transmissão de elétrons permite que a MET revele detalhes internos com precisão atômica, proporcionando uma visão profunda da estrutura e composição dos materiais em estudo. A MET é crucial para visualizar a organização atômica dos nanomateriais, revelando defeitos, impurezas, interfaces e outras características estruturais que não são aparentes

em outras técnicas de microscopia. A capacidade de resolução da MET pode alcançar até 0,1 nanômetros, permitindo a observação de átomos individuais e a análise detalhada de estruturas cristalinas. Além de suas aplicações em materiais inorgânicos, a MET desempenha um papel vital na pesquisa biológica e na patologia diagnóstica. É amplamente utilizada para estudar a morfologia das células, suas organelas e as interações entre componentes subcelulares. A MET é essencial para identificar e caracterizar vírus, bactérias, protozoários e fungos, proporcionando insights sobre suas estruturas internas que são fundamentais para o desenvolvimento de terapias e vacinas (Falcieri, 2013). No contexto da nanobiotecnologia, a MET é utilizada para investigar a biocompatibilidade e a internalização de nanomateriais em células, avaliar a distribuição de drogas em sistemas de entrega de medicamentos e estudar as interações entre nanomateriais e componentes biológicos em nível molecular. Essas análises são críticas para garantir a segurança e a eficácia dos nanomateriais em aplicações médicas e ambientais.

– **Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FT-IR)**: é uma técnica analítica amplamente utilizada para identificar grupos funcionais e ligações químicas em nanomateriais. A FT-IR mede a absorção de radiação infravermelha pela amostra, fornecendo um espectro que revela as características químicas e a composição molecular dos materiais. Diferentes ligações químicas na amostra absorvem diferentes comprimentos de onda da radiação infravermelha, resultando em um espectro de absorção característico. Este espectro é uma "impressão digital" única da amostra, permitindo a identificação de grupos funcionais específicos, como hidroxilas, carboxilas, aminas, entre outros. Essa técnica fornece informações detalhadas sobre a composição química e as interações

moleculares. É particularmente útil para verificar a presença de revestimentos superficiais ou modificações químicas em nanopartículas, além de monitorar reações químicas e processos de síntese. Além disso, a FT-IR é uma ferramenta não destrutiva, o que significa que as amostras podem ser analisadas sem sofrer danos significativos. Isso é crucial para estudos em que a integridade do material deve ser preservada para análises subsequentes. No campo da nanobiotecnologia, a FT-IR é amplamente utilizada para estudar interações biomoleculares, monitorar modificações superficiais de nanomateriais e verificar a funcionalização de nanopartículas destinadas a aplicações médicas e ambientais. A capacidade de identificar e quantificar grupos funcionais específicos torna a FT-IR uma técnica indispensável para o desenvolvimento e caracterização de nanomateriais avançados.

- **Magnetometria de Amostra Vibratória (*Vibrating Sample Magnetometer* - VSM):** é uma técnica analítica de alta sensibilidade utilizada para aferir as propriedades magnéticas de materiais ferromagnéticos, ferrimagnéticos, antiferromagnéticos, diamagnéticos e paramagnéticos. A amostra é submetida a um campo magnético externo, acarretando no alinhamento dos seus momentos magnéticos com o campo aplicado. Ao mesmo tempo a amostra é levada a vibrar periodicamente, perpendicularmente ao campo magnético, em uma frequência específica, que desloca os dipolos magnéticos do material, induzindo uma tensão elétrica. Esta, por sua vez, induz uma corrente em bobinas de captação, que é medida e analisada, fornecendo informações sobre as propriedades magnéticas da amostra, como a magnetização de saturação, a coercividade e a susceptibilidade magnética. Assim, esta técnica pode ser utilizada para caracterização das nanopartículas de Fe_3O_4 e também de nanomateriais, como os nanobiocompósitos.

Essas técnicas combinadas permitem uma caracterização abrangente dos nanomateriais, assegurando seu desempenho em aplicações biotecnológicas e facilitando a inovação em pesquisas biomédicas.

3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS E DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

Para explorar melhor as características únicas dos nanomateriais, é essencial a caracterização, preparação e avaliação da eficácia e interações biológicas. Frequentemente, a busca por novos biomateriais começa com trabalho experimental *in vitro* focado em testes de toxicidade e funcionais com linhas celulares específicas (ou microrganismos). Com base nos achados experimentais, esse trabalho frequentemente leva a investigações adicionais sobre componentes moleculares específicos, com o objetivo de identificar e confirmar o mecanismo de ação ou toxicidade:

– **Ensaios de Viabilidade Celular**: O ensaio de MTT é um teste quantitativo *in vitro* que mede a viabilidade celular. Ele baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente em mitocôndrias de células vivas, de reduzir o sal de tetrazólio MTT, que é amarelo, a cristais de formazan, que são roxos. A quantidade de formazan produzida correlaciona-se com o número de células vivas e metabolicamente ativas, permitindo assim a quantificação de células viáveis e mortas. O ensaio de MTT é considerado um método rápido e confiável para medir a viabilidade celular e a citotoxicidade (Mosmann, 1983; Kumar *et al.*, 2018). Outro ensaio utilizado na análise de viabilidade é o ensaio de captação de vermelho neutro, que fornece uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em uma cultura. É um dos testes de citotoxicidade mais utilizados, com muitas aplicações biomédicas e ambientais. Baseia-se na capacidade das células viáveis

de incorporar e ligar o corante vermelho neutro nos lisossomos. O procedimento é mais barato e mais sensível do que outros testes de citotoxicidade (sais de tetrazólio, vazamento de enzimas ou conteúdo proteico). Uma vez tratadas as células, o ensaio pode ser concluído em menos de 3 horas (Repetto *et al.*, 2008).

- **Citometria de Fluxo**: Dentro dos ensaios utilizados para avaliação da saúde das células, a citometria de fluxo é uma tecnologia que proporciona uma análise rápida e multiparamétrica de células individuais em solução. Os citômetros de fluxo utilizam lasers como fontes de luz para produzir sinais de luz espalhada e fluorescente que são lidos por detectores como fotodiodos ou tubos fotomultiplicadores. Esses sinais de luz são convertidos em sinais eletrônicos que são analisados por um computador e gravados em um arquivo de dados em formato padronizado. As populações celulares podem ser analisadas e/ou purificadas com base em suas características de fluorescência ou dispersão de luz. Uma variedade de reagentes fluorescentes é utilizada na citometria de fluxo, incluindo anticorpos conjugados com fluorescência, corantes de ligação a ácidos nucleicos, corantes de viabilidade, corantes indicadores de íons e proteínas fluorescentes de expressão. A citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa que tem aplicações em imunologia, biologia molecular, bacteriologia, virologia, biologia do câncer e monitoramento de doenças infecciosas. Nos últimos 30 anos, essa tecnologia tem visto avanços dramáticos, permitindo um nível de detalhe sem precedentes em estudos do sistema imunológico e outras áreas da biologia celular (McKinnon, 2018).

- **Indicadores Fluorescentes**: Um aspecto essencial quando se procura por alvos moleculares é a identificação de macromoléculas específicas como proteínas, lipídios ou ácido desoxirribonucleico (DNA) que são responsáveis ou têm

papeis fundamentais nas alterações observadas nos níveis de estresse oxidativo e funcional celular (Mitov *et al.*, 2016). Na literatura biomédica, existem relatos que afirmam que os radicais livres estão envolvidos em doenças humanas, incluindo aterosclerose, diabetes, pancreatite, inflamação e sepse, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e câncer (Barja, 2004; Chiurchiu; Maccarrone, 2011; Nigam, 2015; Singh *et al.*, 2015; Pourahmad *et al.*, 2016; Taghavi *et al.*, 2019). No entanto, ainda existem questões sem resposta, em particular, se os radicais livres causam ou são consequência das patologias humanas. Assim, é de interesse rastrear compostos suspeitos de serem potenciais indutores de estresse oxidativo. Nesse sentido, o uso de ensaios específicos para a detecção de radicais livres e/ou seus subprodutos é uma necessidade (Lautraite *et al.*, 2003). Dentro dos indicadores fluorescentes que podem avaliar o estado bioquímico na célula, há uma variedade que avalia diversos mecanismos metabólicos que podem estar relacionados a diferentes tipos de morte celular (Kepp *et al.*, 2011). Alguns podem ser utilizados em citometria de fluxo ou não.

4. APLICAÇÕES DE NANOMATERIAIS E NANOPARTÍCULAS

4.1 NANOBIORREMEDIAÇÃO

A rápida industrialização, urbanização e inovações tecnológicas ocorridas no século passado levaram a um aumento significativo da poluição ambiental. Entre os setores que passaram por grande expansão está a indústria têxtil, responsável por um elevado consumo de água e poluição com a liberação de corantes. Altas

concentrações de corantes têxteis em corpos d'água interferem no equilíbrio das comunidades biológicas aquáticas, impedindo a fotossíntese e sendo tóxicos, mutagênicos e cancerígenos, além de possuir potencial de acumulação no meio ambiente (Bulla *et al.*, 2017; Krishnamoorthy *et al.*, 2018). Corantes como o Reativo Preto 5 (Reactive Black 5, RB5) e o Vermelho do Congo são amplamente utilizados e classificados como azo corantes, sendo particularmente nocivos. Eles possuem amplo uso na fabricação de diversos produtos, como itens têxteis, papel, cosméticos, medicamentos, fotografias, alimentos e suplementos (El-Zawahry *et al.*, 2016).

Os processos de biorremediação emergem como alternativas promissoras para mitigar esses impactos, especialmente os que utilizam microrganismos. Por exemplo, o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, classificado como fungo da podridão branca (FPB), possui um potencial significativo para micorremediação devido às suas enzimas capazes de degradar diversos compostos, incluindo corantes têxteis. A combinação de FPB com nanotecnologia pode melhorar significativamente a eficiência desses processos. Fungos classificados como FPB produzem um conjunto de substâncias que os auxiliam em vários processos, incluindo a degradação de compostos. Essas substâncias podem ser enzimas oxidativas que permitem a degradação de madeira, com genomas normalmente contendo genes que codificam para glicosídeos hidrolases, esterases de carboidratos e polissacarídeos que quebram celulose, além de enzimas oxidativas que têm como alvo a lignina e celulose (Riley *et al.*, 2014; Couturier *et al.*, 2018).

O trabalho de Chaves *et al.* (2022) explorou a criação de nanobiocompósitos (NBC) utilizando nanopartículas de magnetita e o fungo *P. chrysosporium*, visando a biorremediação de corantes têxteis. Morfologicamente, o fungo *P. chrysosporium* que foi cultivado em meio de cultura BDA apresentou um aspecto aveludado devido ao entrelaçamento das hifas multicelulares segmentadas ou não, em forma tubular. Para a obtenção dos NBCs, foi adicionada uma

solução de nanopartículas de magnetita em Erlenmeyer contendo meio BD, no qual discos com micélio do fungo foram adicionados, incubando-se sob agitação rotacional. Após este processo, o nanobiocompósito NBC-Mag (*P. chrysosporium* com nanopartículas) foi obtido. Após a formação do NBC-Mag, foi possível observar macroscopicamente a diferença na coloração do micélio devido à presença das nanopartículas.

Para confirmar a presença das nanopartículas magnéticas, os micélios do fungo selvagem e do NBC-Mag foram submetidos à ação de campos magnéticos gerados por ímãs de Nd-Fe-B. O NBC-Mag foi atraído pelos ímãs, confirmando suas propriedades magnéticas, enquanto o fungo selvagem não foi atraído. Análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia (EDS) também confirmaram a presença de nanopartículas de Fe_3O_4 no NBC-Mag e sua ausência no fungo selvagem.

A partir da confirmação da formação do nanobiocompósito, testes de degradação dos corantes foram realizados. A análise espectrofotométrica foi usada para avaliar a biodegradação dos corantes ao longo de 1, 5, 10 e 15 dias. Os resultados mostraram um potencial positivo de descoloração para os corantes Vermelho do Congo e RB5, bem como para o mix de corantes. O NBC-Mag apresentou uma eficiência de descoloração superior em comparação ao fungo selvagem. Na sequência, foram realizados experimentos para avaliar a viabilidade e, após 15 dias, o fungo selvagem e o NBC-Mag foram repicados em meio de cultura BDA e incubados. Ambos mantiveram a viabilidade e características macromorfológicas.

Por fim, foram realizados testes de reuso do nanobiocompósito. Os micélios foram reutilizados com a mesma quantidade de corante, demonstrando que o NBC-Mag manteve suas propriedades de descoloração após o reuso, com eficiência comparável ao fungo selvagem. Em conclusão, os NBCs obtidos apresentaram alta

eficiência na descoloração de corantes têxteis. A combinação de *P. chrysosporium* e nanopartículas de magnetita resultou em um produto tecnologicamente viável para biorremediação, facilitado pela filtragem magnética. A viabilidade do fungo não foi comprometida, e os nanobiocompósitos mostraram potencial de reuso. Esses resultados indicaram que essa abordagem pode ser explorada em larga escala para resolver problemas de contaminação da água com corantes.

De modo similar, os basidiomicetos *Ganoderma lucidum* e *Pycnoporus sanguineus*, também classificados como FPB, foram utilizados em associação com nanopartículas de magnetita para obtenção de NBCs para descoloração destes mesmos corantes, RB5 e Vermelho do Congo, isolados e em mistura (Oliveira Junior, 2022). Como resultado, foram obtidas porcentagens de descoloração acima de 85% para os três tratamentos. Análises de MEV, EDS, MET e magnetização por amostra vibrante (VSM) foram utilizadas para avaliar a formação dos nanobiocompósitos, caracterizar suas propriedades magnéticas e verificar a presença de nanopartículas, que foram detectadas não apenas na parede celular dos fungos, mas também no interior das células.

Além da descoloração, também foi possível detectar a provável degradação dos componentes químicos através da técnica FT-IR, utilizada para identificar os grupos funcionais presentes no NBC, e dos testes de citotoxicidade e citometria de fluxo, que indicaram a degradação de moléculas tóxicas presentes nos corantes. Também foram obtidos resultados satisfatórios para reuso do material biológico, demonstrando a possibilidade de utilização em sucessivos ciclos de descoloração.

Polli *et al.* (2023) obtiveram com sucesso o NBC Af-Fe_3O_4 a partir de nanopartículas de magnetita associadas ao fungo endofítico *Aspergillus flavus* CL-7, apresentando significativa capacidade de descoloração do corante têxtil RB5 (96,1%) após 7 dias (processo patenteado junto ao INPI sob registro BR1020200149300) (Pamphile

et al., 2020). Este endófito, isolado de folhas sadias da planta *Chromolaena laevigata*, pertence à Coleção de Micro-organismos Endofíticos e Ambientais (CMEA/LBIOMIC-UEM) do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá, Brasil, e é considerado uma linhagem de *A. flavus* não-aflatoxigênica, com base em análises do perfil químico (Balbinot *et al.*, 2021).

O potencial dos endófitos, microrganismos que residem nos tecidos vegetais sem causar danos (como bactérias e fungos benéficos), já é conhecido e cada vez mais estudado na área de biorremediação e recuperação de ambientes contaminados, uma vez que podem produzir metabólitos secundários e enzimas capazes de transformar ou degradar diversas moléculas poluentes, orgânicas e inorgânicas, em compostos não tóxicos (Digra; Nonzom, 2024; Manganyi *et al.*, 2024). Fungos do gênero *Aspergillus* são conhecidos por apresentarem alto potencial de biorremediação de diferentes corantes, atuando com mecanismos de biossorção e biodegradação, com destaque para sua grande produção enzimática (Dinakarkumar *et al.*, 2024). Além disso, seus esporos apresentam superfície rugosa e pequeno diâmetro, o que permite uma boa interação com as nanopartículas, que podem revesti-los uniformemente para formação de NBCs (Ren *et al.*, 2022).

Neste estudo de Polli *et al.* (2023), também foi feita a caracterização do NBC, o que permitiu a observação das nanopartículas no interior das células e na superfície micelial (via análises de MEV, EDS e MET), não apresentando danos ou interferência no crescimento fúngico (Polli *et al.*, 2023), evidenciando sua interação com os componentes da parede celular, permeabilidade e baixa toxicidade (Cótica *et al.*, 2018). Ademais, a análise FT-IR confirmou a presença de ferro no NBC, e a análise por VSM demonstrou o comportamento superparamagnético do NBC Af-Fe_3O_4, o que poderia facilitar sua recuperação do meio após o processo de biorremediação.

O NBC Af-Fe_3O_4 manteve sua eficiência de descoloração mesmo após reutilização, demonstrando seu potencial de recuperação ambiental. Também apresentou redução positiva na toxicidade do corante em teste com sementes de alface (*Lactuca sativa*), permitindo seu crescimento semelhante ao controle, destacando sua promissora aplicação no tratamento de águas contaminadas.

O fungo endofítico *Bjerkandera* sp., isolado de folhas de *Mikania glomerata*, também foi utilizado para obtenção de um NBC associado a nanopartículas de magnetita para descoloração dos corantes têxteis RB5 e RB19 (Reactive Blue 19, Reativo Azul 19), com obtenção de 90% de descoloração após 30 dias de tratamento (processo patenteado junto ao INPI sob registro BR1020190262311) (Pamphile *et al.*, 2019).

Os resultados indicam que a combinação de microrganismos e nanopartículas, formando nanobiocompósitos, tem muito a contribuir para novos processos biotecnológicos. Além disso, vale apontar que os microrganismos também apresentam potencial na fabricação e biossíntese de nanomateriais e nanopartículas, como as baseadas em óxidos metálicos, trazendo novas abordagens ecologicamente corretas para em processos de nanobiorremediação e nanorremediação.

Fouda *et al.* (2021) descreveram a biossíntese e caracterização de nanopartículas de maghemita (γ-Fe_2O_3) utilizando metabólitos do fungo *Penicillium expansum*, que serviu como um biocatalisador para síntese verde destas nanopartículas. Foram avaliadas quanto a sua eficácia no tratamento de águas residuais de efluentes têxteis e de curtume, apresentando capacidade de descoloração e degradação do efluente têxtil bruto, obtendo acima de 89% de descoloração em 6h.

El-Sharkawy *et al.* (2022) realizaram a síntese verde de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 pelo aproveitamento das biomolécu-

las (exometabólitos) do fungo *A. tamarii*, com a posterior obtenção de esferas magnéticas de quitosana (MchiBs) a partir destas nanopartículas. Este material biossorvente mostrou-se eficiente na remoção de poluentes tóxicos perigosos de águas residuais têxteis, com alta taxa de descoloração. Utilizando também exometabólitos do fungo endofítico *Trichoderma asperellum*, El-Sharkawy *et al.* (2024) fabricaram nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4, com a otimização do bioprocesso M-nps usando Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e Rede Neural Artificial (RNA). Os autores obtiveram microesferas com alta eficiência adsortiva para o corante Verde Malaquita (acima de 84%), um contaminante comum de águas residuais.

4.2 NANOBIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

O câncer, uma das principais causas de morte no mundo, é uma doença invasiva e agressiva que muitas vezes requer quimioterapia, um tratamento associado a diversos efeitos adversos. Os avanços recentes na nanotecnologia têm possibilitado o desenvolvimento de nanopartículas que oferecem diversas abordagens para a entrega guiada de medicamentos e terapias no tratamento do câncer. Estudos recentes exploraram o uso dessas nanopartículas, em particular as de óxido de ferro que possuem propriedades magnéticas. As nanopartículas magnéticas (NPMs) permitem o controle de sua localização por meio de campos magnéticos, possibilitando a geração de hipertermia. Estas características tornam as NPMs ferramentas promissoras para aplicações em saúde, especialmente como nanocarreadores. As NPMs podem transportar drogas até locais específicos e retê-las pelo período desejado, o que diminui a quantidade de medicamento administrado, melhora os efeitos terapêuticos e reduz efeitos sistêmicos indesejáveis. Além disso, a geração de hipertermia pelas NPMs pode eliminar células tumorais através do aumento local controlado da temperatura.

O desenvolvimento de novas nanopartículas magnéticas visa criar tratamentos mais eficazes utilizando doses menores e com menos efeitos adversos. Essas nanopartículas são também exploradas em diagnósticos mais precisos e sensíveis, como agentes contrastantes de ressonância magnética. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, por exemplo, podem substituir agentes contrastantes baseados em metais pesados, reduzindo riscos de complicações para os pacientes.

O trabalho de Vieira *et al.* (2020) indicou que o ácido dicloroacético (DCA) possui ação antitumoral, mesmo em doses baixas, particularmente em pacientes em estágio terminal. A combinação de NPMs de magnetita (Fe_3O_4) com DCA pode potencialmente melhorar a eficiência dos tratamentos contra o câncer e reduzir os efeitos colaterais indesejáveis.

O DCA é usado há décadas para tratar diversas condições, incluindo diabetes tipo 2 e acidose láctica congênita. Sua ação antitumoral foi reportada em 2007, mostrando eficácia em reduzir a proliferação celular e induzir apoptose em células tumorais sem causar toxicidade em células normais. A funcionalização de NPMs com DCA pode direcionar a entrega do composto a locais específicos no organismo, potencialmente aumentando sua eficiência e reduzindo efeitos adversos.

A análise de citotoxicidade é fundamental para testar drogas e NPMs, medindo o potencial do composto em causar alterações celulares que promovam a morte celular. O estudo de Vieira (2020) investigou a biocompatibilidade e citotoxicidade de NPMs de magnetita funcionalizadas com DCA em culturas de células de câncer da linhagem MCF-7. Os resultados indicaram que a formulação NDCA apresentou eficácia similar ao DCA livre, com a síntese gerando nanopartículas superparamagnéticas de forma satisfatória.

Similarmente, nos estudos de Hernandes *et al.* (2022; 2023), nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) foram carregadas com doxorrubicina (Dox), um agente quimioterápico amplamente utilizado na quimioterapia, mas cujos efeitos colaterais sistêmicos limitam sua eficácia. A adição de fármacos em nanopartículas visa resolver esse problema, permitindo uma entrega mais precisa do fármaco diretamente ao tumor. As NPMs mostram-se altamente biocompatíveis e capazes de ser direcionadas especificamente para o local do tumor, aumentando a eficiência terapêutica e minimizando os efeitos adversos. Estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram a capacidade dessas nanopartículas em induzir morte celular significativa e reduzir o tamanho do tumor (González-Gómez *et al.*, 2019; Mushtaq *et al.*, 2022).

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro permitem a funcionalização da sua superfície com uma variedade de materiais que podem melhorar sua biocompatibilidade, estabilidade e interação com moléculas específicas. Essas alterações de superfície podem ser avaliadas através de técnicas de microscopia, espalhamento de luz dinâmica e transformada de Fourier. Foi possível fazer a funcionalização da Dox na superfície de duas NPMs, uma pura, sem recobrimento, e outra com uma cobertura de sílica. Foi observada uma maior concentração de Dox na superfície das NPMs puras, com uma eficiência de 85%, enquanto para as NPMs recobertas com sílica foi de 69%. Essas nanopartículas foram utilizadas para experimentos em modelo de cultura de células. Os resultados de ambos os estudos demonstraram o potencial significativo das nanopartículas magnéticas no tratamento do câncer. Os estudos de toxicidade mostraram a biocompatibilidade das NPMs puras e NPMs puras com Dox adicionada nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Estudos *in vitro* sugerem que há um menor dano celular para células normais (HaCaT) do que em células de origem tumoral. Testes feitos com as NPMs recobertas com sílica e também com adição de Dox demonstraram baixa toxicidade em culturas de células normais e efeitos de morte celular em células tumorais de mama.

O ensaio de integridade de membrana em células tumorais por citometria de fluxo também mostrou um aumento da alteração da integridade da membrana celular em NPMs com Dox em comparação com as NPMs puras. Além disso, imagens de microscopia eletrônica confirmam alterações de membrana para as células tumorais tratadas com NPMs e Dox, e é possível visualizar a presença de NPMs tanto no exterior como no interior das membranas celulares. Em seguida, as nanopartículas puras foram testadas em células de câncer de mama humano (MCF-7) e mostraram resultados promissores, induzindo estresse oxidativo nas células cancerosas, o que causou danos ao DNA, parada do ciclo celular e morte celular por apoptose. As nanopartículas também promoveram maior peroxidação lipídica e perda do potencial mitocondrial nas células MCF-7, resultando em uma morte celular mais eficiente comparada à forma livre do fármaco.

O trabalho de Endo (2020) utilizou quitosana como recobrimento para essas nanopartículas, um biopolímero eficaz na estabilização de dispersões coloidais de NPMs, conferindo-lhes maior biocompatibilidade e funcionalidade química. Neste estudo, NPMs de magnetita (Fe_3O_4) e magnetita recobertas com quitosana (CS-Fe_3O_4) foram caracterizadas por FT-IR e MET, e avaliadas quanto aos possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e morfológicos em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A), além da citotoxicidade em células imortalizadas de queratinócitos humanos (HaCat).

O ensaio de MTT, que mede a atividade mitocondrial celular como indicador de viabilidade celular, foi utilizado para investigar a citotoxicidade das NPMs. Linhagens celulares tumorais (MCF-7 e HepG2/C3A) e não tumorais (HaCat) foram expostas a Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 por 24 e 48 horas. Em MCF-7, não houve redução significativa na viabilidade celular com Fe_3O_4 por 24 horas. Após 48 horas, as maiores concentrações (25 e 50 µg/mL) mostraram-se citotóxicas (78,14% e 69,71% de viabilidade, respectivamente). Já com CS-Fe_3O_4,

não foi observada citotoxicidade em nenhum dos períodos de incubação. Em HepG2/C3A, Fe_3O_4 causou redução significativa na atividade metabólica em 25 e 50 µg/mL tanto em 24 quanto em 48 horas. Em contraste, CS-Fe_3O_4 não induziu citotoxicidade em HepG2/C3A em ambos os períodos. Em HaCat, não houve redução de viabilidade com Fe_3O_4 em 24 horas, mas após 48 horas, 50 µg/mL de Fe_3O_4 mostrou-se citotóxico (68,66% de viabilidade). Com CS-Fe_3O_4, não houve citotoxicidade em nenhum dos tempos de exposição.

A toxicidade das amostras Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 foi avaliada também pelo ensaio do vermelho neutro (VN), que verifica a integridade lisossomal. Os resultados indicaram que tanto para MCF-7 quanto para HepG2/C3A, as nanopartículas não apresentaram efeito citotóxico em nenhum período de exposição, tanto para Fe_3O_4 quanto para CS-Fe_3O_4.

A integridade da membrana celular foi avaliada em células de MCF-7 e HepG2/C3A expostas a Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 através do teste de exclusão pelo azul de tripan. Fe_3O_4 afetou a integridade da membrana apenas na maior concentração (50 µg/mL), enquanto CS-Fe_3O_4 não afetou a integridade da membrana em nenhuma concentração.

A captação de iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo também foi usada para avaliar a integridade da membrana plasmática em MCF-7 e HepG2/C3A tratadas com Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 por 48 horas. Fe_3O_4 mostrou aumento na intensidade de fluorescência de PI, indicando perda de integridade da membrana nas concentrações de 25 µg/mL para MCF-7 e 25 e 50 µg/mL para HepG2/C3A. CS-Fe_3O_4, por outro lado, não interferiu na integridade da membrana plasmática.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada em MCF-7 e HepG2/C3A expostas a Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 usando H2DCFDA. MCF-7 tratadas com H_2O_2 mostraram aumento de 314% na produção de EROs. Fe_3O_4 induziu aumentos de 111%, 112% e 137%, respectivamente, nas concentrações de 6,25, 25 e 50 µg/mL, enquanto CS-Fe_3O_4 resultou em aumentos menores de 81%,

99% e 105%. Em HepG2/C3A, H_2O_2 aumentou a produção de EROs em 548%, e Fe_3O_4 em 104%, 184% e 202%, respectivamente. Com CS-Fe_3O_4, os aumentos foram de 107%, 117% e 125%. Para avaliar mais profundamente a geração de EROs por essas nanopartículas foi realizado o teste da peroxidação lipídica, onde, células MCF-7 tratadas com Fe_3O_4 induziram aumentos de 120%, 123% e 143%, enquanto CS-Fe_3O_4 resultou em aumentos de 120%, 128% e 127%. Em HepG2/C3A, Fe_3O_4 aumentou em 94%, 157% e 127% os lipídeos peroxidados, respectivamente, e CS-Fe_3O_4 aumentou a peroxidação lipídica em 88%, 97% e 94%.

A genotoxicidade das NPMs foi avaliada pelo ensaio do cometa. Em MCF-7 e HepG2/C3A, Fe_3O_4 sem recobrimento aumentou significativamente o escore de danos nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. CS-Fe_3O_4 não mostrou diferença significativa nos danos ao DNA. A análise estrutural por MEV mostrou que as células MCF-7 e HepG2/C3A tratadas com Fe_3O_4 e CS-Fe_3O_4 mantiveram a morfologia semelhante ao controle. No entanto, Fe_3O_4 formou aglomerados próximos e em contato com a membrana celular, especialmente em 50 µg/mL, enquanto CS-Fe_3O_4 não apresentou aglomeração de nanopartículas (Endo *et al.*, 2020).

De forma conclusiva, as nanopartículas de magnetita se mostraram bons carreadores de fármacos e moléculas como DCA e doxorrubicina. Além disso, NPMs recobertas com quitosana mostraram uma redução significativa nos efeitos citotóxicos e genotóxicos quando comparadas às nanopartículas sem recobrimento. A quitosana aumentou a estabilidade das nanopartículas, modulou sua cinética, diminuiu a toxicidade geral e apresentou potencial para aplicações seguras em biomedicina. A funcionalização com quitosana possibilitou a liberação controlada de medicamentos, reduzindo os efeitos colaterais. Uma boa compatibilidade também foi observada para nanopartículas puras em baixas concentrações e nanopartículas recobertas com sílica, além da aplicação dessas nanopartículas funcionalizadas com quimioterápicos.

Para futuras aplicações dessas nanopartículas, são essenciais estudos de toxicidade *in vivo*, complementados por ensaios *in vitro*. Estudos recentes sugerem que nanopartículas magnéticas, especialmente de óxido de ferro, desempenham um papel promissor no tratamento do câncer. A combinação de direcionamento magnético, hipertermia e liberação controlada de fármacos abre uma nova fronteira no combate ao câncer, potencialmente levando a tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais. As nanopartículas magnéticas não só melhoram a entrega de medicamentos, mas também permitem terapias mais específicas e menos invasivas, representando um avanço significativo na biomedicina e na biotecnologia.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de nanopartículas magnéticas para biorremediação apresenta vários desafios que precisam ser enfrentados para processos de remediação eficazes e sustentáveis. A produção e funcionalização de nanopartículas magnéticas podem ser caras, especialmente quando se considera aplicações em larga escala na remediação ambiental. Métodos de síntese econômicos e processos de produção escaláveis precisam ser desenvolvidos para tornar a tecnologia mais acessível. Garantir a estabilidade das nanopartículas magnéticas em matrizes ambientais complexas é crucial para seu desempenho eficiente na remoção de poluentes. Fatores como agregação, oxidação de superfície e lixiviação de componentes tóxicos podem afetar a reutilizabilidade e a eficácia geral das nanopartículas. Alcançar a adsorção seletiva de poluentes-alvo enquanto se minimiza a interferência de outras substâncias no ambiente é um desafio significativo. Projetar nanopartículas magnéticas com grupos funcionais específicos para a remoção direcionada de poluentes sem afetar espécies não-alvo é crucial. Compreender o destino ambiental

das nanopartículas magnéticas após seu uso na biorremediação é essencial para avaliar quaisquer riscos ecológicos potenciais associados à sua liberação no meio ambiente. Estudos sobre seu comportamento a longo prazo, bioacumulação e potencial toxicidade são necessários para uma implantação segura. A transição de experimentos em escala laboratorial para aplicações em campo em larga escala apresenta desafios em termos de manutenção da eficiência e eficácia das nanopartículas magnéticas em condições ambientais reais. Garantir desempenho consistente e escalabilidade é crucial para a implementação prática. Abordar esses desafios através de pesquisa, inovação e colaboração será fundamental para desbloquear todo o potencial das nanopartículas magnéticas para biorremediação e avançar em práticas de remediação ambiental sustentável.

6. REFERÊNCIAS

AKAR, T.; DEMIR, T. A.; KIRAN, I.; OZCAN, A.; OZCAN, A. S.; TUNALI, S. Biosorption potential of *Neurospora crassa* cells for decolorization of Acid Red 57 (AR57) dye. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1100-1106, 2006.

BALBINOT, R. B.; OLIVEIRA, J. A. M.; BERNARDI, D. I.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; CABRAL, M. R. P.; ZANQUETA, E. B.; ENDO, E. H.; MENEGUELLO, J. E.; CARDOSO, R. F.; AZEVEDO, J. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, T. U.; CARMO, M. R. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; BALDOQUI, D. C. *Chromolaena laevigata* (Asteraceae) as a source of endophytic non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: chemical profile in different culture conditions and biological applications. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 52, n. 3, p. 1201-1214, 2021.

BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 595-600, 2004.

BEKHIT, F.; FARAG, S.; ATTIA, A. M. Decolorization and degradation of the Azo dye by bacterial cells coated with magnetic iron oxide nanoparticles. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management,** v. 14, p. 100376, 2020.

BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; KAVA, V.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebi*a sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 88, 2017.

CHANDRAKALA, V.; ARUNA, V.; ANGAJALA, G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: Current challenges and perspectives in drug delivery systems. **Emergent Materials**, v. 5, n. 6, p. 1593-1615, 2022.

CHAVES, T. O. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos associados ao fungo *Phanerochaete chrysosporium* com atividade na descoloração de corantes têxteis (Preto Reativo 5 e Vermelho do Congo).** 2022. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2022.

CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 9, p. 2605-2641, 2011.

CÓTICA, L. F.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; BINI, R. D.; CHAVES, T. O.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; PAMPHILE, J. A. Nanobiocomposites: Synthesis and Environmental Applications. In: PRASAD, R., KUMAR, V., KUMAR, M., WANG, S. (eds.). **Fungal Nanobionics:** Principles and Applications. Singapore: Springer, 2018. p. 1-19.

COUTURIER, M.; LADEVÈZE, S.; SULZENBACHER, G.; CIANO, L.; FANUEL, M.; MOREAU, C.; VILLARES, A.; CATHALA, B.; CHASPOUL, F.; FRANDSEN, K. E.; LABOUREL, A.; HERPOËL-GIMBERT, I.; GRISEL, S.; HAON, M.; LENFANT, N.; ROGNIAUX, H.; ROPARTZ, D.; DAVIES, G. J.; ROSSO, M. N.; WALTON, P. H.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J. G. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. **Nature Chemical Biology,** v. 14, n. 3, p. 306-310, 2018.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 771-782, 2008.

DESAI, N.; MOMIN, M.; KHAN, T.; GHARAT, S.; NINGTHOUJAM, R. S.; OMRI, A. Metallic nanoparticles as drug delivery system for the treatment of cancer. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 18, n. 9, p. 1261-1290, 2021.

DIGRA, S.; NONZOM, S. Bioremediation potential of endophytes: a promising tool. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2024.

DINAKARKUMAR, Y.; GNANASEKARAN, R.; REDDY, G. K.; VASU, V.; BALAMURUGAN, P.; MURALI, G. Fungal bioremediation: An overview of the mechanisms, applications and future perspectives. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, 2024. No prelo.

EL-SHARKAWY, R. M.; KHAIRY, M.; ZAKI, M. E. A.; ABBAS, M. H. A. Innovative optimization for maximum magnetic nanoparticles production by *Trichoderma asperellum* with evaluation of their antibacterial activity, and application in sustainable dye decolorization. **Environmental Technology & Innovation**, v. 35, p. 103660, 2024.

EL-SHARKAWY, R. M.; SWELIM, M. A.; HAMDY, G. B. *Aspergillus tamarii* mediated green synthesis of magnetic chitosan beads for sustainable remediation of wastewater contaminants. **Scientific Reports**, v. 12, p. 9742, 2022.

EL-ZAWAHRY, M. M.; ABDELGHAFFAR, F.; ABDELGHAFFAR REHAB, A.; HASSABO, A. G. Equilibrium and kinetic models on the adsorption of Reactive Black 5 from aqueous solution using *Eichhornia crassipes*/chitosan composite. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 507-515, 2016.

ENDO, K. M. **Avaliação da nanotoxicidade e atividade antitumoral de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com quitosana e funcionalizadas com doxorrubicina em linhagens celulares humanas tumoral (MCF-7, HepG2/C3A e 786-0) e não tumoral (HaCat) para aplicações biomédicas.** 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020.

ESHGHI, S.; KASHI, F. J. Bacterial synthesis of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles: Decolorization Acid Red 88 using FeNPs/Ca-Alg beads. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 104032, 2022.

ESKANDAR, K. Revolutionizing biotechnology and bioengineering: unleashing the power of innovation. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 10, n. 3, p. 81-88, 2023.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FOUDA, A.; HASSAN, S. E. D.; SAIED, E.; AZAB, M. S. An eco-friendly approach to textile and tannery wastewater treatment using maghemite nanoparticles (γ-Fe_2O_3-NPs) fabricated by *Penicillium expansum* strain (K-w). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104693, 2021.

GONZÁLEZ-GÓMEZ, M. A.; BELDERBOS, S.; YAÑEZ-VILAR, S.; PIÑEIRO, Y.; CLEEREN, F.; BORMANS, G.; DEROOSE, C. M.; GSELL, W.; HIMMELREICH, U.; RIVAS, J. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. **Nanomaterials**, v. 9, n. 11, p. 1626, 2019.

SUMÁRIO

HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R. P.; RAB, S.; SUMAN, R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. **Global Health Journal**, v. 7, n. 2, p. 70-77, 2023.

HERNANDES, E. P.; BINI, R. D.; ENDO, K. M.; DE OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; DE ALMEIDA, I. V.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; OLIVEIRA, P. N.; VICENTINI, V. E. P.; COTICA, L. F. Doxorubicin-loaded magnetic nanoparticles: enhancement of doxorubicin's effect on breast cancer cells (MCF-7). **Magnetochemistry,** v. 8, n. 10, p. 114, 2022.

HERNANDES, E. P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; BINI, R. D.; NAKAMURA, C. V.; CÓTICA, L. F.; DE OLIVEIRA SILVA LAUTENSCHLAGER, S. Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles induce oxidative stress and cell cycle arrest in breast cancer cells. **Antioxidants,** v. 12, n. 2, p. 237, 2023.

HIDANGMAYUM, A.; DEBNATH, A.; GURU, A.; SINGH, B. N.; UPADHYAY, S. K.; DWIVEDI, P. Mechanistic and recent updates in nano-bioremediation for developing green technology to alleviate agricultural contaminants. **International Journal of Environmental Science and Technology,** v. 20, p. 11693–11718, 2023.

KAUR, K.; REDDY, S.; BARATHE, P.; SHRIRAM, V.; ANAND, U.; PROĆKÓW, J.; KUMAR V. Combating drug-resistant bacteria using photothermally active nanomaterials: a perspective review. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 747019, 2021.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011.

KORI, A. K.; RAMAVANDI, B.; MAHMOODI, S. M. M.; JAVANMARDI, F. Magnetization and ZIF-67 modification of *Aspergillus flavus* biomass for tetracycline removal from aqueous solutions: A stable and efficient composite. **Environmental Researc**h, v. 252, part 2, p. 118931, 2024.

KRISHNAMOORTHY, R.; ARUL JOSE, P.; RANJITH, M.; ANANDHAM, R.; SUGANYA, K.; PRABHAKARAN, J.; THIYAGESHWARI, S.; JOHNSON, J.; GOPAL, N. O.; KUMUTHA, K. Decolourisation and degradation of azo dyes by mixed fungal culture consisted of *Dichotomomyces cejpii* MRCH 1-2 and *Phoma tropica* MRCH 1-3. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 588–595, 2018.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

KUMARI, B.; SINGH, D. P. A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. **Ecological Engineering,** v. 97, p. 98-105, 2016.

LAUTRAITE, S.; BIGOT-LASSERRE, D.; BARS, R. CARMICHAEL, N. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. **Toxicology in vitro**, v. 17, n. 2, p. 207-220, 2003.

LI, L., XU, M., CHUBIK, M., CHUBIK, M., GROMOV, A., WEI, G., HAN, W. Entrapment of radioactive uranium from wastewater by using fungus-Fe3O4 bio-nanocomposites. **RSC Advances**, v. 5, n. 52, 41611-41616, 2015.

LIU, Q.; KIM, Y. J.; IM, G. B.; ZHU, J.; WU, Y.; LIU, Y.; BHANG, S. H. Inorganic nanoparticles applied as functional therapeutics. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 12, p. 2008171, 2021.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. **Molecules**, v. 28, n. 18, p. 6624, 2023.

MANGANYI, M. C.; DIKOBE, T. B.; MASEME, M. R. Exploring the potential of endophytic microorganisms and nanoparticles for enhanced water remediation. **Molecules**, v. 29, n. 12, p. 2858, 2024.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: an overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1.1-5.1.11, 2018.

MEDICI, S.; PEANA, M.; PELUCELLI, A.; ZORODDU, M. A. An updated overview on metal nanoparticles toxicity. **Seminars in Cancer Biology,** v. 76, p. 17-26, 2021.

MITOV, M. I.; PATIL, V. S.; ALSTOTT, M. C.; DZIUBLA, T.; BUTTERFIELD, D. A. In vitro cellular assays for oxidative stress and biomaterial response. In: DZIUBLA, T.; BUTTERFIELD, D. A. (Eds.). **Oxidative Stress and Biomaterials**. Academic Press, 2016. p. 145-186.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods,** v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUSHTAQ, A.; TANG, Z.; HOU, Y.; ZHU, Z.; TIAN, C.; WU, Y.; LU, Y.; IQBAL, M. Z.; KONG, X. Biocompatible magnetic hydroxyapatite Fe_3O_4-HAp nanocomposites for T_1-magnetic resonance imaging guided photothermal therapy of breast cancer. **Materials Today Communications**, v. 31, p. 103734, 2022.

NAVINA, B. K.; VELMURUGAN, N. K.; KUMAR, P. S.; RANGASAMY, G.; PALANIVELU, J.; THAMARAI, P.; VICKRAM, A. S.; SARAVANAN, A.; SHAKOOR, A. Fungal bioremediation approaches for the removal of toxic pollutants: Mechanistic understanding for biorefinery applications. **Chemosphere**, v. 350, p. 141123, 2024.

NIGAM, D. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative disorders. In: RANI, V.; YADAV, U. (Eds). **Free radicals in human health and disease**, New Delhi: Springer, p. 143-158, 2015.

NING, C., QINGYUN, L., AIXING, T., WEI, S., YOUYAN, L. Decolorization of a variety of dyes by *Aspergillus flavus* A5p1. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 511–518, 2018.

OLIVEIRA JUNIOR, V. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos associados aos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Ganoderma lucidum*: aplicação e comparação no processo de descoloração dos corantes têxteis Preto Reativo 5 e Vermelho do Congo.** 2022. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2022.

PAMPHILE, J. A.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; SCHOFFEN, R. P.; GARCIA, A.; BINI, R. D.; AZEVEDO, J. L.; CÓTICA, L. F.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190262311, título: "Obtenção de nanobiocompósitos de magnetita associados ao fungo endofítico *Bjerkandera* sp. com atividade biorremediadora de corantes têxteis". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 11/12/2019.

PAMPHILE, J. A.; POLLI, A. D.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; RIBEIRO, M. A. S.; POLONIO, J. C.; ROSINI, B.; BINI, R. D.; GOLIAS, H. C.; CÓTICA, L. F.; PERALTA, R. M.; AZEVEDO, J. L. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200149300, título: "Processo de obtenção de nanobiocompósito de *Aspergillus flavus* endofítico e nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) com potencial de biorremediação de corante e sua reutilização". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/07/2020.

POLLI, A. D.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; RIBEIRO, M. A. S.; POLONIO, J. C.; ROSINI, B.; OLIVEIRA, J. A. S.; BINI, R. D.; GOLIAS, H. C.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; ORLANDELLI, R. C.; VICENTINI, V. E. P.; CÓTICA, L. F.; PERALTA, R. M.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Synthesis, characterization, and reusability of novel nanobiocomposite of endophytic fungus *Aspergillus flavus* and magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) with dye bioremediation potential. **Chemosphere**, v. 340, p. 139956, 2023.

POURAHMAD, J.; SALIMI, A.; SEYDI, E. Role of oxygen free radicals in cancer development and treatment. In: AHMAD, R. (Eds.) **Free radicals and diseases**. IntechOpen, 2016.

PRASAD, R. (ed.). **Mycoremediation and environmental sustainability**, v. 2. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2018. ISBN 978-3-319-77386-5.

SUMÁRIO

RAKHSHAEE, R.; ERTEGHA, N. Multifold increase in dye adsorption by nanoparticles of a nanobiocomposite through its controlled simultaneous synthesis with simultaneous adsorption and photodegradation. **Applied Water Science**, v. 14, p. 63, 2024.

REN, B.; SONG, X.; ZHAO, L.; JIN, Y.; BAI, S.; CUI, C.; WANG, J. Water-based Fe_3O_4 magnetic fluid-coated *Aspergillus niger* spores for treating liquid contaminated with Cr(VI). **Environmental Research,** v. 212, p. 113327, 2022.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols,** v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RILEY, R.; SALAMOV, A. A.; BROWN, D. W.; NAGY, L. G.; FLOUDAS, D.; HELD, B. H.; LEVASSEUR, A.; LOMBARD, V.; MORIN, E.; OTILLAR, R.; LINDQUIST, E. A.; SUN, H.; LABUTTI, K. M.; SCHMUTZ, J.; JABBOUR, D.; LUO, H.; BAKER, S. E.; PISABARRO, A. G.; WALTON, J. D.; BLANCHETTE, R. A.; HENRISSAT, B.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; HIBBETT, D. S.; GRIGORIEV, I. V. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, pg. 9923-9928, 2014.

SHARMA, A.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting,** v. 26, n. 8, p. 617-632, 2018.

SHUKL, S.; KHAN, R.; DAVEREY, A. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles, and their applications in wastewater treatment: A review. **Environmental Technology & Innovation,** v. 24, p. 101924, 2021.

SINGH, R.; DEVI, S.; GOLLEN, R. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 31, n. 2, p. 113-126, 2015.

SINGH, Y.; SAXENA, M. K. Insights into the recent advances in nano-bioremediation of pesticides from the contaminated soil. **Frontiers in Microbiology,** v. 13, p. 982611, 2022.

SONI, A.; BHANDARI, M. P.; TRIPATHI, G. K.; BUNDELA, P.; KHIRIYA, P. K.; KHARE, P. S.; KASHYAP, M. K.; DEY, A.; VELLINGIRI, B.; SUNDARAMURTHY, S.; SURESH, A.; DE LA LASTRA, J. M. P. Nano-biotechnology in tumour and cancerous disease: A perspective review. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 27, n. 6, p. 737-762, 2023.

TAGHAVI, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Free radicals, diabetes, and its complexities. In: OZTURK, M., HAKEEM, K. (eds). **Plant and Human Health, Volume 2: Phytochemistry and Molecular Aspects**, p. 1-41, 2019.

TARGUMA, S.; NJOBEH, P. B.; NDUNGU, P. G. Current Applications of Magnetic Nanomaterials for Extraction of Mycotoxins, Pesticides, and Pharmaceuticals in Food Commodities. **Molecules,** v. 26, n. 14, p. 4284, 2021.

VIEIRA, R. R. **A citotoxicidade de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ácido dicloroacético em células tumorais.** 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020.

WEI, W.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; WEI, G.; SU, Z. Biomedical and bioactive engineered nanomaterials for targeted tumor photothermal therapy: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109891, 2019.

3.5

Layon Zafra Lemos
Arildo José Braz de Oliveira
Eduardo César Meurer
Raquel Guttierres Gomes

BIOTECNOLOGIA E QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E PROSPECÇÃO NA AGRICULTURA, ALIMENTOS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção auxilia na extração e obtenção de diversos compostos químicos encontrados em organismos vivos, como os compostos fenólicos, peptídeos, carbamatos, frutanos e metabólitos de microrganismos, e são utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, na agricultura, na saúde e no meio ambiente.

Os compostos fenólicos são quimicamente compostos por um ou mais anéis aromáticos conjugados e um ou mais grupos de hidroxila nos carbonos sp2 dos anéis aromáticos, são produzidos pelas plantas e conhecidos pelo poder antioxidante. A finalidade destes antioxidantes é promover a eliminação dos radicais livres que podem ser gerados pelo acúmulo de diversos poluentes químicos, que desencadeiam danos celulares a níveis genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos, contribuindo para a propagação de diversas patologias humanas. Portanto, diversos estudos têm demonstrado o potencial benéfico dos antioxidantes para a saúde humana, com efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes e ações neuroprotetoras nas células, auxiliando na prevenção de doenças crônicas (Skrovankova *et al*., 2015; Carmago *et al*., 2020; Talebi *et al*., 2021).

Os compostos peptídicos são quimicamente constituídos de sequências de aminoácidos essenciais e não essenciais encontrados em alimentos de origem animal, vegetal e microorganismos. Nos dias de hoje, esses compostos são utilizados em muitas aplicações na saúde humana, com atividades antimicrobianas, anti-hipertensivas, antioxidantes, efeito na diminuição de lipídios no sangue, efeito como opioides, antiobesidade, ligação com minerais, efeitos antidiabéticos e antienvelhecimento. As indústrias alimentícia e farmacêutica obtêm esses compostos bioativos por meio de hidrólise enzimática, fermentação microbiana, síntese química de peptídeos e produção de compostos recombinantes, todos utilizados em benefício à saúde humana e ao meio ambiente (Akbarian *et al.,* 2022).

Os carbamatos são os compostos químicos derivados do ácido carbâmico que possuem extremidades amino e carboxila e são identificados pela presença da ligação -O-CO-NH-. Esses compostos são amplamente utilizados na indústria, medicina e na composição de diversos agroquímicos (inseticidas, fungicidas e herbicidas), sendo também utilizados como matéria-prima na produção de tintas, poliuretanos e aminas protetoras em diversas substâncias orgânicas presentes nos compostos químicos (Chaturvedi, 2012; Ghosh; Brindisi, 2020). O carbamato de etila é um subproduto indesejado da fermentação alcoólica, pois suspeita-se de ser cancerígeno, assim seu controle é muito importante em produtos fermentados (Ribeiro *et al.,* 2019; Bueno *et al.,* 2020; Tonin *et al*., 2022).

Polímeros naturais como os frutanos são carboidratos denominados de frutose, encontrados em várias plantas e micróbios. Existem dois tipos desses carboidratos, sendo os frutanos do tipo inulina que são encontrados nos sistemas vegetais como carboidratos que armazenam energia em várias plantas, e os levanos encontrados em micróbios que formam a matriz exopolissacarídica, ambos são sintetizados por sistemas enzimáticos desempenhando o mesmo papel na resistência ao estresse das plantas e células bacterianas (Ko *et al*., 2022). Desta forma, os frutanos possuem uma ampla aplicabilidade nas indústrias alimentícia, cosmética, medicinal e farmacêutica devido às suas propriedades físico-químicas como solubilidade em água, biocompatibilidade, formação de gel, produção de probióticos, efeitos fisiológicos como propriedades imunomoduladoras e antioxidantes (Srikanth *et al*., 2015; Ni *et al*., 2019).

Além dos compostos químicos listados acima, o processo de bioprospecção também utiliza metabólitos microbianos, incluindo metabólitos de fungos endofíticos, que possuem muitas propriedades bioativas destacando sua utilidade como atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas em humanos (Zhang *et al.,* 2022).

Diante do exposto, este capítulo descreve as principais moléculas e técnicas utilizadas na biotecnologia, química de produtos naturais, prospecção e que podem ser utilizadas na agricultura, alimentação, saúde e meio ambiente.

2. BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

2.1 BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO LC-MS/MS

Os estudos que exploram o potencial químico e biológico dos compostos derivados de fontes naturais são de interesse muito grande para o desenvolvimento da humanidade e sua sustentabilidade. Dentre várias aplicações efetivas destacam-se a área da agricultura, alimentos, saúde e meio ambiente, evidenciando sua relevância científica desta linha (Sabotic *et al.*, 2024). Técnicas inovadoras de extração, como a assistida por ultrassom, líquidos eutéticos (Pandiselvam *et al.,* 2024) e uso de fluido supercrítico (Silva *et al.*, 2023), têm sido otimizadas para maximizar a eficácia na recuperação desses compostos, destacando-se pela eficiência e sustentabilidade. A valorização de subprodutos industriais e agrícolas e o aproveitamento de recursos naturais ressaltam a importância dessas pesquisas para o desenvolvimento de produtos com atividades antioxidantes, antinociceptivas e anti-inflamatórias, contribuindo significativamente para o avanço científico na área de bioativos.

Os compostos fenólicos são uma classe de substâncias químicas amplamente distribuídas no reino vegetal (Cheynier, 2012) e tem como base o grupo funcional fenol com um anel aromático ligado

a uma hidroxila. Eles são mais conhecidos por suas propriedades antioxidantes e por desempenharem um papel importante na defesa das plantas contra patógenos e na adaptação a condições ambientais adversas. Os compostos fenólicos têm uma ampla variedade de estruturas, desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até polímeros complexos, como os taninos. Além de suas funções ecológicas, os compostos fenólicos também são estudados por seus potenciais benefícios à saúde humana, incluindo atividades anti-inflamatórias, antivirais, anticancerígenas, e por contribuírem para a prevenção de doenças crônicas (Shahidi; Ambigaipalan, 2015).

A bioprospecção de compostos fenólicos não só visa a identificação, extração e exploração desses compostos para aplicações na medicina, farmacologia e indústria de alimentos, mas também desempenha um papel crucial na proteção do meio ambiente. Isso se deve ao fato de que a bioprospecção incentiva a pesquisa e a utilização sustentável da biodiversidade, contribuindo para a conservação das espécies e dos ecossistemas naturais. Além disso, o uso desses compostos naturais pode diminuir a dependência de produtos químicos sintéticos, muitas vezes prejudiciais ao meio ambiente.

Dentre as técnicas de bioprospecção de compostos fenólicos uma que se destaca é a Espectrometria de Massas (Meurer, 2020) que tem a capacidade de analisar muitos compostos de uma só vez de forma qualitativa ou quantitativa. Porém, para uma análise por Espectrometria de Massas adequada, é necessário fazer um preparo adequado da amostra para evitar supressão iônica, instabilidade de sinal e *carry over*, devido de forma grosseira a problemas de solubilidade. Outra problemática é a sintonia adequada do sistema de LC-MS/MS, ou seja, Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa e as boas práticas de injeção de amostras visando verificar repetibilidade e reprodutibilidade.

Quando aplicado os Métodos de LC-MS/MS em vegetais, como no caso de fenólicos em gengibre, vale destacar que para maior entendimento o processo de forma simplificada, consta dos sinais obtidos por monitoramento de reações selecionadas ("Selected Reaction Monitoring", SRM) de compostos fenólicos obtidos da literatura e otimizados para o extrato, rodando as análises em um espectrômetro de massas triplo quadrupolar. No caso foram utilizados canais de MRM de 24 compostos fenólicos de interesse. O equipamento quadrupolar é considerado por especialistas muito robusto e foi utilizada a fonte de ionização por spray eletrolítico ("electrospray", ESI) que permite ionizar os compostos fenólicos por perda de próton [M-H]-, onde depois são selecionados e monitorados os fragmentos seletivos para cada composto fenólico. A fase móvel da análise consta com uma solução de metanol e hidróxido de amônio, e o extrato de gengibre foi cuidadosamente preparado e diluído antes da injeção no equipamento para a análise final. Os dados foram analisados com um software especializado, proporcionando informações precisas sobre os compostos fenólicos presentes no extrato.

Dos 24 compostos fenólicos avaliados foram encontrados 9 representantes no extrato, apresentando sinais consistentes, incluindo dois compostos principais mais intensos nomeados de 6-Gingerol e 8-Shogaol. Além desses, foram identificados outros compostos sob diferentes condições de análise, como o ácido ferúlico e mais seis compostos, incluindo ácido málico e ácido gálico, porém o 6-Gingerol se destacou como o composto mais predominante no extrato (Nardino *et al*., 2024).

O estudo de fenólicos e esteróis em folhas de *Pereskia aculeata Miller* conhecida popularmente como ora-pro-nobis, para o preparo da amostra uma alíquota de 100 μL do extrato foi diluída em 900 μL de uma solução contendo 0,1% de metanol e NH4OH. Utilizou-se um espectrômetro de massa de quadrupolo triplo Premier XE, equipado com ionização por electrospray (ESI) operando em

modo negativo. Os dados foram coletados sob parâmetros específicos, incluindo temperaturas controladas da fonte e da desolvatação, além de ajustes de tensão no capilar e no cone. A fragmentação das moléculas foi realizada com energia de colisão variável e a análise dos espectros foi feita com um software especializado. Foram identificados 31 compostos de diversas classes químicas e fenólicos nos extratos de *P. aculeata*, utilizando a técnicas de LC-MS/MS. O uso de etanol como solvente na extração possibilitou a identificação de um maior número de compostos. Entre eles, foram detectados vitamina E, γ-sitosterol, campesterol, fitol, ácido oleico, éster eicosil, octadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil) e esqualeno, mircetina, ácido ferulico e sinapina (Carnevalli *et al*., 2022; Carnevalli *et al.,* 2023).

O estudo dos fenólicos no extrato de sementes de Maracujá foi otimizado pelos métodos maceração e ultrassom e diluídos em metanol de grau HPLC contendo 0,1% de hidróxido de amônio. Espectros de massa no modo de varredura completa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa tandem Premier XE, equipado com fonte de ionização por electrospray e analisador de triplo quadrupolar. Foram ajustados parâmetros específicos para a fonte ESI(-) e posteriormente utilizou-se um software especializado para a aquisição de dados. Foram utilizadas duas condições para o espectrômetro de massas tanto para fonte como para energia de colisão. Nos extratos otimizados por maceração e ultrassom foram analisados 46 compostos fenólicos, sendo o piceatanol um importante estilbeno identificado em ambos os extratos, juntamente com outros compostos como catequina, ácido clorogênico, ácido gálico, quercetina-3-O-hexosídeo e resveratrol, destacando a rica composição fenólica e potencial antioxidante desses extratos (Santos *et al*., 2023).

Em cascas de uva os fenólicos encontrados em seu extrato são ricos em compostos fenólicos dos tipos antocianinas, flavonóis, flavan-3-óis, ácidos cinâmico, benzóico e elágico e estilbenos

e podem ser identificados por DI-MS/MS. As cascas úmidas (50,0 g) foram submetidas à turbo-extração por 1 minuto com 250 mL de solução hidroetanólica acidificada (1:1 V/V) contendo 0,1% de HCl, seguida por ultrassonificação a uma temperatura controlada (máximo 25 °C) e protegida da luz por 1 hora. O extrato foi filtrado e o processo de extração repetido. O solvente foi removido por um evaporador rotativo a 45 °C e o extrato concentrado foi mantido no freezer a -4 °C, protegido da luz até o uso. Os compostos químicos presentes no extrato de *Vitis labrusca* foram identificados usando um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo com ionização por electrospray (Carra *et al.,* 2022; Silva *et al*., 2022).

A preparação da amostra envolve a dissolução, sonicação, centrifugação e filtração do extrato, seguida de diluição em metanol. A análise foi realizada em modos de ionização positivo e negativo, ajustando-se os parâmetros operacionais do equipamento e utilizando soluções específicas para cada modo. Os parâmetros de análise incluíram fluxo de gás argônio, temperatura de desolvatação, voltagens do capilar e do cone, entre outros, para monitoramento de reações múltiplas. No extrato bruto das cascas da uva foram identificados 14 compostos, incluindo apigenina-7-glucosídeo e luteolina-7-glucosídeo, entre outros, destacando-se pela análise em modo negativo. No modo positivo, foram identificados compostos como peonidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo, entre outros, utilizando ESI-MS/MS e o método de monitoramento de reações múltiplas (Carra *et al.,* 2022; Silva *et al*., 2022).

A análise dos espectros de massas dos fenólicos do aspargo foi realizada tanto para o extrato convencional quanto para as amostras extraídas com água subcrítica, utilizando um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo com ionização por electrospray. As condições para a extração subcrítica foram definidas em 100 bar por 60 minutos, em todas as temperaturas. Os extratos foram normalizados, diluídos em metanol e injetados diretamente no espectrômetro.

Todas as análises foram realizadas em modo negativo com aquisição por SRM. A análise em modo ESI-MRM por injeção direta, utilizando canais pré-definidos na literatura identificou os compostos (entre eles fenólicos) ácido málico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido azelaico, ácido quínico, ácido ferúlico, ácido glucônico, glicerol feruloil, hexose cafeoil, isômero hexose feruloil e glicerol dicumarilo. De modo geral, ao comparar a extração convencional com as condições ótimas de extração antioxidante usando água subcrítica (160 °C), a maioria dos compostos presentes na condição convencional também foi identificada, sugerindo que as altas temperaturas do processo não degradam tais compostos. A técnica não permite identificar as quantidades em cada amostra, então, embora certos compostos não tenham sido detectados em algumas temperaturas, eles podem estar presentes em quantidades mínimas que o equipamento não consegue detectar (Iwassa *et al*., 2019).

2.2 ANÁLISES DE ANTOCIANIDINAS POR ESI-MS/MS

Os flavonoides chamados de antocianidinas são pigmentos naturais importantes, estudados como substitutos para corantes azo na indústria alimentícia, e usados como indicadores de qualidade em várias frutas. Destacam-se pelas suas atividades farmacológicas e podem ter estabilidade aumentada por reações de acetilação. O interesse industrial nesses compostos motiva estudos sobre suas características estruturais para desenvolver métodos rápidos de análise em matrizes vegetais complexas (Kammerer, 2024).

A espectrometria de massas com ionização por electrospray tem sido essencial para análises de antocianinas, incluindo estudos de fragmentação, ainda pouco explorados. Pesquisas recentes sobre fragmentação de produtos naturais, abrangendo diversas classes orgânicas reforçam a importância dessa técnica para a elucidação estrutural e caracterização de produtos tanto sintéticos quanto naturais (Machado *et al.*, 2024).

Com a necessidade de se desenvolver metodologias analíticas mais rápidas e sensíveis para determinar concentrações de compostos antioxidantes, principalmente em frutas, que são amostras complexas, buscou-se utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa. Com essa técnica foi possível desenvolver um método simples e rápido, priorizando processos com redução ou eliminação de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, desenvolvemos e validamos um método rápido para determinar três tipos diferentes de antocianidinas (UPLC-MS/MS) (Poliseli *et al*., 2018).

Para o estudo estrutural de antocianinas por espectrometria de massas os dados de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS foram obtidos usando um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Premier XE, operando em modo de íon positivo. Os principais parâmetros da fonte ESI(+) incluíram uma voltagem de capilar de 4,5 kV e uma voltagem de cone de 70 V. Experimentos de MS/MS foram realizados com energia de colisão de 30 V para cianidina, delphinidina e pelargonina, sob pressão de argônio de 1×10^{-3} Torr. Experimentos de troca de hidrogênio/deutério (H/D) foram conduzidos dissolvendo as antocianidinas diretamente em metanol-d4 (99% D). As energias totais das geometrias otimizadas, sem restrições de simetria foram obtidas por cálculos DFT no nível teórico B3LYP/6-311+G**, utilizando o software SPARTAN14.

Os experimentos de MS/MS com antocianidinas e antocianidinas deuteradas foram realizados para fragmentar os cátions O-2-fenilbenzopirílio e propor mecanismos confiáveis de fragmentação. Com base em cálculos *ab initio* e experimentos H/D, foram sugeridos caminhos de fragmentação que envolvem múltiplas perdas de CO, seguidas por água, rearranjos RDA e de hidrogênio, que podem ser utilizados como varredura de perda neutra. Também foram propostos mecanismos de fragmentação para os cátions m/z 69 e m/z 121, que podem ser usados como varredura de íon precursor.

Assim, uma variedade de íons e perdas neutras pode ser usada para confirmar e prospectar antocianinas e antocianidinas em extratos de plantas.

Utilizando a Análise de Berries com os frutos maduros de *Morus nigra* L. (amora-preta), *Prunus avium* L. (cereja), *Rubus idaeus* L. (framboesa), *Solanum americanum* Mill. (erva-moura), *Vaccinium myrtillus* L. (mirtilo) e *Vitis vinifera* L. (uvas), após a higienização e homogeneização, os sucos obtidos foram filtrados e o pH de cada extrato foi medido, sendo aproximadamente de 3 para todas as amostras devido aos compostos ácidos presentes nas frutas e grau de maturação. Os extratos foram injetados em um sistema UPLC acoplado a um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo com fonte de ionização por electrospray, utilizando fases móveis acidificadas com ácido fórmico e uma coluna UPLC BEH C18 para separação, com eluição em modo isocrático (Vagula *et al.,* 2018).

2.3 BIOPROSPECÇÃO DE DI- E TRIPEPTÍDEOS DE RESÍDUOS PROTEICOS ATRAVÉS DE HIDRÓLISE

A bioprospecção de di- e tripeptídeos a partir de resíduos proteicos por meio de hidrólise representa uma abordagem inovadora no aproveitamento de subprodutos da agroindústria. Esta técnica envolve normalmente a quebra enzimática de proteínas em fragmentos menores, que podem ter aplicações valiosas em diversas áreas, como na nutrição, farmacêutica e de cosméticos, devido às suas propriedades biológicas específicas. Além de contribuir para a sustentabilidade ao reduzir o desperdício, esse processo pode gerar compostos bioativos com alto valor agregado (Dong *et al*., 2024).

Os métodos de hidrólise alcalina, ácida e enzimática são técnicas eficazes para quebrar ligações peptídicas em proteínas, liberando peptídeos e aminoácidos. A hidrólise alcalina utiliza bases

fortes, geralmente a altas temperaturas, mas pode levar à racemização de aminoácidos, o que pode limitar a utilização como ingredientes alimentícios. A hidrólise ácida, comumente realizada com ácido clorídrico, é útil para análises de aminoácidos, porém pode destruir alguns aminoácidos sensíveis a esse reagente. A hidrólise enzimática, empregando enzimas específicas, oferece maior seletividade e condições mais suaves, preservando a integridade dos aminoácidos. Cada método tem suas vantagens e limitações, dependendo do tipo de amostra e do objetivo do processo (Houl *et al.,* 2017).

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) se destaca por sua eficiência na análise de di- e tripeptídeos, como demonstrado em um método rápido (5 min) para identificar esses peptídeos em hidrolisados de proteína do soro do leite e fígado suíno. Este método utiliza uma perda neutra de 46 Da de ácido fórmico para favorecer íons [dipep + H]+, melhorando a sensibilidade. A seleção de candidatos a dipeptídeos é baseada em todas as possíveis combinações de 20 aminoácidos, com fragmentos de dissociação induzida por colisão e analisados via sequenciamento de novo. As atividades biológicas dos peptídeos sequenciados foram avaliadas em comparação com o banco de dados Biopep e outras literaturas, identificando vários peptídeos ativos como inibidores da dipeptidil peptidase IV e da enzima conversora de angiotensina (ACE) (Poliseli *et al.*, 2021). Este método deu origem a exploração dos di- e tripeptídeos de diversas fontes como mostrado a seguir.

A pele da tilápia-do-nilo, um subproduto da aquicultura brasileira, é rica em colágeno. Este estudo avaliou seu potencial cicatrizante, antioxidante e antimicrobiano, além de identificar os principais compostos. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* para analisar a capacidade de cicatrização, e a análise química indicou a presença de biopeptídeos ativos. Os resultados mostraram que o extrato hidrolisado bruto da pele da tilápia-do-nilo tem potencial cicatrizante sem efeitos tóxicos, sendo promissor para tratamento de feridas (Tozetto *et al.*, 2023).

Os resíduos industriais, como os da indústria cervejeira que apresenta grande interesse biotecnologico e que pode ser fonte de proteínas para produzir peptídeos bioativos via hidrólise foi utilizado para transformação os resíduos de levedura em hidrolisados proteicos, avaliando o grau de hidrólise e a proteína total solúvel e assim, otimizar a produção de peptídeos e aminoácidos bioativos. Foi aplicado a hidrólise alcalina e enzimática, visando a aplicação em larga escala. Os tratamentos mostraram-se eficazes, liberando conteúdo intracelular e produzindo hidrolisados com atividades biológicas, identificadas por espectrometria de massas e confirmadas pelo banco de dados Biopep (Rosa *et al.,* 2023).

Nos hidrolisados proteicos de soja produzidos com papaína, separados por ultrafiltração em frações de baixa e alta massa molecular (LMMH e HMMH, respectivamente) e analisados via LC-MS/MS, avaliou-se a atividade antioxidante e o potencial inibitório sobre α-glucosidase e lipase em testes *in vitro.* A fração HMMH exibiu maior atividade antioxidante, e a LMMH apresentou melhores resultados na inibição da α-glucosidase, sugerindo potencial para ingredientes alimentares que retardam a peroxidação lipídica e a digestão de lipídios e carboidratos (Farias *et al*., 2023).

A obtenção de di- e tripeptídeos bioativos através da hidrólise da farinha de soja e de seu isolado proteico com as enzimas Alcalase® e Neutrase® foi avaliada. Utilizou-se um sistema inovador de LC-MS/MS para identificar peptídeos bioativos. A caracterização da proteína de soja e a atividade antioxidante dos peptídeos obtidos foram analisadas, revelando que o uso de Alcalase® e o preparo do isolado proteico de soja potencializaram a formação de peptídeos bioativos, com atividade antioxidante significativamente melhorada pela hidrólise enzimática (Crozatti *et al*., 2023).

3. FRUTANOS:
POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS COM POTENCIAL PREBIÓTICO E TECNOLÓGICO

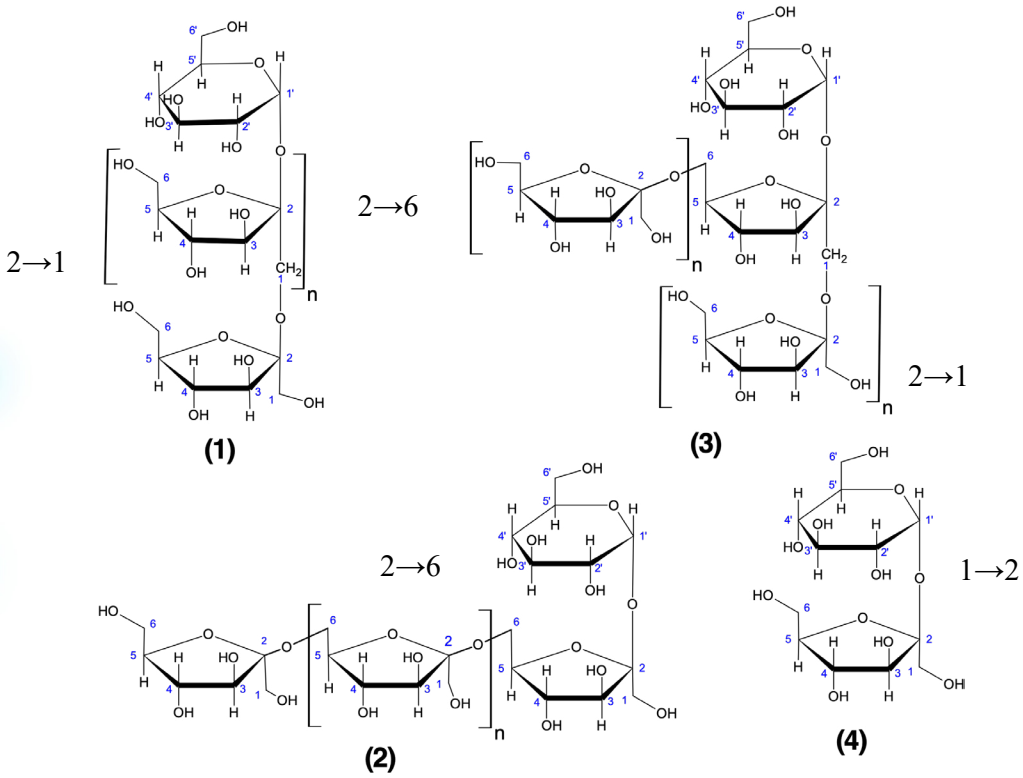
Os frutanos são polímeros de frutose e consistem em séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores (Figura 1), têm como precursora a molécula de sacarose e a reação de polimerização dessas moléculas ocorre em geral linearmente (Mensink *et al*., 2015).

Depois do amido, os frutanos são os carboidratos de reserva mais abundantes encontrados naturalmente em uma grande variedade de plantas. São classificados como fruto-oligossacarídeos ou inulinas, dependendo do grau de polimerização (GP), que se refere ao comprimento da cadeia das moléculas. Além disso, são classificados em diferentes famílias com base no tipo de ligações glicosídicas. Exemplos incluem unidades de β-D-frutofuranosil ligadas a (2 → 1), tais como inulina que são normalmente derivadas de fontes vegetais ou unidades de β-D-frutofuranosil ligadas a (2 → 6), tais como levanas que são tipicamente encontradas em plantas de monocotiledôneas e fontes bacterianas, e estruturas compostas com tipo de ligação (2 → 1) e (2→ 6) D-frutofuranosil, tais como graminanos e são mais raros (Figura 1) (Mensink *et al.,* 2015).

Os frutanos de cadeias curtas conhecidos como fruto-oligossacarídeos (FOS), apresentam estrutura geral de GF_n ou F_n, em que G e F representa glicose e frutose, respectivamente, e "n" é o número de unidades frutosil. Os FOS consistem em uma mistura de fruto-oligômeros com duas ou mais unidades de frutose com ligações glicosídicas β-D-(2→1) entre os resíduos de frutose e por uma unidade de glucose terminal por meio de ligação glicosídica do tipo α-D-(1→2) (Gruskiene *et al*., 2024).

SUMÁRIO

Figura 1. Estrutura química de frutanos: inulina (1), levano (2) graminano (3) e sacarose (4)



Fonte: Caleffi et al., 2015.

3.1 PRINCIPAIS FONTES DE OBTENÇÃO DE FRUTANOS

Os frutanos são amplamente distribuídos em uma variedade de plantas como carboidrato de armazenamento, estando presente em mais de 30.000 produtos vegetais (Wichienchot *et al.*, 2011; Gruskiene *et al.*, 2024), entre os quais estão os tubérculos de

Helianthus tuberosus (alcachofra de Jerusalém), *Cichorium intybus* (chicória), *Dahlia Pinnata* (dália) e *Polymnia sonchifolia* (yacon) (Oliveira *et al.*, 2011).

Estas espécies de plantas contendo frutanos são encontradas em várias famílias de mono e dicotiledóneas tais como Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae e Asteraceae. Em Liliaceae, Amaryllidaceae e Asteraceae, os frutanos são geralmente armazenados em órgãos como os bulbos, tubérculos e raízes tuberosas (Oliveira *et al.*, 2011; Wichienchot *et al.,* 2011; Gruskiene *et al.*, 2024).

As duas espécies atualmente utilizadas pela indústria para produção de frutanos do tipo inulina pertencem a família Asteraceae, a alcachofra de Jerusalém (*H. tuberosus*) e a chicória (*C. intybus*) (CHI *et al.*, 2011), com maior destaque para a chicória que tem sido utilizada para a produção industrial de inulina na Bélgica, Holanda e França (Wichienchot *et al.*, 2011; Gruskiene *et al.*, 2024).

Estudos realizados por Lopes *et al*. (2015; 2016; 2017) demonstraram que a *Stevia rebaudiana*, planta da família Asteraceae (Figura 2) pode ser uma fonte nova e promissora para a obtenção de fruto-oligossacarídeos, com um teor total de frutanos apresentados de cerca de 15%, semelhante ao valor (15-20%) observado em espécies atualmente utilizadas para fins comerciais, como a alcachofra (*H. tuberosus*) e a chicória (*C. intybus*) (Chi *et al.*, 2011).

3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRUTANOS

O material vegetal escolhido a partir de plantas na maior parte dos casos é oriundo de raízes e raízes tuberosas, mas pode ter origem a partir de outros órgãos. O material deve ser limpo, descascado e quando necessário triturados para aumentar a eficiência da extração. Os frutanos podem ser extraídos usando solventes aquosos, como água, ou solventes orgânicos, como etanol. A escolha do solvente depende da solubilidade dos frutanos e da capacidade

de evitar a extração de compostos indesejados (Lopes *et al.* 2017; Redondo-Cuenca *et al.*, 2021). A extração pode ser realizada por maceração, infusão, percolação, extração assistida por ultrassom, por métodos hidrotérmicos entre outros métodos. As condições de extração, como temperatura, tempo e relação sólido-líquido, devem ser otimizadas para maximizar o rendimento e a qualidade dos frutanos extraídos (Mariano *et al.*, 2023).

Após a extração, o extrato contendo frutanos pode conter impurezas, como outros carboidratos, pigmentos, compostos fenólicos e mesmos compostos inorgânicos. Essas impurezas podem ser removidas por filtração, precipitação, centrifugação ou cromatografia (Zhang *et al.*, 2022).

Quando se emprega a técnica de precipitação fracionada os frutanos podem ser precipitados a partir de soluções aquosas utilizando álcool, geralmente etanol ou metanol, ou mesmo por alteração de pH ou da força iônica. A seleção do álcool ou compostos inorgânicos e das condições de precipitação depende das propriedades específicas dos frutanos (Zhang *et al.*, 2022). A Figura 2 ilustra as etapas de obtenção de frutanos empregadas para obtenção de inulina de raízes de *Stevia rebaudiana* (Lopes *et al.*, 2012).

A técnica de cromatografia seja de coluna clássica, cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de afinidade são frequentemente empregadas para separar os frutanos de outros componentes (Zhang *et al*., 2022).

Após purificados os frutanos podem ser lavados para remover resíduos de solventes ou impurezas remanescentes. Em seguida, eles são secos para obter um produto final estável e de alta pureza, algumas metodologias podem ser empregadas entre as quais podemos destacar a liofilização e a pôr *spray-dryer* (Zhang *et al.*, 2022).

Figura 2. Processo extrativo de frutanos a partir das raízes de *Stevia rebaudiana*

Fonte: Lopes, 2012.

4. ANÁLISES QUÍMICAS

Os frutanos purificados podem ser analisados por diferentes ferramentas analíticas, como métodos colorimétricos, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras (Apolinario *et al.,* 2014; Caleffi *et al.* 2015; Lopes *et al.* 2015; Petkova; Denev, 2015; Cotrim *et al.,* 2022; Zhang *et al.,* 2022; Mariano *et al*., 2023).

a. Análise Colorimétrica

A análise colorimétrica de frutanos é uma técnica laboratorial usada para quantificar a concentração de frutanos em diversas amostras, especialmente produtos alimentícios como cereais, forragens e alimentos processados, além de insumos para a indústria de alimentos e bebidas (Toledo *et al.,* 2012; Zhang *et al.,* 2022).

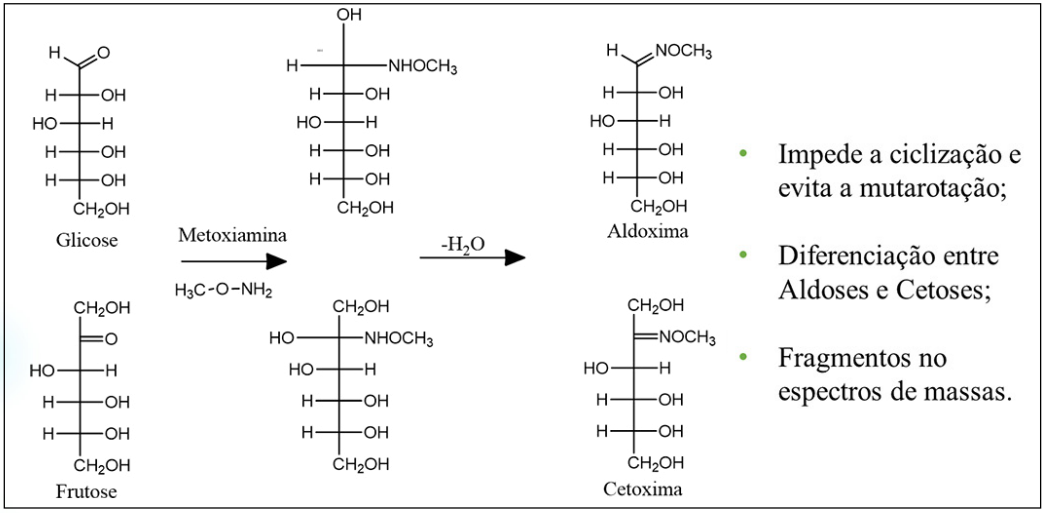
A análise colorimétrica, de uma forma geral, baseia-se na medição da intensidade da cor de uma solução, que é proporcional à concentração do composto de interesse. Para frutanos, um dos métodos colorimétricos mais comuns baseia-se na reação destes polissacarídeos com reagentes específicos que produzem uma mudança de cor quantificável, geralmente lida por um espectrofotômetro (Toledo *et al.,* 2012; Zhang *et al.,* 2022). Essa mudança de cor é proporcional à concentração de frutanos presentes na amostra.

b. Análise por Cromatografia Gasosa (CG)

Para realizar análises de frutanos através de cromatografia gasosa (CG), é necessário passar por algumas etapas de preparação e análise específicas, visto que os frutanos são polímeros de frutose que não podem ser diretamente analisados por CG sem antes serem hidrolisados e derivatizados (Lopes *et al*., 2015).

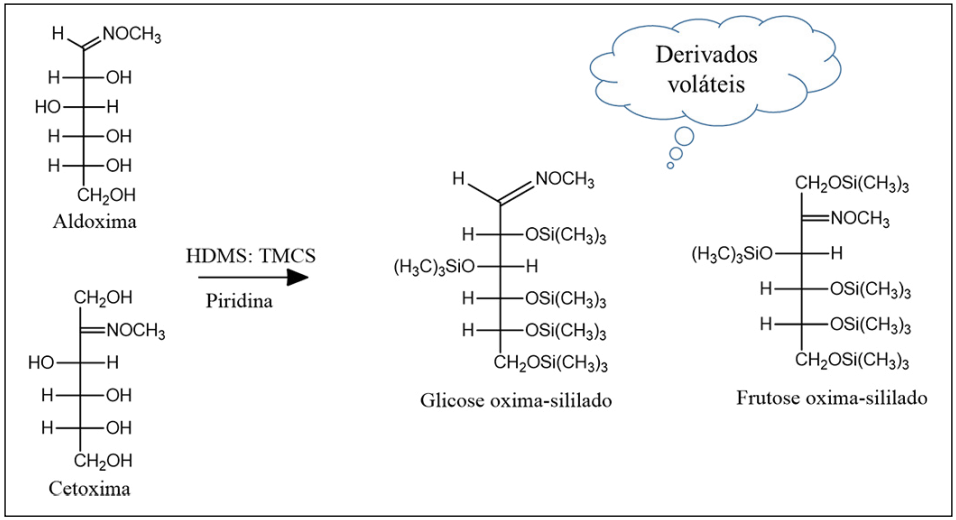
Os frutanos extraídos devem primeiro ser hidrolisados, geralmente em ambiente ácido, para quebrar as ligações glicosídicas e liberar as moléculas de frutose e a seguir transformados em derivados voláteis para permitir a sua análise por CG. A sililação é um dos métodos mais frequentemente utilizados para a derivatização, no qual reagentes como o BSTFA (Bistrimetilsililtrifluoroacetamida) ou transformação em oxima seguida de sililação com cloreto de trimetilsilano (Figuras 3a e 3b) são usados para substituir os grupos hidroxila pelos grupos silil (Lopes *et al.,* 2015).

Figura 3a. Reação de formação derivados da oxima dos frutanos hidrolisados



Fonte: autores.

Figura 3b. Reação de sililação e formação de derivados voláteis dos frutanos de oxima-sililados

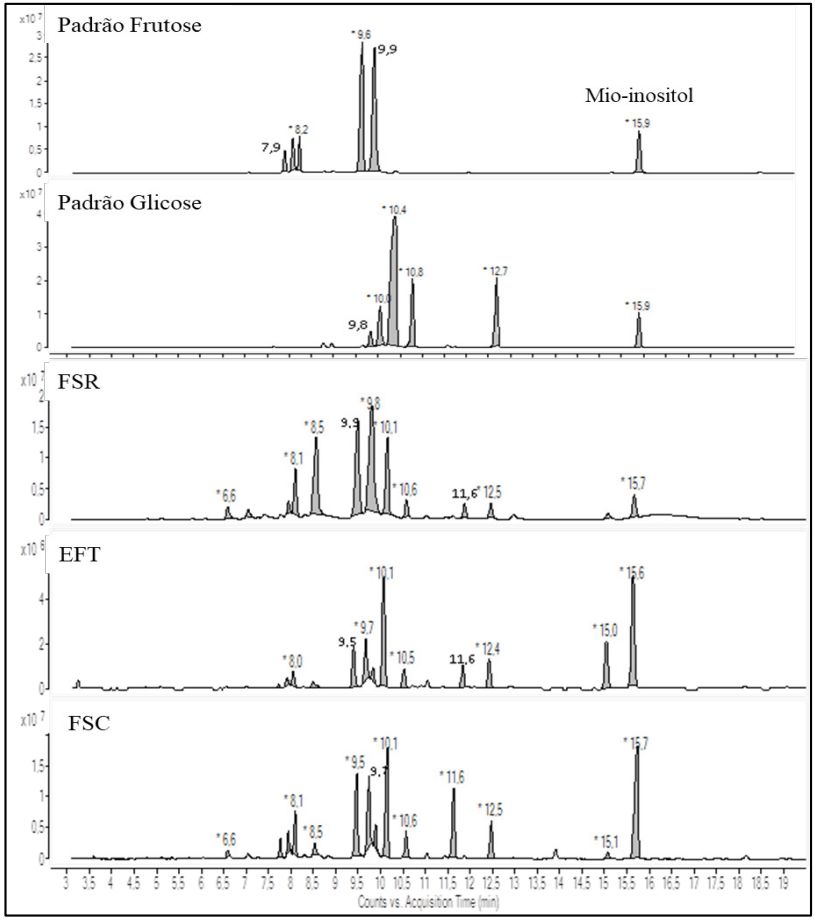


Fonte: autores.

A seguir a solução derivatizada é injetada no cromatógrafo gasoso contendo uma coluna capilar com uma fase estacionária adequada para separar os compostos com base em suas propriedades de volatilidade e interação com a fase estacionária. Detectores comuns incluem o detector de ionização de chama (DIC) e o detector por espectrometria de massas (EM), sendo a EM particularmente útil para a identificação exata dos compostos. Os tempos de retenção e áreas dos picos são analisados para quantificar e identificar os componentes derivados dos frutanos na amostra (Figura 4), sendo também nessa técnica importante construir uma curva analítica com padrões conhecidos de frutanos ou frutose para calibrar o sistema e garantir a precisão da quantificação.

A análise de frutanos por cromatografia gasosa é uma técnica elaborada que requer uma preparação cuidadosa das amostras, hidrólise, derivatização e controle rigoroso dos procedimentos analíticos. Quando realizada corretamente, oferece uma maneira precisa e eficaz de analisar os frutanos em diversos tipos de amostras.

Figura 4. Cromatograma de Íons Totais dos derivados oxima-sililados dos padrões e amostras de frutanos obtidos a partir de *S. rebaudiana*



Fonte: Lopes, 2017.

c. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

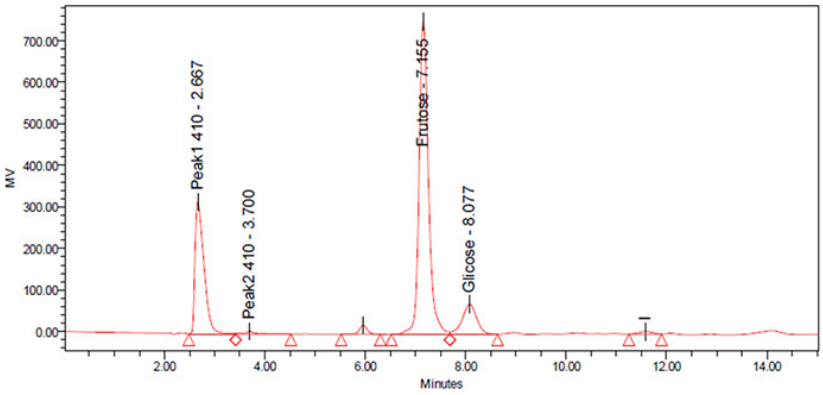
A análise de frutanos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica amplamente utilizada para

identificar e quantificar frutanos em diferentes amostras. A CLAE permite uma análise detalhada desses compostos graças à sua alta resolução, sensibilidade e especificidade. A fase móvel pode variar dependendo do tipo de coluna utilizada e dos frutanos a serem analisados. Eluentes comuns incluem água, acetonitrila ou metanol, muitas vezes em gradiente, para otimizar a separação. A escolha da coluna também é crucial para uma boa separação destes compostos. Colunas de exclusão de tamanho, de troca iônica ou colunas de fase reversa são frequentemente utilizadas.

O detector mais comumente usados na análise de frutanos é o detector de índice de refração (RID), embora detectores de espectrometria de massas (EM) ou detectores de UV-vis também possam ser utilizados, dependendo da especificidade e sensibilidade desejadas (Redondo-Cuenca *et al.*, 2021).

A quantificação dos frutanos é realizada comparando a área sob os picos dos frutanos ou produtos de sua hidrólise detectados com padrões de frutanos ou monossacarídeos de concentração conhecida (Figura 5). A análise de dados envolve não apenas a quantificação, mas também a identificação de picos, que pode ser desafiadora devido à complexidade dos perfis destes compostos em algumas amostras. A análise de frutanos por CLAE é uma ferramenta poderosa na pesquisa de alimentos, permitindo compreender melhor o perfil desses oligossacarídeos em diversos produtos alimentícios e matérias-primas, bem como seus impactos nutricionais e funcionais.

Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE com detector de índice de refração do padrão de inulina após hidrólise



Fonte autores.

d. Análise de frutanos por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

A caracterização e análise química de frutanos por meio da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF) é uma técnica que aproveita a sensibilidade do espectro infravermelho para identificar compostos orgânicos. No caso dos frutanos, que são polímeros de frutose encontrados em diversas plantas e vegetais, o IV-TF pode ser uma ferramenta valiosa para compreender a sua estrutura, composição e possíveis aplicações.

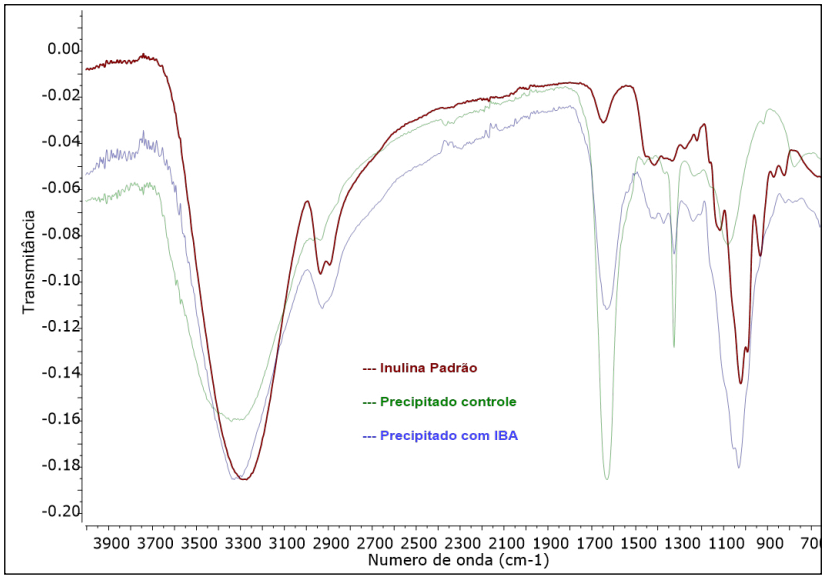
A técnica de IV-TF baseia-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas quando expostas a diferentes comprimentos de onda. Cada tipo de ligação química e estrutura molecular tem vibrações características que podem ser detectadas e quantificadas pelo espectro produzido (Redondo-Cuenca *et al.*, 2021).

No caso dos frutanos, as bandas específicas de absorção no espectro FTIR podem ser correlacionadas com tipos de ligação glicosídica presentes, como ligação β-(2→1) na inulina ou β-(2→6) na levana.

Isso permite não apenas a identificação do tipo de frutano mas também fornece insights sobre sua estrutura e pureza, como mostrado na análise de inulina obtida de raízes de *Stevia rebaudiana* (Figura 6).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier é uma ferramenta interessante para a caracterização e análise química de frutanos, oferecendo uma maneira rápida, não destrutiva e eficiente de analisar esses compostos. Com a capacidade de identificar precisamente estruturas moleculares e ligações químicas, o IV-TF contribui significativamente para a pesquisa e desenvolvimento de produtos baseados em frutanos, além de ter aplicação em diversas áreas como agronomia, nutrição e tecnologia de alimentos (Redondo-Cuenca *et al.,* 2021).

Figura 6. Análise comparativa por espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier entre um padrão de inulina (Orafit GR) com inulinas obtidas de raízes de *Stevia rebaudiana* cultivadas em sistema hidropônico utilizando-se uma solução nutritiva (precipitado controle) e usando a mesma solução suplementada com ácido índole-butírico (10 mg/L)



Fonte: autores.

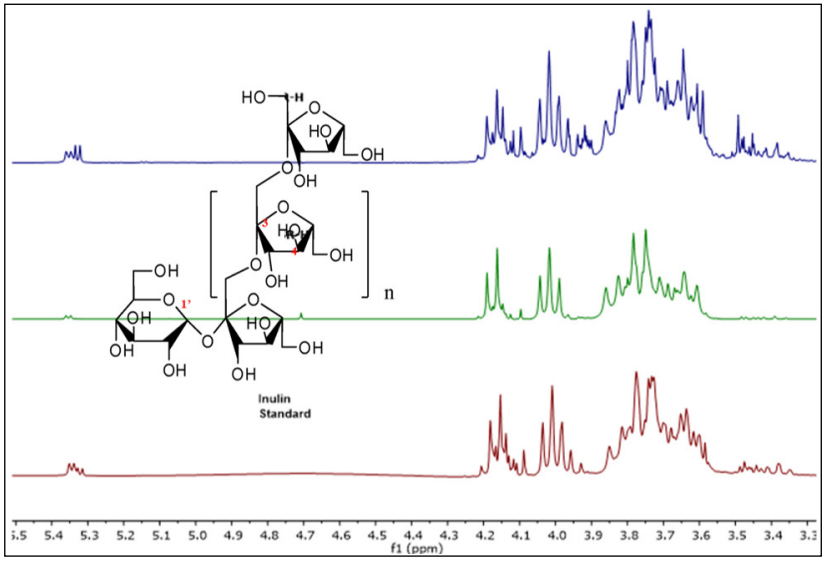
e. Análise de frutanos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica poderosa para investigar a estrutura molecular de compostos orgânicos, incluindo frutanos. A RMN consiste em aplicar um forte campo magnético aos núcleos atômicos, o que faz com que eles se alinhem de acordo com o campo magnético. Quando uma onda de rádio é aplicada, os núcleos atômicos absorvem a energia e mudam sua orientação. Ao remover a fonte de energia, eles retornam ao seu estado original emitindo energia detectável pela RMN (Pavia *et al*., 2016).

A RMN é altamente específica para a estrutura molecular, oferecendo informações detalhadas sobre a composição e configuração dos frutanos. Como é uma técnica não destrutiva, permite a análise da mesma amostra várias vezes, se necessário. Outra característica importante é que com ela é possível analisar misturas complexas sem necessidade de separação prévia, o que é particularmente útil para amostras biológicas e alimentos. Além de identificar, a RMN pode ser usada para quantificar a concentração desses polissacarídeos nas amostras, como pode ser observado na análise de frutanos de diferentes origens como de raízes e caules de *Stevia rebaudiana* (Lopes *et al*., 2015) mostrado na Figura 7 com raízes de *Pfaffia glomerata* (Caleffi *et al*., 2015; Cotrim *et al.* 2022), raízes de escarola (*Chicorium endívia*).

Apesar dessas vantagens a técnica apresenta algumas limitações entre as quais a sensibilidade pode ser menor do que outras técnicas analíticas, o que significa que pode ser necessário maiores quantidades de amostra, além disso os equipamentos e manutenção de RMN podem ser caros, limitando sua acessibilidade para alguns laboratórios.

Figura 7. Espectro de RMN de 1H (500,13 MHz, D20) dos extratos das raízes de *S. rebaudiana* e do padrão de inulina (Orafti® GR). Abreviaturas: A - extrato sobrenadante; B - extrato precipitado; C - padrão de inulina



Fonte: autores.

Em suma, a análise de frutanos por RMN é uma ferramenta valiosa, fornecendo *insights* detalhados sobre a composição molecular dessas importantes biomoléculas. Sua capacidade de analisar amostras complexas de maneira não destrutiva a torna uma técnica imprescindível na pesquisa e no controle de qualidade na indústria de alimentos e farmacêutica.

5. USO DE FRUTANOS COMO PREBIÓTICOS

Os frutanos desempenham um papel fundamental como prebióticos no sistema digestivo humano. Os prebióticos são substâncias não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento

e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon, especialmente as bifidobactérias e lactobacilos (Figura 8) (Gibson *et al*., 2004; Caleffi *et al.*, 2015; Lopes *et al*., 2015; Gibson *et al*., 2017; Mariano *et al*., 2020; Ribeiro *et al*., 2022).

Os frutanos podem atuar como prebióticos quando ocorre:

a. Estimulação seletiva de bactérias benéficas: Os frutanos passam pelo estômago e intestino delgado sem serem digeridos e chegam ao cólon, onde servem como fonte de alimento para as bactérias benéficas. As bifidobactérias e lactobacilos, em particular, usam essas moléculas como substrato para o crescimento e metabolismo, resultando em uma microbiota intestinal mais saudável;

b. Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): Durante a fermentação dos frutanos pelas bactérias benéficas no cólon são produzidos ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato. Esses AGCC têm vários efeitos benéficos, incluindo a manutenção da integridade da mucosa intestinal, a regulação do metabolismo energético e a modulação da resposta inflamatória;

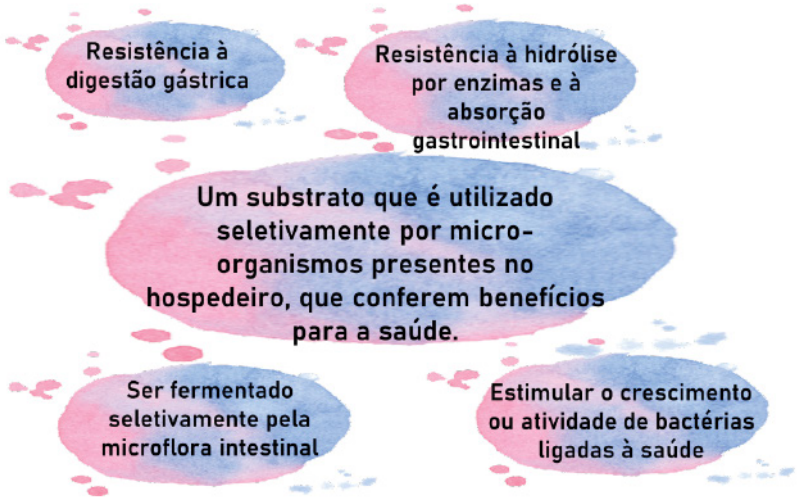
c. Modulação do sistema imunológico: Os frutanos podem modular o sistema imunológico, ajudando a regular a resposta imune no intestino. Eles promovem a produção de citocinas anti-inflamatórias e podem ajudar a reduzir a inflamação intestinal;

d. Melhora da saúde digestiva: Os frutanos também podem ajudar a melhorar a saúde digestiva em geral, promovendo a regularidade intestinal e prevenindo a constipação;

e. Redução do risco de doenças crônicas: A ingestão regular de frutanos e outros prebióticos tem sido associada à redução do risco de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e certos tipos de câncer.

Em resumo, os frutanos desempenham um papel importante na promoção da saúde intestinal pois ocorre promoção do crescimento de bactérias benéficas e da modulação do ambiente intestinal. Incorporar alimentos ricos desses oligo e polissacarídeos na dieta pode contribuir para uma microbiota intestinal saudável e um sistema digestivo equilibrado (Gibson *et al*., 2004; Caleffi *et al.,* 2015; Gibson *et al*., 2017; Mariano *et al*., 2020; Cotrim *et al*., 2022).

Figura 8. As características necessárias para um composto atuar como um prebiótico (Gibson *et al*., 2004; 2017)



Fonte: autores.

5.1 USO TECNOLÓGICO DE FRUTANOS

Os frutanos são um elemento alimentar distintivo, que oferece muitos benefícios dietéticos importantes, juntamente com certas propriedades industriais, por seu uso extensivo em aplicações alimentares (Caleffi *et al.,* 2015; Lopes *et al*., 2015; Mariano *et al*., 2020; Cotrim *et al*., 2022).

As moléculas de cadeias curtas, que correspondem aos fruto-oligossacarídeos são muito mais solúveis e mais doces do que a inulina nativa e de cadeia longa, podendo contribuir para melhorar a sensação bucal, pois suas propriedades estão intimamente relacionadas com as de outros açúcares. Por exemplo, devido a um perfil de doçura semelhante ao da sacarose, mas com menor teor calórico (1-2 kcal/g) e poder edulcorante (30-35%), pode ser útil para substituir parcialmente a sacarose ou substituí-la totalmente quando combinado com outros adoçantes não calóricos (Guggisberg *et al.*, 2009; Tárrega, Rocafuli, Costell, 2010).

As moléculas de cadeias longas são menos solúveis, mais viscosas e mais termoestáveis e podem atuar nas propriedades reológicas e sensoriais dos produtos lácteos como um substituto de gordura em produtos com baixo teor de gordura ou gordura reduzida. Foi relatado que a inulina de cadeia longa, quando adicionada em água ou leite, tem a capacidade de formar microcristais, que podem interagir para formar uma textura cremosa suave e proporcionar um paladar semelhante a gordura (Mensink *et al.*, 2025).

O amplo uso de frutanos do tipo inulina no setor alimentar é baseado em suas características tecno-funcionais. A inulina e os fruto-oligossacarídeos são de grande interesse para desenvolver produtos saudáveis porque respondem simultaneamente a uma variedade de requisitos do consumidor (Mensink *et al.*, 2015; Gruskiene *et al.*, 2024).

A inulina é uma fibra solúvel com sabor neutro e mínima influência nas características organolépticas de um produto (Aravind *et al.*, 2011), a mesma tem sido empregada em um número crescente de estudos para utilização no mercado de alimentos. No Quadro 1 estão descritos alguns empregos dos frutanos na indústria de alimentos.

Quadro 1. Resumo das Aplicações do Frutanos na Indústria de Alimentos

Aplicação	Funcionalidade
Produtos lácteos	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Estabilidade de espumas Fibras e prebióticos
Sobremesas congeladas	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Textura Fibras e prebióticos
Produtos de panificação	Retenção de umectância Fibras e prebióticos
Cereais matinais	Fibras e prebióticos
Produtos dietéticos e Substitutos de refeições	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Fibras e prebióticos Baixo valor Calórico
Pastilhas	Substituto de açúcar Fibras e prebióticos

Fonte: Mensink et al. (2015); Gruskiene et al. (2024).

Os frutanos possuem diversas aplicações na indústria farmacêutica como excipientes na produção de medicamentos, os do tipo inulina podem ser utilizados como agente de volume e/ou aglutinante em comprimidos e como revestimentos para liberação controlada de fármacos. A capacidade de controlar a taxa de liberação de fármacos é devido a sua capacidade de permanecer intacta no trato gastrointestinal superior e, em seguida, apresentar degradação e digestão específica pela microbiota do cólon (Mensink *et al.*, 2015; Gruskiene *et al.*, 2024).

A administração direcionada de fármacos no cólon é altamente desejável para o tratamento local de uma variedade de doenças intestinais, como colite ulcerativa, doença de Crohn, amebiose, câncer, tratamento local de patologias colônicas e entrega sistêmica de proteínas e medicamentos peptídicos (Philip; Philip, 2010). O fato de que os frutanos não são digeridos ou absorvidos no intestino delgado fez deste polímero um veículo atraente para o fornecimento de drogas de liberação controlada (Mensink *et al*., 2015; Gruskiene *et al*., 2024).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A bioprospecção tem sido destaque em apontar e aplicar novos recursos genético, bioquímico e biológico, de modo que possam estar presentes na biotecnologia, agricultura, em alimentos, medicamentos, cosméticos e em produtos industriais. Para tanto, são necessários a identificação e o estudo de organismos naturais como plantas, animais e microrganismos e também, do uso de resíduos agroindustriais e então, identificar os compostos e realizar a aplicação.

Como dito anteriormente, a busca por identificar compostos antioxidantes e bioativos está intimamente ligada a bioprospecção devido ao potencial terapêutico e industrial, sendo possível utilizar dos mais variados tipos de cromatografia e tecnologias na identificação dos compostos, através de pesquisas robustas, e então, aplicar no desenvolvimento de produtos com inovação e sustentabilidade, isso devido a importância da biodiversidade como fonte de novos e valiosos recursos repletos desses compostos.

Também dentro da bioprospecção vale destacar a descoberta e exploração dos frutanos, que podem ser obtidos e purificados devido aos vários métodos, apontados no capítulo, e então explorar suas aplicações. Os frutanos são identificados como polissacarídeos de reserva em muitas espécies vegetais, e como o Brasil possui uma diversidade de fontes naturais, os produtos e compostos

isolados têm sido muito explorados na aplicação em alimentos funcionais, devido às propriedades prebióticas que contribuem para a saúde digestiva, na indústria farmacêutica no desenvolvimento de suplementos dietéticos e em produtos que melhore a saúde gastrointestinal e imunológica, em cosméticos e na biotecnologia pela capacidade de retenção de água e formação de gel.

Os avanços químicos e tecnológicos apontados, portanto, voltados a descoberta, identificação e aplicação dos compostos antioxidantes e bioativos, têm proporcionado benefícios significativos, permitindo uma melhor compreensão de suas propriedades, aumentando a eficiência de sua utilização e promovendo inovações em diversas áreas e indústrias. Com isso, os resultados em produtos são mais eficazes e seguros, contribuindo para a saúde e bem estar da população, além de formentar práticas mais sustentáveis e economicamente viáveis.

7. REFERÊNCIAS

AKBARIAN, M.; KHANI, A.; EGHBALPOUR, S.; UVERSKY, V. N., Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. **International Journal Molecule Science**, v. 23, 1445. 2022.

APOLINÁRIO, A. C.; DAMASCENO, B. P. G. L.; BELTRÃO, E. M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J. A., A. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 368-78, 2014.

ARAVIND, N.; SISSONS, M.; EGAN, N.; FELLOWS, C., Effect of insoluble dietary fibre addition on technological, sensory, and structural properties of durum wheat spaghetti. **Food Chemistry**, v. 130, p. 299-309, 2012.

BUENO, R. C.; TONIN, A. P. P.; POLISELI, C. B.; SINOSAKI, N. B. M.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINER, J. V.; RIBEIRO, M. A. S.; SILVA, V. M.; MEURER, E. C., Two Years Monitoring of Ethyl Carbamate in Sugar Cane Spirit from Brazilian Distilleries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, p. 1-2, 2020.

SUMÁRIO

CALEFFI, E. R.; KRAUSOVÁ, G. HYRSLOVÁ, I.; PAREDES, L. L. R.; SANTOS, M. M.; SASSAKI, G. L.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (*Spreng*) Pedersen roots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 392–399, 2015.

CAMARGO, J. N. A.; BERTAN, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; DUSMAN, E.; TONIN, L. T. D., Antitumoral activity, antioxidant capacity and bioactive compounds of ginger (Zingiber officinale). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, n. 1, e45724, 2020.

CARNEVALLI, D. B.; RAMOS, C. N.; MARDIGAN, L. P.; MEURER, E. C.; FILHO, L. C.; CORREA, R. C. G.; GONÇALVES, J. E., Ora-pro-nobis - chemical characterization and sourcing of crude extract through different extraction methods: a review, **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, e 55211629315, 2022.

CARNEVALLI, D. B.; RAMOS, C. N.; MARDIGAN, L. P.; OLIVEIRA, E. L.; MEURER, E. C.; FILHO, L. C., Bioactive compounds profile of extracts from Pereskia aculeata Miller leaves prepared with different solvents by ultrasound-assisted extraction, **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v.16, n.6, p.4696-4714, 2023.

CARRA, J. B.; MATOS, R. L. N.; NOVELLI, A. P.; COUTO, R. O.; YAMASHITA, F.; RIBEIRO, M. A. S.; MEURER, E. C.; VERRI-JUNIOR, W. A.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; ARAKAWA, N. S.; BARACAT, M. M., Spray-drying of casein/pectin bioconjugate microcapsules containing grape (*Vitis labrusca*) by-product extract, **Food Chemistry**, v. 368, 130817, p. 1-10, 2022.

CHATURVEDI, D. Perspectives on the synthesis of organic carbamates. **Tetrahedron**, v. 68, p.15–45, 2012.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods, **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 153–177, 2012.

CHI, Z. M.; ZHANG, T.; CAO, T. S.; LIU, X. Y.; CUI, W.; ZHAO, C. H., Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4295-4303, 2011.

CROZATTI, T. T. S.; MIYOSHI, J. H.; TONIN, A. P. P.; TOMAZINI, L. F.; OLIVEIRA, M. A. S.; MALUF, J. U.; MEURER, E. C.; MATIOLI, G., Obtaining of bioactive di- and tripeptides from enzymatic hydrolysis of soybean meal and its protein isolate using Alcalase® and Neutrase®, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 3, p. 1586–1596, 2023.

DONG, Y.; YAN, W.; ZHANG, Y. Q.; DAI, Z. Y., A novel angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from tilapia skin: Preparation, identification and its potential antihypertensive mechanism, **Food Chemistry**, v. 430, 137074, p. 1-11, 2024.

FARIAS, T. C.; ABREUNA, J. P.; OLIVEIRA, J. P. S.; MACEDO, A. F.; RODRIGUEZ-VEGA, A.; TONIN, A. P.; CARDOSO, F. S. N.; MEURER, E. C.; KOBLITZ, M. G. B., Bioactive properties of peptide fractions from Brazilian soy protein hydrolysates: In silico evaluation and experimental evidence, **Food Hydrocolloids for Health**, v. 3, 100112, p. 1-11, 2023.

GHOSH, A. K.; BRINDISI, M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 63, 2751–2788, 2020.

GIBSON, G. R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, n. 2, p. 25-31, 2004.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G., Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n 8, p. 491, 2017.

GRUSKIENE, R.; LAVELLI, V.; SEREIKAITE, J. Application of inulin for the formulation and delivery of bioactive molecules and live cells. Carbohydrate **Polymers**, v. 327, p. 121670, 2024.

GUGGISBERG, D.; CUNTHBERT-STEVEN, J.; PICCINALI, P.; BUTIKOFER, U.; EBERHARD, P., Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, v.19, p. 107-115, 2009.

HOU, Y.; WU, Z.; DAI, A.; WANG, G.; WU, G., Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance – review, **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 1-13, 2017.

IWASSA, I. J.; RIBEIRO, M. A.; MEURER, E. C.; FILHO, L. C.; BOLONHO, B. C.; SILVA, C., Effect of subcritical water processing on the extraction of compounds, composition, and functional properties of asparagus by-product, **Journal Food Process Engineering**, v. 42, e13060, p. 1-11, 2019.

KAMMERER, D. R. Anthocyanins, handbook on natural pigments in food and beverages, woodhead publishing series in food science, technology and nutrition, 2 Ed., cap. 5, 2024, p. 127-146.

KO, H.; SUNG, B. H.; KIM, M. J.; SOHN, J. H.; BAE, J. H., Fructan Biosynthesis by Yeast Cell Factories. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1373–1381, 2022.

KORAGI, H.; AYDAR, A. Y.; KHALID, W.; ERCISLI, S.; RUSTAGI, S.; RAMNIWAS, S.; PANDISELVAM, R. Ultrasound-assisted extraction with natural deep eutectic solvent for phenolic compounds recovery from Rosa damascene Mill.: Experimental design optimization using central composite design, **Microchemical Journal,** v. 196, 109585, p. 1-17, 2024.

LOPES, S. M. S. **Isolamento de caracterização de inulina a partir de raízes de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni**. 2012 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

LOPES, S. M. S.; KRAUSOVÁ, G.; RADA, V.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Carbohydrate Research**, v. 411, p. 15-21, 2015.

LOPES, S. M. S.; FRANCISCO, M. G.; HIGASHI, B.; ALMEIDA, R. T. R.; KRAUSOVÁ, G.; PILAU, E. J.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures. **Carbohydrate Polymers**, v.152, p. 718-725, 2016.

LOPES, S. M. S.; KRAUSOVÁ, G.; CARNEIRO, J. W. P.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of *Stevia rebaudiana* Bertoni**. Food Chemistry,** v. 225, p.154-161, 2017.

MACHADO, P. G.; LONDERO, D. S.; FARIAS, C. A. A.; PUDENZI, M. A.; BARCIA, M. T.; BALLUS, C., Guabijú (*Myrcianthes pungens*): A comprehensive evaluation of anthocyanins and free, esterified, glycosylated, and insoluble phenolic compounds in its peel, pulp, and seeds, **Food Chemistry**, v. 432, 137296, 2024.

MARIANO, T. B.; HIGASHI, B.; LOPES, S. M. S.; CARNEIRO, J. W. P.; ALMEIDA, R. T. R.; PILAU, E.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., Prebiotic fructooligosaccharides obtained from escarole (*Cichorium endivia* L.) roots. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, p. 100233, 2020.

MARIANO, T. B.; LIMA, H. R. S.; RIBEIRO, S. T. C.; SANTOS-FILHO, J. R.; SERRATO, R. V.; REIS, A. V.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B., Inulin extraction from *Stevia rebaudiana* roots in an autoclave. **Carbohydrate Research**, v. 530, p. 108850, 2023.

MENSINK, M. A.; FRIJLINK, H. W.; MAARSCHALK, K. V.; HINRICHS, W. L. J., Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 405-419, 2015.

MEURER, E. **Espectrometria de Massas para Iniciantes**, p. 165, 1 Ed. Appris Editora. 2020.

NARDINO, D. A.; ARANHA, A. C. R.; TONIN, L. R. D.; DEFENDI, R. O.; ISHIKAWA, S.; BRESSIANI, P. A.; SANTANA, A. B. S.; DUSMAN, E.; YONEKAWA, M. K. A.; JAQUES, J. A. S.; SANTOS, E. A.; TONIN, A. P. P.; MEURER, E. C.; SIPOLIC, C. C.; SUZUKI, R. M., Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from *Zingiber officinale* Roscoe, Evaluation of Acetylcholinesterase Enzyme Inhibition and Cytotoxic Activity of the Free and Encapsulated Extract, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 6, p. 1-19, e-20230186, 2024.

NI, D.; XU, W.; ZHU, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; GUANG, C.; MU, W., Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. **Biotechnology Advance**, v. 37, 306–318, 2019.

OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C.; CHIERRITO, T. P. C.; SANTOS, M. M.; SOUZA, L. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M., Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Food Chemistry**, v.129, p. 305-311, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R., **Introdução à Espectroscopia**, 5ª ed., Cengage Learning, 2016.

PETKOVA, N.; DENEV, P. **Methods for determination of inulin**. *In*: Agricultural Academy Food Research & Development Institute International Scientific-Practical Conference "Food, Tecnologies & Health¨, Proceedings Book, 2015. p. 135-140.

PHILIP, A. K.; PHILIP, B. Colon targeted drug delivery systems: A review on primary and novel approaches. **Oman Medical Journal**. v. 25, n. 2, p. 79-87, 2010.

POLISELI, C. B.; RIBEIRO, M.; TONIN, A. P. P.; VAGULA, J. M.; SANTOS, O. O.; VISENTAINER, J. V.; PONTES, R. M.; MORAES, L. A. B.; MEURER, E. C., Anthocyanidins structural study using positive electrosprayionization triple quadrupole mass spectrometry and H/Dexchange, **Journal Mass Spectrometry**, v. 53, n. 12, p. 1230–1237, 2018.

POLISELI, C. B.; TONIN, A. P. P.; MARTINEZ, F. C.; NASCIMENTO, N. C.; BRAZ-FILHO, V.; MALUF, J.; RIBEIRO, V. M. S.; ROSA, F. A. D.; SOUZA, G. H. M. F.; MEURER, E. C., Tri- and dipeptides identification in whey protein and porcineliver protein hydrolysates by fast LC–MS/MS neutral lossscreening and de novo sequencing, **Journal Mass Spectrometry**, v. 56, n. 2, e4701, p. 1-13, 2021.

REDONDO-CUENCA, A.; HERRERA-VAZQUEZ, S. E.; CONDEZO-HOYOS, L.; GOMES-ORDONEZ, E.; RUPEREZ, P., Inulin extraction from common inulin-containing plant sources. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113726, 2021.

RIBEIRO, S. T. C.; SILVA. T. F. O.; CASTRO, J. C.; CABRAL, M. R. P.; ABREU-FILHO, B. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C., Chemical characterization and bioactivities of fructans from *Pfaffia glomerata* roots. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 27, p. 100303, 2022.

ROSA, F. A. D.; TONIN, A. P.; ROCHA, B. S.; SANTOS, M. A. R.; SILVEIRA, F. M.; FILHO, L. C.; RIBEIRO, V. M. S.; MEURER, E. C., Optimization of Hydrolysis and Identification of Bioactive Peptides in Brewery Yeast Residuals, **Journal Brazilian Chemical Society**, v.00, n. 00, e-20230146, p. 1-11, 2023.

SABOTIC, J.; BAYRAM, E.; EZRA, D.; GAUDÊNCIO, S. P.; HAZNEDAROGLU, B.; JANEZ, N.; KTARI, L.; LUGANINI, A.; MADALAKIS, M.; SAFARIK, I.; SIMES, D.; STRODE, E.; TORUNSKA-SITARZ, A.; VARAMOGIANNI-MAMATSI, D.; VARESE, G. C.; VASQUEZ, M. I., A guide to the use of bioassays in exploration of natural resources – Review, **Biotechnol Advance**, v. 71, 108307, p 1-36, 2024.

SANTOS, G. J.; DEFENDI, R. O.; DUSMAN, E.; BIFFI, M. T.; BERTON, G. H.; TONIN, A. P. P.; MEURER, E. C.; SUZUKI, R. M.; SIPOLI, C. C.; DUSMAN, L. T., Valorization of Wastes from the Juice Passion Fruit Production Industry: Extraction of Bioactive Compounds from Seeds, Antioxidant, Photoprotective and Antiproliferative Activities, **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 1233–1250, 2023.

SILVA, C. F. G.; FATTORI, V.; TONELLI, C. R.; RIBEIRO, M. A. S.; MATOS, R. L. N.; CARRA, J. B.; MEURER, E. C.; HIROOKA, E. Y.; RAFAEL, J. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; VERRI-JUNIOR, W. A.; ARAKAWA, N., Hydroethanolic Extract of Grape Peel from *Vitis labrusca* Winemaking Waste: Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities, **Food Technology Biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 21-28. 2022.

SILVA, L. A.; ARANHA, A. C. R.; TONIN, A. P. P.; LIMA, J. C.; CUCO, R. P.; FILHO, L. C.; MEURER, E. C.; MADRONA, G. S.; SCAPIM, M. R. S., Extraction of bioactive compounds in *Muntingia calabura* peels and identificationusing DI-ESI-MS, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, p. 1713–1721, 2023.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P., Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review, **Journal of Functional Foods**, v. 18 (Part B), p. 820-897, 2015.

SRIKANTH, R.; REDDY, C. H. S. S. S.; SIDDARTHA, G.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B., Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydater. Polymers**, v. 120, p. 102–114, 2015.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J., Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries**. International Journal Molecule Science**, v. 16, n. 10, p. 24673-24706, 2015.

TALEBI, M.; LLGUN, S.; EBRAHIMI, V.; TALEBI, M.; FATKHONDEH, T.; EBRAHIMI, H.; SAMARGHANDIAN, S., *Zingiber officinale* ameliorates Alzheimer's disease and Cognitive Impairments: Lessons from preclinical studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v.133, 111088, p. 1-13, 2021.

TÁRREGA, A.; ROCAFULL, A.; COSTELL E. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 556-562, 2010.

TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; CHAMBÓ, E.; LOPES, S. M. S., **Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees**. 2012. p. 1-22.

TONIN, A. P. P.; POLISELI, C. B.; SINOSAKI, N. M.; MARTINEZ, F. C.; SANTOS, O. O.; OLIVEIRA, C. C.;SILVA, V. M.; VISENTAINER, J. V.; MEURER, E. C., Determination of Ethyl Carbamate in Commercial Sweetened Sugar Cane Spirit by ESI-MS/MS Using Modified QuEChERS and 18-Crown-6/Trifluoroacetic Acid Spiking Additives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, p. 1-7, 2022.

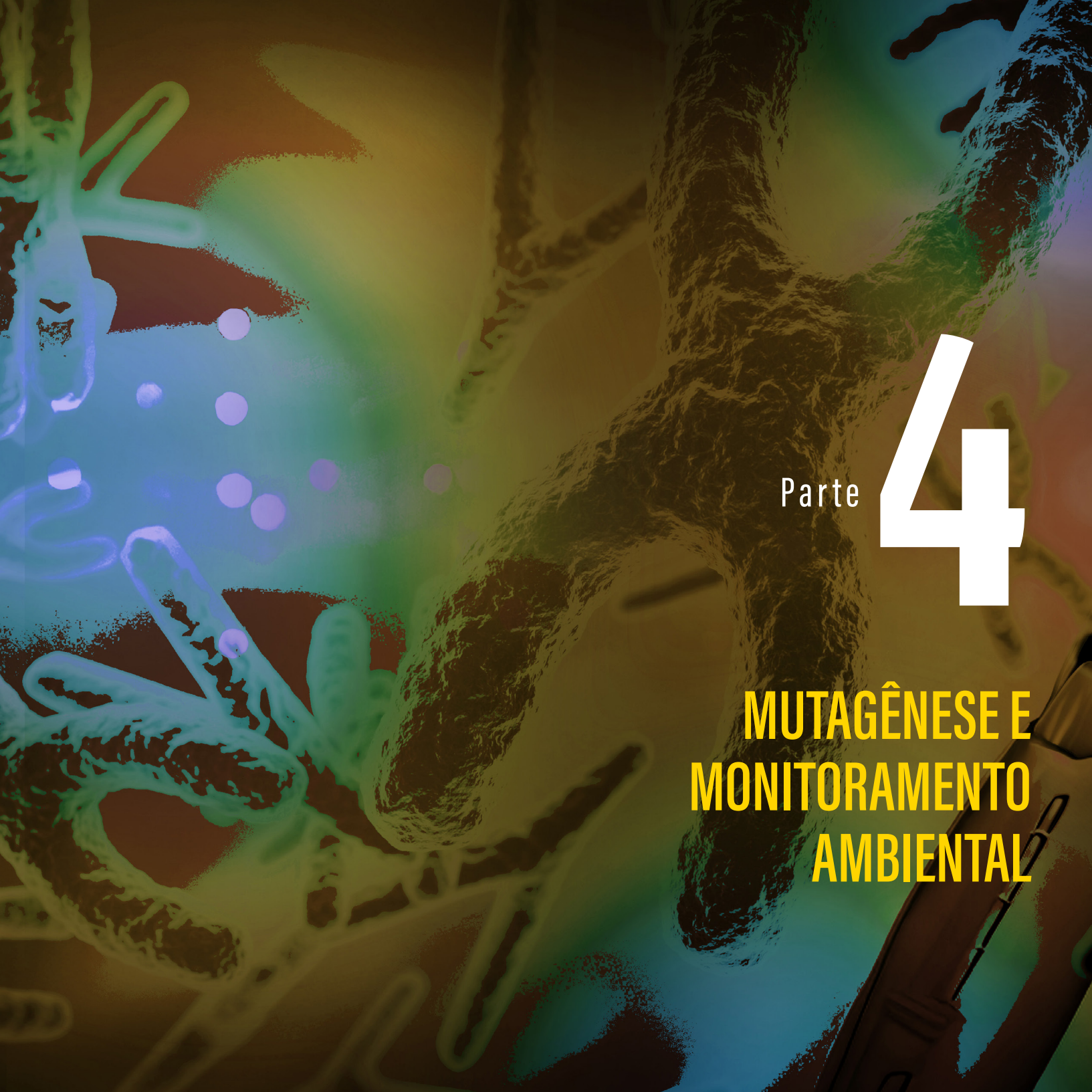
TOZETTO, R.; ROCHA, B. S.; ANDRADE, E. A.; CRUZ, L. S.; ROSA, R. L.; MACHINSKI, I.; OLIVEIRA, E. L.; MONTEIRO, J. R. B.; KOGA, A. Y.; LIPINSKI, L. C.; MEURER, E. C.; KITAGAWA, R. R.; BELTRAME, F. L., Study of the Antioxidant, Antimicrobial, and Wound Healing Properties of Raw Hydrolyzed Extract from Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*), **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, e202300863, p. 1-10, 2023.

VAGULA, J. M.; SINOSAKI, N. M.; RIBEIRO, M. A. S.; MAGON, T.; BERTOZZI, J.; MEURER, E. C.; SANTOS-JUNIOR, O. O.; VISENTAINER, J. V., Simple and Fast Method for Identification and Quantification of Anthocyanidins in Berries by Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, **Journal. Brazilian Chemical Society,** v. 29, n. 1, p. 38-44, 2018.

WICHIENCHOT, S.; THAMMARUTWASIK, P.; JONGJAREONRAK, A.; CHANSUWAN, W.; HMADHLU, P.; HONGPATTARAKERE, T.; ITHARAT, A.; OORAIKUL, B., Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 33, n. 5, p. 517- 523, 2011.

ZHANG, J.; ZHU, Y.; SI, J.; WU, L., Metabolites of medicine food homology-derived endophytic fungi and their activities. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1882–1896, 2022.

ZHANG, X.; ZHU, X.; SHI, X.; HOU, Y.; YI, Y., Extraction and Purification of Inulin from Jerusalem Artichoke with Response Surface Method and Ion Exchange Resins. **ACS Omega**, n. 14, v. 28, p. 12048–12055, 2022.



Parte 4

MUTAGÊNESE E MONITORAMENTO AMBIENTAL

4.1

Igor Vivian de Almeida
Mariane Aparecida Franco de Godoy
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

TOXICOGENÉTICA NA INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS APLICADOS À SAÚDE

1. INTRODUÇÃO

A Biotecnologia vem evoluindo rapidamente, ampliando suas aplicações desde o desenvolvimento farmacêutico, a produção alimentar e o tratamento dos poluentes ambientais. Considerando que a Biotecnologia é uma palavra de origem grega onde 'bio' significa vida, 'tecnos' técnica, e 'logos' se refere ao conhecimento, e que, portanto, é o conjunto de procedimentos envolvendo manipulação de organismos vivos para fabricar ou modificar produtos, a Biotecnologia Moderna enfoca as áreas humana, ambiental, industrial, animal e vegetal.

As diferentes aplicações da Biotecnologia são geralmente agrupadas em sete cores ou áreas de pesquisa e desenvolvimento, e a chamada Biotecnologia Vermelha é um segmento que trata da aplicação de avanços científicos e tecnológicos para resolver problemas, objetivando a melhora da saúde, bem-estar e qualidade de vida dos seres humanos, de todos os organismos vivos e do meio ambiente.

A importância da Biotecnologia está em: prevenir doenças, reduzindo a gravidade e a fatalidade; diagnosticar doenças precocemente e salvar vidas; diminuir custos, simplificar e acelerar a produção industrial; criar plantas e insumos com características desejáveis para aumentar o rendimento agrícola, a qualidade dos alimentos e a diminuição dos custos, com vantagens econômicas. Ou seja, na área da saúde, esse campo de conhecimento é responsável pelo desenvolvimento de vacinas, medicamentos naturais ou sintéticos e tratamentos de determinadas patologias, e principalmente, para o tratamento, cura ou melhoria e manutenção da vida e da sua qualidade.

O desenvolvimento industrial e tecnológico, e o estilo diário de vida e comportamental dos seres humanos, aumentou consideravelmente a sua exposição a agentes danosos e até cancerígenos. Apesar do conhecimento e da detecção de substâncias genotóxicas

e mutagênicas, ainda assim, alguns destes compostos não podem ser evitados por estarem presentes na forma de poluentes do ar atmosférico, do solo, da água ou como contaminantes de alimentos.

A atividade mutagênica é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação de risco de compostos químicos, incluindo substâncias medicamentosas e candidatos a medicamentos, uma vez que os agentes mutagênicos são capazes de induzir vários tipos de alterações no material genético de uma célula. Por outro lado, os efeitos mutagênicos de alguns produtos químicos podem ser parcialmente modulados ou reduzidos pela utilização de compostos que apresentem propriedades antimutagênicas.

No campo da descoberta de novos fármacos e para a avaliação dos riscos dos compostos químicos, os dados de mutagenicidade são requeridos para os produtos farmacêuticos antes do início dos ensaios clínicos e autorização de introdução no mercado. A estratégia de rastreio para o teste de mutagenicidade é baseada em uma bateria de testes e inclui ensaios *in vitro* e *in vivo*, de acordo com os resultados obtidos, considerando que os dois métodos de ensaio são utilizados para identificar os mesmos pontos. E considerando que a mutação tem um papel fundamental na carcinogênese, a pesquisa de compostos com potência antimutagênica permanece no foco das pesquisas aplicadas.

Há séculos, compostos naturais de plantas, animais e microrganismos têm sido utilizados nas tradições medicinais para tratar diversas doenças sem uma base científica sólida. Esta medicina tradicional e popular reduz a taxa de infecções, minimiza os efeitos secundários dos medicamentos e ajuda no progresso dos países em vias de desenvolvimento, onde, muitas vezes, a população mais carente não tem condições de acesso à medicina convencional.

As plantas são uma rica fonte de metabólitos secundários chamados de fitoquímicos, compostos de alcaloides, polifenóis, flavonoides, saponinas e terpenos, com diferentes atividades. Nas últimas

décadas tem havido um aumento no estudo e na investigação da ação de fitoterápicos para o controle de várias enfermidades.

Os metabólitos secundários são amplamente usados como moléculas antioxidantes, reduzindo o estresse oxidativo, e podem ser potenciais candidatos terapêuticos contra disfunções induzidas por substâncias tóxicas de diferentes origens e por contaminantes ambientais.

Devido às propriedades medicinais, profiláticas e terapêuticas dos fitoquímicos, que são uma mistura complexa de fitocompostos, são necessários estudos focando a identificação das suas moléculas bioativas e também da sua eficácia contra compostos tóxicos. Além disso, há necessidade de estudos extensos sobre a otimização e produção em larga escala de formulações medicinais a partir desses fitoquímicos.

Neste capítulo, serão apresentados os principais ensaios toxicogenéticos empregados na pesquisa do potencial biotecnológico de plantas medicinais e substâncias delas derivadas, bem como de fungos e endófitos associados, e que perfazem o histórico do PBA. Oportunamente, serão apresentados também os estudos com nanobiotecnologia e as perspectivas da área para o campo da saúde humana.

2. ENSAIOS TOXICOGENÉTICOS

Na prospecção do potencial biotecnológico de compostos, a genética toxicológica pode ser empregada na investigação da genotoxicidade de substâncias de interesse, visando a avaliação da segurança de produtos novos ou já existentes, como fármacos, cosméticos, aditivos alimentares, agroquímicos, etc. Mas, além do potencial genotóxico, os ensaios de genética toxicológica também

podem ser empregados na identificação de propriedades de interesse biotecnológico, tais como potencial antitumoral, e efeito protetor contra agentes que possuem ação genotóxica. Para tanto, uma variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo,* com diferentes sistemas-teste são combinados e aplicados em baterias de ensaios.

Atualmente, a ação antitumoral pode ser avaliada em diferentes tipos de câncer graças a ensaios *in vitro* realizados com uma infinidade de linhagens tumorais que estão ao alcance da comunidade científica mundial, facilitando e acelerando a análise de compostos de interesse. Estes ensaios vão ao encontro da crescente preocupação com a redução de testes *in vivo* e do número de animais usados, tornando o uso de ensaios *in vitro* prioritário. No Brasil, por exemplo, segundo a Resolução Normativa Nº 58/2023, para a liberação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes é proibido o uso, em testes, de animais vertebrados, com exceção dos seres humanos.

Dessa forma, as baterias de ensaios são formadas em etapas, onde inicialmente são empregados testes *in vitro*, e dependendo dos resultados obtidos, são realizados ensaios *in vivo*. Testes *in vitro* são comumente realizados em culturas de células animais, e em microrganismos, como a bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, enquanto ensaios *in vivo* são realizados em sua maioria em roedores, como ratos Wistar e camundongos. O uso combinado de diferentes ensaios e sistemas-teste é usado para fornecer o máximo de informações sobre a ação da substância de interesse, permitindo a investigação de seu potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico.

2.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E CITOMETRIA DE FLUXO

A citotoxicidade pode ser definida como a promoção de alterações na homeostase celular que pode ocorrer por diferentes fatores, tais como mudanças metabólicas, ação direta no DNA ou ainda sobre as fibras do fuso, interferindo na divisão celular. Dessa forma,

os testes citotóxicos verificam alterações celulares que podem ser avaliadas por diferentes mecanismos, como atividade enzimática, integridade da membrana celular, dentre outros.

Os ensaios de citotoxicidade são usados na etapa inicial da pesquisa para determinar os efeitos tóxicos ou antiproliferativos de um agente de interesse, sendo amplamente usados pela indústria farmacêutica como uma ferramenta útil para observar parâmetros do crescimento celular e determinar os efeitos em nível celular dos agentes desenvolvidos. São também usados para definir faixas de concentrações a serem testadas em ensaios posteriores e fornecer informações significativas sobre parâmetros como genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada.

Dentre os testes mais utilizados destaca-se o ensaio MTT, desenvolvido por Mosmann, em 1983. Trata-se de um teste quantitativo *in vitro* que consiste na conversão celular do sal tetrazólio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), hidrossolúvel e de coloração amarelada, em cristais de formazan de coloração roxa. Tal reação é mediada por enzimas desidrogenases associadas a mitocôndria e ao retículo endoplasmático. Após a conversão, os cristais de formazan formados precisam ser solubilizados por dimetilsulfóxido, o que permite a avaliação da proliferação e sobrevivência celular através da medida da absorbância. Deste modo, uma maior absorbância indica maior atividade enzimática e consequentemente, maior viabilidade celular.

Outro teste bastante utilizado devido a sua simplicidade é o método de exclusão por azul de Trypan, um corante azo ácido, que permite a distinção entre células viáveis e não viáveis. O método baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas intactas que excluem certos corantes, como o azul de Trypan, enquanto as células mortas não são capazes de fazer a sua exclusão. Tal característica permite a análise em microscópio de luz/óptico, distinguindo-se entre células transparentes (viáveis) e azuis (mortas).

Esse teste é frequentemente realizado concomitante a ensaios de genotoxicidade, sendo usado para validar esses ensaios ao demonstrar se a população de células viáveis é satisfatória (viabilidade ≥ 80%), ou se o tratamento com o agente de interesse tem a capacidade de impedir a divisão celular ou induzir a morte celular, a ponto de inviabilizar a avaliação de seu potencial genotóxico.

Além disso, a viabilidade celular também pode ser avaliada por meio de citometria de fluxo. Essa técnica envolve a marcação de estruturas celulares específicas, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos, com corantes fluorescentes, permitindo a quantificação da estrutura marcada. Dessa forma, para estimar a viabilidade celular, é levado em consideração que células inviáveis perdem a integridade da membrana, dando passagem a corantes fluorescentes, como o iodeto de propídeo (IP) que cora ácidos nucleicos, possibilitando a identificação de células inviáveis por meio da detecção de fluorescência.

Com a técnica de citometria de fluxo também é possível identificar a indução de apoptose, considerando a translocação da fosfatidilserina, um fosfolipídio da face interna da membrana plasmática, para a face externa da membrana durante o início do processo de apoptose (apoptose inicial), e posterior encolhimento e fragmentação celular, com formação dos corpos apoptóticos (apoptose tardia). Nesse sentido, uma marcação dupla, onde a anexina V se ligará à resíduos de fosfatidilserina, e corantes de ácidos nucleicos, como o IP que se ligará ao material genético, contribuem para a discriminação dos diferentes estágios de apoptose e necrose celular. Dessa forma, células viáveis apresentarão marcação negativa tanto para anexina V quanto para IP; células em apoptose inicial apresentarão marcação positiva para anexina V e negativa para IP; células em apoptose tardia apresentarão marcação positiva para anexina V e IP; e células necróticas apresentarão marcação negativa para anexina V e positiva para IP.

A análise do ciclo celular também é realizada por citometria de fluxo, sendo que a marcação com IP possibilita a identificação da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular: G_1, S, G_2 (interfase) e M (mitose), com base na quantidade de DNA. Células com 2C de DNA encontram-se nas fases G_0/G_1, células com quantidade intermediária entre 2C e 4C estão na fase S, enquanto aquelas com 4C de DNA estão nas fases G_2 e M. Isso permite a identificação de atrasos no ciclo celular que podem ocorrer em resposta a uma variedade de agentes genotóxicos, devido à ativação de pontos de checagem (*checkpoints*) que bloqueiam o ciclo para permitir o reparo de erros de replicação do DNA, por exemplo.

2.2 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Agentes genotóxicos são compostos que possuem a capacidade de interagir com o DNA das células, induzindo alterações em sua estrutura ou função. Dessa forma, a genotoxicidade é um termo amplo que engloba tanto danos ao material genético passíveis de correção pelo sistema de reparo, quanto alterações permanentes (mutações). Portanto, a avaliação do potencial genotóxico permite a identificação de agentes que podem causar danos ao material genético, e seus resultados podem ser usados para avaliação de riscos de diferentes compostos, possibilitando o estabelecimento de limites aceitáveis de exposição.

Nesse sentido, destaca-se o ensaio Cometa ou *Single Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE), desenvolvido por Ostling e Johanson (1984). Este teste é usado para detectar quebras das fitas do DNA em células individuais, permite a análise de danos em qualquer fase do ciclo celular e requer um número relativamente pequeno de células, podendo ser realizado *in vitro,* em cultura de células, e *in vivo,* a partir de células isoladas de vários tecidos animais. O método consiste na lise de células individualizadas deixando o DNA exposto (nucleoide),

que será submetido a relaxamento alcalino, seguido de uma eletroforese. Após a corrida, a formação de um padrão similar ao de um cometa implicará na presença de lesões genômicas, uma vez que a cauda formada é resultado do material genético fragmentado, que foi atraído para o polo positivo durante a eletroforese. A extensão da cauda formada é diretamente proporcional ao dano presente nas células, possibilitando a quantificação do dano sofrido.

Em condições alcalinas (pH > 13), o ensaio permite tanto a identificação de quebras de fita simples quanto dupla, adutos químicos DNA-proteína, *crosslinks* (ligações cruzadas intra e intercatenários), sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis. Tais danos são passíveis de reparo, mas também podem levar à morte celular ou resultar em mutação quando não reparados ou reparados erroneamente. Portanto, como as lesões detectadas por esse teste são passíveis de correções, o ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim, para a identificação de lesões cromatídicas, sendo também usado em estudos de reparo do DNA.

Por sua vez, agentes mutagênicos são aqueles capazes de causar alterações permanentes na sequência do DNA de um organismo, gerando mutações que podem alterar um único gene, um bloco de genes ou cromossomos inteiros. A identificação desses agentes é de grande importância, pois, em células somáticas essas alterações estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de neoplasias, devido à ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Existem diferentes tipos de ensaios aplicados na identificação e classificação dessas substâncias. E dentre os testes toxicogenéticos mais utilizados estão o teste de Ames em *Salmonella* Typhimurium, e o teste de micronúcleos, que pode ser realizado tanto *in vitro* em cultura de células, como em animais *in vivo*. Ambos os ensaios fazem parte da bateria de testes realizada para avaliar a mutagenicidade de novos produtos químicos e farmacêuticos, bem como de misturas complexas, como os extratos vegetais.

O teste de Ames é o primeiro ensaio realizado nas baterias de testes toxicológicos requeridos para o registro de medicamentos. A metodologia consiste na exposição de uma cultura de cepas selecionadas de *Salmonella* Typhimurium, que possuem mutações que interferem na síntese bioquímica do aminoácido histidina, à uma amostra líquida do composto de interesse em placas de Petri contendo meio seletivo. Após 48 a 72 horas de exposição, o número de colônias (revertentes) é registrado e os resultados são comparados à quantidade de colônias nas placas do controle negativo. O número de colônias mutantes que crescem na placa será proporcional à quantidade e ao potencial mutagênico da amostra testada.

O teste de micronúcleos foi originalmente desenvolvido por Schimid *et al.* (1971) e modificado por Heddle *et al.* (1973). É um biomarcador indicado para a avaliação de agentes mutagênicos por meio da detecção de danos cromossômicos como os micronúcleos, que são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que foram mal segregados durante a divisão celular, resultando na não incorporação ao núcleo principal das células filhas após a mitose, originando um pequeno núcleo (micronúcleo) separado do núcleo principal. Dessa forma, este ensaio possibilita a detecção de agentes clastogênicos, isto é, que causam quebras na fita de DNA, levando a formação de cromátides acêntricas ou fragmentos cromossômicos, além de uma grande variedade de rearranjos. Podem ser detectados também os agentes aneugênicos, que ocasionam predominantemente má segregação de cromossomos durante a mitose causada por defeitos na função de centrômeros, cinetócoros, microtúbulos, centríolos e falha na detecção da orientação incorreta dos cromossomos. Como consequência, cromossomos inteiros podem não ser segregados durante a anáfase.

Outro teste clássico da toxicogenética, o ensaio de alterações cromossômicas, já foi um dos ensaios mais usados para identificar alterações cromossômicas numéricas e estruturais, podendo estas ser do tipo cromatídica ou cromossômica, sendo ainda um

importante biomarcador utilizado sobretudo para as alterações estruturais. A técnica baseia-se na exposição de células (linfócitos isolados de sangue periférico humano *in vitro* ou células da medula óssea de roedores *in vivo*, por exemplo) à substância de interesse por um tempo determinado, e após esse período ocorre a aplicação da colchicina, composto que impede a formação do fuso acromático, interrompendo a divisão celular na metáfase. Dessa forma, os cromossomos se mantêm em sua máxima compactação, tornando possível a análise e identificação dos danos. No entanto, devido à necessidade de um olhar bem treinado e ao elevado tempo necessário para a análise das metáfases, seu uso vem sendo substituído pelo teste de micronúcleos.

3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINAIS

Desde tempos pré-históricos os seres humanos têm usado produtos naturais, especialmente de origem vegetal, para aliviar sintomas e tratar doenças. Isso ocorre graças às propriedades terapêuticas dos compostos químicos produzidos pelas plantas, denominados fitoquímicos. Essas biomoléculas são utilizadas principalmente para sua sobrevivência e proteção contra agentes estressores. No entanto, a partir da observação de seus efeitos em animais e em humanos, tais compostos passaram a ser explorados para fins medicinais.

Inicialmente, eram usados extratos vegetais contendo misturas complexas. A partir do século XIX, começaram a ser isolados os seus compostos ativos, o que promoveu ao longo dos anos a identificação de uma ampla gama de fitoquímicos, com diversas características químicas e estruturais, como polifenóis, fitoestrógenos, terpenoides, carotenoides, limonoides e fitoesteróis, além de suas propriedades biológicas. Isso permitiu a produção de

diversos fármacos sintetizados a partir de compostos bioativos ou desenvolvidos com moléculas sintéticas análogas que possuem o mesmo mecanismo de ação.

Esses fármacos são usados para prevenir e tratar diversas doenças, possuindo diferentes aplicações terapêuticas, com propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas, antitussígenas, cicatrizantes, antiparasitárias, antimicrobianas, antitumorais, dentre outras. Particularmente para o combate de doenças como o câncer, o estudo de plantas medicinais é crucial, pois essas plantas constituem uma fonte rica e diversificada de compostos bioativos com tal potencial terapêutico.

Muitas plantas possuem propriedades anticancerígenas documentadas, decorrentes de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento de tumores, induzir a apoptose em células cancerígenas e potencializar a eficácia dos tratamentos existentes. Além disso, os produtos naturais derivados de plantas frequentemente apresentam menor toxicidade em comparação com compostos sintéticos, reduzindo os efeitos colaterais adversos nos pacientes.

A pesquisa em plantas medicinais também promove a valorização da biodiversidade e do conhecimento etnobotânico, facilitando a descoberta de novas moléculas com propriedades terapêuticas ainda não exploradas. Portanto, a investigação científica rigorosa de plantas medicinais pode revolucionar o tratamento do câncer e outras doenças, contribuindo significativamente para a saúde global e o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras.

3.1 PREPAROS *IN NATURA*

O consumo de plantas *in natura* oferece uma variedade de benefícios nutricionais, sendo uma prática fundamental para a manutenção de uma dieta saudável e equilibrada. As plantas frescas

são ricas em vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes, que desempenham papéis essenciais na prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e certos tipos de câncer. Além disso, muitas plantas possuem compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antimutagênicas, que contribuem para a promoção da saúde e o bem-estar geral.

Neste sentido, diversas pesquisas básicas realizadas no PBA avaliaram diferentes plantas, em sua forma *in natura*, com propriedades medicinais, funcionais e nutracêuticas, mostrando resultados promissores. Düsman *et al.* (2013) estudaram duas plantas medicinais *in natura*, mil-folhas (*Achillea millefolium*, AM), que é uma erva medicinal nativa da Europa, usada para tratar feridas, distúrbios gastrointestinais e hepatobiliares, inflamações e dor; e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata,* BF), de origem asiática, uma das plantas mais comumente usadas na medicina popular contra o diabetes. Os extratos aquosos dessas plantas (infusão) apresentaram considerável atividade antioxidante devido à presença de flavonoides e compostos fenólicos, que podem ter sido determinantes para o efeito não citotóxico e antimutagênico/protetor sobre a medula óssea de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os resultados indicaram uma redução do percentual de alterações cromossômicas induzidas pelo quimioterápico ciclofosfamida no pré-tratamento (AM 68% e BF 71%), tratamento simultâneo (AM 68% e BF 91%) e pós-tratamento (AM 67% e BF 95%).

Guidotti *et al.* (2014) avaliaram o potencial citotóxico e mutagênico do extrato aquoso (infusão) das folhas e do suco de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), uma fruta rica em sais minerais, carotenoides e vitaminas, em ratos Wistar, tratados via gavagem, em tratamento agudo (24 horas). Os resultados indicaram que não houve alteração significativa nos índices de divisão celular e no número de alterações cromossômicas em células da medula óssea, em nenhum dos tratamentos realizados.

Düsman *et al.* (2014) avaliaram também, entre outras características, o potencial citotóxico e mutagênico dos sucos de uvas (*Vitis labrusca*), obtidos de modo natural (liquefação) ou integral (extração à vapor), sendo as frutas produzidas por agricultura convencional ou orgânica, irradiadas ou não com luz ultravioleta após a colheita. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT e pelo cálculo do índice de proliferação com bloqueio de citocinese, e os efeitos mutagênicos foram medidos pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, em cultura de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC). Os resultados indicaram que nenhum dos sucos foi citotóxico e mutagênico. Além disso, o número médio de micronúcleos foi menor nos sucos produzidos a partir de uvas orgânicas, que apresentaram também uma maior quantidade de ácidos solúveis e compostos fenólicos. Comparados aos sucos naturais, os sucos integrais de uvas convencionais mostraram um número médio maior de micronúcleos, bem como menor estimulação da proliferação celular e níveis mais baixos de compostos bioativos. A irradiação das frutas com luz ultravioleta após a colheita estimulou a síntese de compostos nutracêuticos sem gerar substâncias citotóxicas ou mutagênicas.

Resultados semelhantes foram encontrados para os mesmos sucos estocados por um período de seis meses (Düsman *et al.*, 2017). Além disso, a atividade citotóxica dos sucos de uva também foi avaliada em culturas de células tumorais humanas de fígado (HepG2/C3A) e não tumorais de pulmão (MRC-5), pelo ensaio MTT. Todos os sucos foram citotóxicos para as células tumorais, após 48 horas de tratamento, enquanto que os sucos de uva convencionais foram citotóxicos para as células não tumorais, após 24 horas de tratamento, sendo a proliferação celular restabelecida após 48 horas. Além disso, o suco de uva orgânico estimulou a proliferação das células não tumorais, especialmente aquele produzido a partir de uvas expostas à luz ultravioleta, possivelmente devido ao aumento da quantidade de antioxidantes (antocianinas, resveratrol, flavonoides) nas frutas, que podem ter estimulado o metabolismo celular (Lopes *et al.*, 2019).

Esses achados apoiam o consumo de suco de uva e a aplicação de técnicas de produção de alimentos que aumentem seu valor nutricional e promovam sua produção, comercialização e consumo.

A acerola (*Malpighia glabra*) é uma fruta funcional que atua como adjuvante no tratamento de várias doenças, no combate à anemia, além de possuir propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias, antifúngicas e antioxidantes. Düsman *et al.* (2016) avaliaram o efeito antimutagênico dos sucos natural e de polpa congelada da fruta acerola, no ensaio de alterações cromossômicas em células da medula óssea de ratos Wistar. Os resultados indicaram que o suco de acerola tem potencial antimutagênico, reduzindo significativamente as frequências de alterações cromossômicas induzidas pela ciclofosfamida quando administrado simultaneamente (natural 80% e polpa congelada 88%), em pré-tratamento (natural 86% e polpa congelada 87%) ou em pós-tratamento (natural 90% e polpa congelada 86%). Os autores sugeriram tal efeito em decorrência da atividade antioxidante da fruta e à ação de seus compostos bioativos, que podem ter inibido o metabolismo da ciclofosfamida ou capturado os radicais livres gerados por este quimioterápico.

3.2 FORMULAÇÕES COMERCIAIS

Formulações comerciais elaboradas a partir de plantas medicinais, como extratos secos padronizados, também já foram avaliadas quanto às suas propriedades biológicas de interesse. Peron *et al.* (2013) estudaram o potencial citotóxico, mutagênico e antimutagênico da erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*), que é uma planta medicinal herbácea nativa da Europa, Ásia Ocidental e Norte da África, amplamente reconhecida e utilizada mundialmente para o tratamento de depressão leve a moderada. Para tanto, ratos Wistar receberam uma solução aquosa preparada a partir de uma formulação comercial de folhas secas da planta, em diferentes

concentrações, em tratamento agudo e subcrônico (sete dias). O potencial antimutagênico foi igualmente testado em relação ao quimioterápico ciclofosfamida. Nenhum dos tratamentos apresentou efeito citotóxico e mutagênico. Além disso, esta planta apresentou atividade antimutagênica contra a ação clastogênica da ciclofosfamida, reduzindo o percentual de alterações cromossômicas induzidas em células da medula óssea dos animais em 76%, 95% e 97% nos esquemas de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento, respectivamente.

Igualmente, Almeida *et al.* (2017a, b) investigaram o efeito citotóxico, mutagênico e antimutagênico de formulações comerciais de três plantas medicinais: *Pfaffia glomerata* (PG), conhecida como ginseng brasileiro, tradicionalmente utilizada como restauradora das funções vitais, aumentando o equilíbrio mental, e para o tratamento de diabetes e reumatismo; *Ginkgo biloba* (GB), que é mundialmente utilizado por sua ação potencializadora sobre o sistema nervoso; e *Uncaria tomentosa* (UT), conhecida como unha-de-gato, nativa da Amazônia e tem sido tradicionalmente usada no tratamento da artrite devido às suas propriedades anti-inflamatórias. No teste de mutagenicidade a solução aquosa dos extratos secos padronizados foi administrada aos animais via gavagem, em diferentes concentrações, em tratamento agudo e subcrônico. Para a análise da antimutagenicidade a solução foi administrada via gavagem antes (pré-tratamento), simultaneamente (tratamento simultâneo) ou após (pós-tratamento) a administração do quimioterápico ciclofosfamida, em tratamento agudo. Todas formulações avaliadas não apresentaram potencial citotóxico ou mutagênico e reduziram significativamente a frequência de alterações cromossômicas induzidas pela ciclofosfamida (tratamento simultâneo: PG 87%, GB 75% e UT 54%; pré-tratamento: PG 98%, GB 78% e UT 58%; pós-tratamento: PG 99%, GB 75% e UT 57%), evidenciando as propriedades antimutagênicas dessas plantas.

Óleos vegetais comumente comercializados no Brasil como suplementos alimentares encapsulados também são fontes de produtos naturais cujas propriedades merecem destaque. Heck *et al.* (2022) analisaram a atividade antimutagênica dos óleos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e de linhaça (*Linum usitatissimum*), em células da medula óssea de ratos Wistar. Nenhum dos tratamentos realizados apresentou efeito citotóxico ou mutagênico. Além do mais, os tratamentos com o óleo associado ao quimioterápico ciclofosfamida reduziram significativamente os danos cromossômicos induzidos pelo clastógeno. Para os grupos tratados com óleo de copaíba, o percentual de redução foi de 77% para o tratamento simultâneo, 83% para o pré-tratamento e 75% para o pós-tratamento, enquanto que nos grupos tratados com óleo de linhaça foi de 94% para o pré-tratamento e 96% para o tratamento simultâneo e pós-tratamento.

Os fitoesteróis podem apresentar diversas propriedades bioativas, como exemplo, os insaponificáveis de abacate (*Persea americana*) e soja (*Glycine max*), que são comercializados no Brasil como fármacos utilizados no tratamento da osteoartrite. Dentre seus componentes, destacam-se β-sitosterol, campesterol e estigmasterol, fitoesteróis conhecidos por reduzir a concentração de colesterol plasmático, dentre outras aplicações. A fim de identificar outras propriedades de interesse, Cruz e Vicentini (2022) investigaram os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos dos fitoesteróis presentes no fármaco Piascledine (PSD®300), nas linhagens celulares tumorais humanas HepG2/C3A e MCF-7, e em cultura de linfócitos humanos. O efeito citotóxico foi observado para as linhagens tumorais de fígado e mama, nas concentrações ≥0,1µg/mL e ≥15µg/mL, respectivamente. Para linfócitos humanos, o mesmo efeito foi observado nas concentrações acima de 60µg/mL, além da produção de espécies reativas de oxigênio, quebras no DNA e formação de micronúcleos. Dessa forma, os resultados mostraram que os insaponificáveis de abacate e soja são capazes de interferir no metabolismo celular, podendo atuar como um possível agente antitumoral.

Extratos naturais também podem ser obtidos a partir de resíduos produzidos durante o processamento de frutas e vegetais, por exemplo, o bagaço de uva proveniente da produção de sucos e vinhos, formado majoritariamente por cascas e sementes, o que gera uma grande quantidade de resíduos sólidos. Esse bagaço pode ser uma matéria-prima promissora para extração de substâncias de interesse, como polifenóis, que possuem reconhecida atividade antioxidante. Nesse sentido, Rocha *et al.* (2023) investigaram a atividade antioxidante e antiproliferativa de extratos de bagaço de uva, em cultura de células HTC. Os resultados mostraram que os extratos possuem atividade antioxidante e são capazes de induzir mortalidade em células tumorais. Portanto, a utilização desses resíduos para obtenção de compostos bioativos foi efetiva, podendo representar um ganho econômico e científico, reduzindo também os impactos ambientais causados por esses resíduos.

3.3 COMPOSTOS ISOLADOS

Tão importante quanto a avaliação de extratos vegetais que possuem misturas complexas, é a análise de seus fitoquímicos isolados. Os compostos fenólicos, por exemplo, têm se destacado por suas propriedades terapêuticas, tais como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antigenotóxica e anticarcinogênica, sendo aplicados no tratamento de doenças circulatórias e cardiovasculares, câncer, diabetes e Alzheimer.

Os flavonoides constituem a maior classe de polifenóis de baixo peso molecular e são utilizados na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. A naringina é um flavonoide pertencente à classe das flavanonas, encontrado em muitos vegetais, principalmente em frutas cítricas, destacando-se por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. Dessa forma, buscando ampliar a compreensão do seu mecanismo de ação e atividade antitumoral, o potencial citotóxico (ensaio MTT) da naringina

foi avaliado em diferentes células tumorais: HepG2/C3A, MCF-7 (Buzo *et al.*, 2015) e 786-O, além de linfócitos humanos obtidos de sangue periférico (Correia *et al.*, 2023). Os resultados mostraram que a naringina foi citotóxica para as linhagens HepG2/C3A (250μM) e 786-O (50 a 250 μM), bem como linfócitos humanos (5 a 250 μM); porém, não foi observada citotoxicidade na linhagem tumoral de mama, que é conhecida por sua resistência a diferentes tratamentos. Portanto, o tratamento com naringina pode trazer resultados diferentes dependendo do nível de sensibilidade do tipo celular avaliado.

Outro flavonoide amplamente conhecido por suas aplicações terapêuticas é a taxifolina, que apresenta propriedades antioxidantes, citoprotetoras, genoprotetoras, antibacterianas, cardioprotetoras e reguladoras dos níveis de colesterol, o que despertou o interesse para o desenvolvimento de novas formas de terapia e prevenção de doenças. Nesse sentido, Syritiuk e Vicentini (2017) investigaram o potencial citotóxico e genotóxico da taxifolina na linhagem tumoral renal 786-O, e observaram que este flavonoide não apresentou atividade citotóxica em nenhuma das concentrações testadas (50 a 500 μM) no ensaio MTT. Apesar disso, causou genotoxicidade na maior concentração avaliada (500μM) no ensaio Cometa, possivelmente devido a atividade pró-oxidante desempenhada pelo flavonoide quando encontrado em concentrações mais elevadas.

O ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) é um composto fenólico de interesse comercial, utilizado na indústria alimentícia como aromatizante, conservante e aditivo alimentar, sendo encontrado em diversos cereais, grãos integrais, frutas, ervas, chá verde, cervejas e vinhos. Pensando em sua ampla utilização, no trabalho desenvolvido por Almeida, Cavalcante e Vicentini (2016), o ácido vanílico foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico e mutagênico em cultura de células HTC, bem como sua ação antimutagênica contra o indutor de danos benzopireno. Foi observado pelo ensaio MTT que apenas a concentração mais elevada (500μM) promoveu ação citotóxica, porém, no método de exclusão por azul de Trypan,

nenhuma concentração comprometeu a integridade da membrana plasmática. No teste de micronúcleos, as concentrações de 10 e 50 µM não apresentaram efeitos mutagênicos, sendo a concentração de 10µM escolhida para investigar o potencial antimutagênico. Os tratamentos simultâneo, pré- e pós-tratamento com ácido vanílico associado ao benzopireno reduziram significativamente a frequência de micronúcleos induzidos em 58%, 46% e 22%, respectivamente, na linhagem celular estudada.

Similarmente, Cavalcante *et al.* (2017) investigaram os mesmos efeitos do composto fenólico ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), um derivado biossintético do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico). Os resultados do trabalho mostraram que o ácido gentísico não exibiu efeito citotóxico para as células HTC, apresentando atividade mutagênica apenas na maior concentração testada (8µg/mL). A atividade antimutagênica foi observada no tratamento simultâneo, promovendo redução da frequência de micronúcleos em 79%. Os esquemas de pré- e pós-tratamento não exibiram resultados estatisticamente significativos, mas reduziram o dano induzido em 11% e 21%, respectivamente.

Os alcaloides quaternários benzofenantridinas são outro grupo de metabólitos secundários vegetais de grande interesse devido às suas propriedades terapêuticas, dentre as quais destacam-se as atividades antimicrobianas, antifúngicas e anti-inflamatórias. Além disso, alguns estudos também identificaram o potencial quimioterápico dos alcaloides sanguinarina (13-metil[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]fenantridínio) e cheleritrina (1,2-dimetoxi-N-metil[1,3]benzodioxolo[5,6-c]fenantridínio), comuns em plantas das famílias Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae e Rutaceae. O potencial antitumoral desses dois alcaloides foi investigado por Almeida *et al.* (2017), em cultura de células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), por meio dos ensaios MTT, Cometa e citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a sanguinarina foi citotóxica para as células MCF-7 nas concentrações a partir de 7,5µM,

enquanto a cheleritrina foi citotóxica nas concentrações de 10 e 20 µM. O ensaio Cometa indicou que apenas a sanguinarina foi genotóxica para a linhagem tumoral. As análises por citometria de fluxo não indicaram atrasos no ciclo celular, porém, a sanguinarina induziu um aumento da população de células em sub-G_1, indicando morte celular, o que sugere que este alcaloide possa ser melhor explorado no desenvolvimento de terapias alternativas contra o câncer de mama.

Outro composto polifenólico estudado por Yoshimoto-Higaki e Vicentini (2020) foi o neolignoide magnolol, isolado do córtex de magnólia (*Magnolia officinalis*), que é muito utilizado na medicina tradicional chinesa devido aos seus efeitos sobre os sistemas digestório, nervoso e cardiovascular, além de exercer atividade antibacteriana, antitumoral, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante. A avaliação da atividade antitumoral do magnolol indicou citotoxicidade (ensaio MTT) e indução de danos primários ao DNA (ensaio Cometa) em células tumorais humanas de fígado, mama e rim, além de linfócitos isolados de sangue periférico, em diferentes concentrações. Análises por citometria de fluxo não indicaram atrasos no ciclo celular nem indução de apoptose para as células renais e linfócitos, porém, o magnolol aumentou a frequência de células em apoptose tardia (fígado) e induziu a parada de ciclo celular em G_2/M, aumentando também a quantidade de células em sub-G_1 (mama). Foi observado também um aumento de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas em linfócitos (teste de micronúcleos com bloqueio de citociense), sugerindo que os efeitos moleculares do polifenólico precisam ser melhor esclarecidos.

Alguns complexos proteicos de origem vegetal também se destacam por suas aplicações industriais e terapêuticas, como é o caso da bromelina, um composto proteico presente em grande quantidade no abacaxi (*Ananas comosus*), cuja ação enzimática é amplamente empregada na indústria de alimentos, têxtil e cosmética, além de se destacar por sua ação anti-inflamatória e antitumoral. Nesse sentido, Godoy e Vicentini (2018) investigaram a ação da

bromelina nas células tumorais 786-O e HepG2/C3A. Os resultados mostraram a ação citotóxica do composto em ambas as linhagens (40-100 µg/mL), induzindo alterações no ciclo celular, apoptose e necrose, e ainda ação genotóxica, reafirmando o potencial antitumoral deste composto. Posteriormente, o potencial genotóxico da bromelina foi avaliado em cultura de linfócitos humanos, mostrando que o composto foi capaz de promover quebras no DNA, porém, não induziu a formação de micronúcleos (Pereira *et al*., 2020; Kodama *et al*., 2021). Com base nesses promissores resultados *in vitro*, Godoy e Vicentini (2022) realizaram uma avaliação *in vivo* da genotoxicidade e efeito protetor da bromelina contra danos no DNA induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida. Os resultados mostraram que a bromelina possui a capacidade de causar danos no DNA em diferentes células de ratos Wistar. Porém, em menores concentrações o composto também exibe ação protetora contra os danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida. Tais dados mostram a importância da avaliação toxicogenética *in vitro* e *in vivo* de compostos de interesse.

O isolamento e a caracterização química de moléculas costuma ser um processo trabalhoso e que requer equipamentos especializados. Além do mais, o elevado custo de aquisição da substância já purificada, quando disponível, pode dificultar ainda mais o desenvolvimento das pesquisas básicas. Nestes casos, uma caracterização geral de uma fração de interesse pode auxiliar no entendimento dos possíveis componentes bioativos de um extrato vegetal. Camargo *et al.* (2020) elaboraram extratos metanólicos e etanólicos a partir do gengibre (*Zingiber officinale*), que possui propriedades antioxidantes, antibióticas, imunomoduladoras, hipoglicêmicas e diuréticas, entre outras. Nestes extratos, apesar de não terem sido caracterizadas moléculas individuais, foi identificada a presença de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas. Além disso, a fração etanólica 70:30 foi testada quanto à atividade citotóxica em células tumorais humanas de rim (786-O), pelo ensaio MTT, e os resultados indicaram atividade antitumoral para todas as concentrações testadas, nos diferentes tempos de exposição.

Igualmente, Vendruscolo *et al.* (2022) avaliaram o efeito citotóxico de frações semipurificadas e de compostos isolados da planta popularmente conhecida como canela-de-velho (*Croton echioides*), pertencente à família Euphorbiaceae, conhecida por possuir compostos com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas. A partir das frações semipurificadas de hexano, foram identificados os seguintes compostos diterpenos: clerodan 15,16-epóxi-3,13, 14-neo-clerodatrien-17,18-dicarboxilato e nasimalun B (CEH-1); clerodan 15,16-epóxi-3,13 e metil 14-neo-clerodatrien-17-carboxi-18-carboxilato (CEH-2); mistura de equilíbrio de ptichonal e hemiacetal de ptichonal (CEH-3); éster metílico do ácido hardwickico (CEH-4); e lupeol. Foi também observado que as frações semipurificadas de hexano e de acetato de etila apresentaram citotoxicidade para células HTC em concentrações acima de 200µg/mL. Dos compostos isolados o lupeol teve efeito citotóxico em todas as concentrações e tempos testados. Os diterpenos CEH-1 e CEH-4 também apresentaram atividade antiproliferativa após 48 horas de exposição. No entanto, os diterpenos CEH-2 e CEH-3 não apresentaram efeito citotóxico para células HTC. Esses resultados possibilitaram a identificação de compostos bioativos com atividade citotóxica/antiproliferativa, auxiliando na busca por novas moléculas eficazes no tratamento do câncer.

Além do isolamento de compostos de interesse, há também a possibilidade de modificá-los sinteticamente por meios químicos. Tais alterações podem reduzir os problemas farmacocinéticos e melhorar as propriedades biofarmacêuticas, conforme foi observado no trabalho de Santos *et al.* (2023). Os autores avaliaram o potencial citotóxico da capsaicina, um capsaicinoide responsável pelo sabor picante das pimentas (gênero *Capsicum*), que possui um alto potencial terapêutico, comparando-o aos seus análogos N-benzilbutanamida (AN1), N-(3-metoxibenzil) butanamida (AN2), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil) butanamida (AN3), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil) hexanamida (AN4)

e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil) tetradecanamida (AN5), em células do hepatoma de *Rattus norvegicus*, pelo ensaio MTT. Os resultados mostraram que a capsaicina foi citotóxica para células HTC, em concentrações a partir de 100μM (24 horas); AN1 apresentou citotoxicidade em 150 e 175 μM (48 horas), AN2 em 50μM (24 horas) e 10, 25, 50 e 75 μM (48 horas), AN4 em 175μM (24 horas) e AN5 em 50μM (48 horas), sugerindo que a alteração da estrutura química da capsaicina influenciou na sua atividade citotóxica. No caso do análogo AN2, por exemplo, a remoção do radical hidroxila do grupo vanilil da capsaicina, juntamente com a redução da cadeia acila para 3 carbonos, promoveu aumento da citotoxicidade, comprovando que as mudanças químicas na capsaicina alteraram sua atividade biológica.

Desta maneira, torna-se evidente que por meio dos ensaios de toxicogenética, seja possível identificar novas propriedades de interesse, agregando valor econômico e potencial biotecnológico aos compostos estudados. Viega *et al.* (2023), por exemplo, mostraram os primeiros indícios da atividade citotóxica dos compostos quassina e paraína, substâncias isoladas a partir do extrato bruto da planta medicinal pau-tenente ou pau-amargo (*Picrasma crenata*), pertencente à família Simaroubaceae. Esta árvore é encontrada em diferentes estados brasileiros e possui muitas aplicações na medicina popular, como atividade antimalárica, anti-sifilítica, tônica, inseticida, hipoglicêmica e antiespasmódica. A quassina e a paraína são quassinoides, pertencentes ao grupo das lactonas triterpênicas degradadas, que proporcionam um sabor amargo e característico. A atividade antitumoral foi demonstrada em diferentes concentrações dos compostos, em células HTC, pelo ensaio MTT, sendo este o primeiro registro da literatura quanto ao potencial citotóxico destes fitoquímicos.

3.4 EFEITO RADIOPROTETOR DE PRODUTOS NATURAIS

Diversos produtos naturais têm demonstrado um efeito radioprotetor significativo, oferecendo uma alternativa promissora para a mitigação dos danos causados pela radiação ionizante. Compostos bioativos presentes em diversas plantas medicinais, como polifenóis, flavonoides e terpenoides, possuem propriedades antioxidantes que podem neutralizar os radicais livres gerados pela exposição à radiação. Esses compostos não apenas protegem as células saudáveis dos efeitos nocivos da radiação, mas também promovem o reparo do DNA danificado e modulam a resposta inflamatória. Assim, a investigação contínua e o desenvolvimento de produtos naturais com propriedades radioprotetoras podem ser fundamentais para melhorar a segurança e a eficácia dos tratamentos radioterápicos, bem como para a proteção contra exposições acidentais à radiação.

A acerola (*Malpighia glabra*) é um fruto nativo da América Central que possui elevadas concentrações de antioxidantes como a vitamina C, vitaminas A, B1 e B2, bem como carotenoides, antocianinas, proteínas, gorduras, carboidratos e minerais, sendo o β-caroteno um dos carotenoides antioxidantes mais potentes. Dessa forma, considerando o potencial de fitoquímicos de interesse, no trabalho desenvolvido por Almeida *et al.* (2013), foi investigada a ação antimutagênica e radioprotetora da acerola e do β-caroteno, contra os efeitos do radiofármaco iodo-131, em cultura de células HTC. Os testes *in vitro* mostraram que a acerola e o β-caroteno nas concentrações avaliadas não foram citotóxicos e não induziram a formação de micronúcleos. Além disso, a acerola reduziu os danos induzidos pelo iodo-131, sugerindo que a suplementação da dieta com acerola pode beneficiar pacientes expostos ao radioterápico. De maneira similar, Düsman *et al.* (2014) demonstraram a atividade radioprotetora do suco de acerola, sobre a medula óssea de ratos Wistar. Na exposição aguda, a radioproteção se deu, provavelmente, pelas propriedades antioxidantes da fruta. Já, para a exposição subcrônica,

o tratamento contínuo apresentou uma atividade radioprotetora eficaz, significativamente diferente do tratamento apenas com o radiofármaco. O pré-tratamento e o tratamento simultâneo com o suco de acerola diminuíram o número de alterações cromossômicas induzidas pela radiação ionizante, enquanto que o pós-tratamento não produziu tal efeito.

Berti *et al.* (2014) também realizaram ensaios *in vivo* em ratos Wistar, investigando a ação antimutagênica e radioprotetora do β-caroteno contra o iodo-131 na dose utilizada durante o tratamento do hipertireoidismo. Foram realizados tratamentos agudo e subcrônico com 8mg/mL de β-caroteno e 25μCi de iodo-131, com diferentes tipos de aplicação (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento). Os resultados mostraram que o β-caroteno foi efetivo na redução de danos induzidos pelo radioisótopo após exposição aguda e subcrônica, em células da medula óssea, nos diferentes tratamentos. Desta forma, a atividade radioprotetora e antimutagênica pode ser usada como uma forma de proteção à saúde durante o diagnóstico e terapia de distúrbios na tireoide.

Heck e Vicentini (2014) avaliaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos do cacau (*Theobroma cacao*), do seu derivado chocolate meio amargo e do seu flavonoide epicatequina, bem como seus efeitos radioprotetores em relação ao iodo-131, em cultura de células HepG2/C3A. Foi observado que o cacau, a epicatequina e o chocolate meio amargo interferiram no metabolismo celular em concentrações elevadas (≥ 145μg/mL), e somente a epicatequina exerceu atividade genotóxica (72,5μg/mL). Em relação a radioproteção, baixas concentrações dos compostos reduziram significativamente os danos no DNA causados pelo iodo-131. Posteriormente, Rocznieski *et al.* (2019) observaram a ação citotóxica da epicatequina na linhagem tumoral MCF-7 em concentrações acima de 29μg/mL, e na linhagem 786-O em concentrações a partir de 14,5μg/mL, além de genotoxicidade em ambas as linhagens, em todas as concentrações avaliadas.

Lopes *et al.* (2022) avaliaram os efeitos citoprotetores/radioprotetores de sucos de uva integral fabricados em sistemas de produção convencional ou orgânico, expostos ou não à radiação ultravioleta. Os resultados mostraram que o radiofármaco iodo-131 apresentou efeito citotóxico para a linhagem tumoral HepG2/C3A, em concentrações acima de 1,85MBq/mL, após 24 e 48 horas de tratamento, ainda que todas as concentrações (0,0037 a 7,40 MBq/mL) tenham sido citotóxicas para a linhagem não tumoral MCR-5, após 48 horas. Os sucos de uva não interferiram no efeito citotóxico da dose terapêutica de iodo-131 para as células tumorais, após 48 horas de tratamento, e protegeram as células não tumorais, provavelmente devido ao seu alto poder antioxidante. De acordo com seu potencial nutracêutico, atividade antioxidante e radioprotetora, esses dados estimulam estudos *in vivo* sobre o uso de produtos naturais como radioprotetores, a exemplo do suco de uva, a fim de confirmar o potencial benéfico em organismos vivos, principalmente para àqueles que estão sob radioterapia.

4. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE FUNGOS

No início do século XX, os cientistas começaram a compreender que as plantas podem ser reservatórios de um número infinito de microrganismos, comumente chamados de endófitos, que habitam tecidos internos das plantas em uma associação simbiótica, podendo passar a maior parte de seu ciclo de vida dentro das plantas hospedeiras. Aproximadamente um milhão de espécies endofíticas já foram identificadas no reino vegetal. Os metabólitos produzidos por endófitos podem ser influenciados pela química de suas plantas hospedeiras, já que durante o período de coevolução, alguns dos endófitos desenvolveram a capacidade de produzir compostos

biologicamente ativos que são semelhantes ou idênticos aos de suas plantas hospedeiras. Vários estudos indicaram a possibilidade de plantas medicinais hospedarem fungos endofíticos capazes de produzir produtos naturais farmacologicamente importantes. Neste sentido, é razoável postular que as propriedades medicinais dessas plantas podem ser devido aos endófitos que residem nelas, uma vez que a interação entre plantas e endófitos é regulada por genes de ambos os organismos e influenciada por fatores ambientais.

Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos foram identificados como fontes contínuas e produtivas de agentes anticancerígenos que podem ter um impacto profundo na medicina moderna para o avanço de medicamentos como os anticancerígenos. Na era moderna, a descoberta de medicamentos potentes com efeitos colaterais mínimos, atua como uma alternativa aos métodos convencionalmente usados para o controle e tratamento de doenças. No ano 2000 estimou-se que aproximadamente 57% dos compostos em ensaios clínicos para terapia do câncer eram de produtos naturais e seus derivados. Desde então, inúmeras pesquisas vêm mostrando que os compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos apresentam resultados promissores na área da saúde, com estudos apontando para o potencial antimicrobiano, antioxidante, antineoplásico, imunossupressor e inibidor de acetilcolinesterase. Sugerindo que compostos bioativos naturais isolados de endófitos podem servir como fontes alternativas para a descoberta de novos medicamentos. O taxol, vincristina, etoposídeo, irinotecano, topotecano e vimblastina são alguns dos medicamentos anticancerígenos derivados de plantas, e eventualmente, seus endófitos associados, estão em uso clínico para o tratamento de vários tipos de câncer.

O isolamento de compostos bioativos naturais permite a identificação de suas propriedades farmacológicas, oferecendo uma rota para a descoberta de candidatos a medicamentos. A maioria dos estudos que tratam da citotoxicidade de metabólitos de fungos endofíticos utiliza ensaios antiproliferativos em linhagens celulares

de câncer, como descrito anteriormente. Os resultados do primeiro trabalho realizado no PBA abordando o efeito antitumoral de substâncias isoladas de fungos endofíticos foram publicados por Orlandelli *et al.* (2017). O estudo relatou a caracterização química e a atividade antiproliferativa de exopolissacarídeos produzidos por culturas dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp., isolados da planta medicinal pimenta-de-macaco ou falso-jaborandi (*Piper hispidum*). Ambas as cepas produziram um exopolissacarídeo bruto que, após cromatografia de exclusão por tamanho, mostrou conter um heteropolissacarídeo (galactose, glicose e manose) e um glucano de alto peso molecular. Dados de análise de metilação e espectroscopia indicaram que o glucano purificado consistia em uma cadeia principal de ligações glucopiranosil β-(1→3) substituída em O-6 por resíduos de glucosil. A atividade antitumoral foi avaliada pelo ensaio MTT, sendo que ambos β-glucanos apresentaram atividade antiproliferativa contra células tumorais MCF-7 e HepG2-C3A, após 24 e 48 horas de tratamento (400μg/mL), exibindo uma inibição da proliferação celular de 58% (24 horas) e 74% (48 horas) para células MCF-7, e 61% (24 horas) e 83% (48 horas) para células HepG2-C3A. Esses resultados representaram os primeiros relatos sobre a caracterização e o efeito antiproliferativo de β-glucanos do endófito *Diaporthe*, expandindo também o conhecimento sobre polissacarídeos bioativos de fontes endofíticas.

Similarmente, Silva *et al.* (2020) isolaram o fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus* do arbusto flor-camarão (*Justicia brandegeana*), sendo selecionado para a avaliação de seus metabólitos secundários. As análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa revelaram o principal componente do extrato, a metil-latodoratina, além de alguns derivados. A atividade antitumoral do extrato foi avaliada em células HepG2/C3A, pelo ensaio MTT. O maior efeito citotóxico do extrato foi observado após 48 horas de tratamento, na maior concentração avaliada (1.000μg/mL), com 50% de inibição da proliferação das células tumorais.

Espírito Santo *et al.* (2023) descreveram o perfil químico de metabólitos extraídos por acetato de etila a partir de uma cepa do fungo endofítico *Colletotrichum siamense* associado ao café (*Coffea arabica*) e seu potencial contra células tumorais humanas e bactérias de importância médica e alimentar. O teste de citotoxicidade em células tumorais MCF-7 e HepG2/C3A foi realizado pelo ensaio MTT, apresentando resultados promissores após 24 horas de tratamento, com inibição de 50% da viabilidade celular para ambas as linhagens, a partir da concentração de 200μg/mL. Análises de cromatografia líquida e espectrometria de massa detectaram como principais compostos presentes no extrato metabólico o pirocatecol, o álcool gentisil e o ácido α-linolênico, que estão associados a diferentes mecanismos de ação contra células tumorais. Estes resultados sugerem que estes compostos de interesse farmacêutico e industrial, podem ser efetivamente produzidos pelo endófito, tornando-se uma alternativa química e economicamente viável, corroborando seu potencial em aplicações biotecnológicas.

A caracterização química de substâncias isoladas nem sempre pode ser realizada, já que envolve técnicas demasiadamente laboriosas e de elevado custo. Neste sentido, é igualmente relevante avaliar um extrato fúngico complexo, semelhante ao estudo realizado por Mendonça *et al.* (2023). Os autores estudaram as atividades biológicas do extrato seco do corpo de frutificação do cogumelo-rei (*Ganoderma lucidum*), um cogumelo bioativo com propriedades medicinais, conhecido por seus efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios, hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicos e hepatoprotetores. Neste estudo, os efeitos foram avaliados em células humanas tumorais de fígado (HepG2/C3A) e rim (786-O) e em linfócitos isolados de sangue periférico, sendo realizados ensaios de citotoxicidade MTT, viabilidade celular com método de exclusão por azul de Trypan, ensaio de genotoxicidade Cometa e teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), *in vitro*. O extrato foi tóxico para as células tumorais,

diminuindo sua viabilidade ao aumentar a produção de ROS e induzir danos ao DNA. Em contraste, apenas altas concentrações foram tóxicas para os linfócitos. Danos primários ao DNA dos linfócitos foram induzidos pelo extrato seco apenas na maior concentração testada (40μg/mL), enquanto que nas linhagens tumorais, concentrações maiores que 0,5μg/mL foram genotóxicas. Assim, este cogumelo tem o potencial de ser desenvolvido biotecnologicamente como um agente terapêutico para doenças como o câncer.

5. NANOBIOTECNOLOGIA E SAÚDE

Recentemente, as pesquisas em terapia do câncer procuram uma maneira mais eficaz e menos arriscada de substituir os tratamentos convencionais. O principal problema com os tratamentos de câncer atualmente utilizados, são os seus efeitos colaterais adversos nos tecidos saudáveis. A nanotecnologia, particularmente as aplicações baseadas em nanopartículas magnéticas, pode ajudar a superar esses problemas. O interesse por nanopartículas magnéticas tem crescido continuamente devido as suas características físico-químicas únicas, incluindo propriedades magnéticas aprimoradas, estabilidade química, baixa toxicidade e biodegradabilidade. Em geral, seu comportamento magnético depende do tamanho, forma e estrutura cristalina das partículas. Na verdade, elas oferecem várias possibilidades de uso no campo biomédico, e devido ao seu comportamento superparamagnético, essas nanopartículas podem ser manipuladas por campos magnéticos externos e, consequentemente, serem precisamente depositadas em um local desejado.

Além disso, elas são vistas como a próxima geração de sistemas específicos de entrega de medicamentos, precisamente porque, sob a ação de campos magnéticos apropriados, essas nanopartículas magnéticas podem ser conduzidas a um alvo específico. Sabe-se

que uma das limitações na entrega de medicamentos é a incapacidade de transportá-los diretamente para o centro da doença ou local do tumor. No entanto, ao usar nanopartículas magnéticas, esse problema pode ser superado, o que reduziria a toxicidade sistêmica e os efeitos colaterais.

Com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico dessas nanopartículas, Endo *et al.* (2020a, b) avaliaram alterações morfológicas e o potencial citotóxico de nanopartículas de magnetita, revestidas ou não pelo polissacarídeo quitosana, em células tumorais de fígado (HepG2/C3A) e mama (MCF-7). Os resultados mostraram que nenhum dos tratamentos com nanopartículas (0,75-50 μg/mL) foi capaz de induzir citotoxicidade, pelo ensaio MTT, ou alterações morfológicas, pela análise em microscopia eletrônica de varredura, nas duas linhagens tumorais avaliadas. Estes resultados sugeriram que os efeitos das nanopartículas magnéticas, revestidas ou não pelo polissacarídeo, podem variar de acordo com o tecido avaliado.

Aprofundando estas observações, Hernandes *et al.* (2022) descreveram a síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita (NP-Fe_3O_4) e de magnetita revestida com sílica (NP-Fe_3O_4/SiO_2), bem como sua biocompatibilidade em termos de viabilidade celular (ensaio MTT). Células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foram utilizadas como modelo tumoral, enquanto que queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foram utilizados como modelo não tumoral. Os resultados forneceram uma visão sobre a aplicabilidade dessas nanopartículas magnéticas como sistema de transporte de medicamentos. Ambas as nanopartículas, NP-Fe_3O_4/SiO_2 e NP-Fe_3O_4, não foram citotóxicas para as duas linhagens avaliadas. Após a carga do medicamento antitumoral doxorrubicina (Dox) em NP-Fe_3O_4/Dox e NP-Fe_3O_4/SiO_2/Dox, a citotoxicidade para as células MCF-7 aumentou de maneira dependente da dose e do tempo de exposição, nas concentrações de 5 e 10 μg/mL. As células HaCaT também apresentaram uma diminuição na viabilidade celular; no entanto, a citotoxicidade foi menor do que a encontrada para a

linhagem tumoral. Assim, este estudo mostrou a biocompatibilidade de NP-Fe_3O_4/SiO_2 e NP-Fe_3O_4, destacando a importância do revestimento de sílica nas nanopartículas magnéticas e reforçando a possibilidade de seu uso como sistema de transporte de medicamentos contra células de adenocarcinoma de mama.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os complexos derivados de plantas contêm uma ampla variedade de constituintes biologicamente ativos, exibindo propriedades biológicas diversas e únicas. Devido a sua natureza geralmente não tóxica, esses constituintes são promissores no tratamento de diversas doenças em todo o mundo. Diversos tratamentos para doenças crônicas têm incorporado o uso de plantas medicinais como terapias complementares. O consumo regular de frutas, grãos e vegetais tem demonstrado reduzir a incidência de várias disfunções metabólicas. No entanto, nem todos os compostos naturais apresentam benefícios claros. Portanto, uma investigação aprofundada sobre o uso de plantas tradicionais como fonte de complexos biologicamente ativos é essencial.

Nos últimos anos, foram isolados fungos endofíticos com grande potencial biotecnológico e identificar fungos endofíticos, e suas substâncias bioativas, com capacidade de reduzir os efeitos toxicogenéticos de vários xenobióticos tem se tornado de grande importância. Estes compostos bioativos têm apresentado resultados promissores na área da saúde. Além disso, os fungos endofíticos possuem sistemas enzimáticos com capacidade de atuar na degradação de inúmeros poluentes, podendo ter potencial para biodegradação e biorremediação de corantes têxteis, por exemplo, podendo ser também, eficientes para a redução dos efeitos nocivos sobre o material genético.

Além disso, é crucial realizar investigações adicionais e revisar a segurança do consumo de fitoquímicos, bem como a nutrivigilância, especialmente para seus usos como medicamentos ou suplementos nutricionais. Compreender a segurança geral e a dosagem adequada de cada fitoquímico é de suma importância. Atualmente, há uma lacuna significativa na investigação sobre as preocupações de segurança e avaliação dos riscos relacionados ao uso dietético ou terapêutico de muitos fitoquímicos. Estudos futuros são necessários para abordar essas preocupações de segurança e para implementar regulamentações adequadas sobre o uso de fitoquímicos.

Os trabalhos realizados no PBA, apresentados no presente capítulo, deixam claro a importância da aplicação de testes clássicos de genética toxicológica na investigação do potencial biotecnológico de compostos de interesse. No entanto, atualmente novas técnicas moleculares vêm sendo aplicadas e incorporadas às baterias toxicogenéticas, permitindo uma avaliação mais aprofundada. Nesse sentido, a aplicação das ômicas na toxicogenética tem focado principalmente na investigação do transcriptoma, do proteoma e do metaboloma. A transcriptômica é responsável pela avaliação da expressão e regulação gênica de diversas vias biológicas, buscando a identificação de perfis (impressões digitais) modulados por compostos com potencial biotecnológico, melhorando assim, a sua identificação e classificação. Já, a proteômica estuda o resultado da expressão desses genes, determinando a expressão de proteínas após a exposição aos agentes avaliados. Por fim, a metabolômica permite a identificação e a quantificação de metabólitos, produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica, possibilitando a identificação de novos biomarcadores e de mecanismos de toxicidade. Portanto, tais técnicas têm mudado consideravelmente a toxicogenética, permitindo uma avaliação mecanicista da ação dos compostos com potencial biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 17, p. 1213-1221, 2016.

AHMAD, Z.; HASSAN, S.S.; AZIM, S.A. Therapeutic connection between dietary phytochemicals and ATP synthase. **Current Medicinal Chemistry**. v. 24, n. 35, 2017.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALMEIDA, I. V.; CAVALCANTE, F. M. L.; VICENTINI, V. E. P. Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in HTC cells: cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. gmr15049388, 2016.

ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN, E.; HECK, M. C.; PAMPHILE, J. A.; LOPES, N. B.; TONIN, L. T. D.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxic and mutagenic effects of iodine-131 and radioprotection of acerola (*Malpighia glabra* L.) and beta-carotene in vitro. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 6402-6413, 2013.

ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN, E.; MATTGE, G.; TOLEDO, F.; REUSING, A. F.; VICENTINI, V. E. P. In vivo antimutagenic activity of the medicinal plants *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and *Ginkgo biloba*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-11, 2017.

ALMEIDA, I. V.; FERNANDES, L.; BIAZI, B.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of the anticancer activities of the plant alkaloids sanguinarine and chelerythrine in human breast adenocarcinoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1586-1592, 2017.

ALMEIDA, I. V.; SOARES, L. C.; LUCIO, F. T.; CANTAGALLI, L. B.; REUSING, A.F.; VICENTINI, V. E. P. Chemotherapeutical effects of the herbal medicine *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-10, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, 2013. Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>. Acesso em: 30 mai. 2024.

SUMÁRIO

BERTI, A. P.; DÜSMAN, E.; MARIUCCI, R. G.; LOPES, N. B.; VICENTINI, V. E. P. Antimutagenic and radioprotective activities of beta-carotene against the biological effects of iodine-131 radiopharmaceutical in Wistar rats. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 2248-2258, 2014.

BRASIL. **Resolução Normativa CONCEA Nº 58**. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências, 2023. Disponível em: < https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_Concea_n_58_de_23022023.html>. Acesso em: 30 mai. 2024.

BRUTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2018.

BUZO, M. G.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da atividade citotóxica e genotóxica do flavonoide naringina em células tumorais de fígado e mama**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

CAMARGO, J. N. A.; BERTAN, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; DÜSMAN, E.; TONIN, L. T. D. Antitumoral activity, antioxidant capacity and bioactive compounds of ginger (*Zingiber officinale*). **Acta Scientiarum Technology (Online)**, v. 42, p. 1-11, 2020.

CAVALCANTE, F. M. L.; ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN, E.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of the gentisic acid on HTC cells. **Drug and Chemical Toxicology,** v. 1, p. 1-7, 2017.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemistry and Pharmacy**. v. 66, n. 2, p. 281-87, 2003.

CORREIA, G. O.; GODOY, M. A. F.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da atividade citotóxica do composto natural naringina em células de carcinoma renal 786-0 e linfócitos humanos**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biotecnologia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023.

CRUZ, K. A. L.; VICENTINI, V. E. P. **Bioprospecção de fitoesteróis presentes nos insaponificáveis de abacate e soja no metabolismo de células**. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2022.

SUMÁRIO

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; COELHO, A. C.; BALBI, T. J.; DÜSMAN, L. T.; VICENTINI, V. E. P. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; LUCCHETTA, L.; VICENTINI, V. E. P. Effect of processing, post-harvest irradiation, and production system on the cytotoxicity and mutagenicity of *Vitis labrusca* L. juices in HTC cells. **Plos One**, v. 9, p. e107974, 2014.

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; PINTO, E. P.; LUCCHETTA, L.; VICENTINI, V. E. P. Influence of processing and storage of integral grape juice (*Vitis labrusca* L.) on its physical and chemical characteristics, cytotoxicity, and mutagenicity in vitro. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-12, 2017.

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; TONIN, L. T.; VICENTINI, V. E. P. In vivo antimutagenic effects of the Barbados cherry fruit (*Malpighia glabra* Linnaeus) in a chromosomal aberration assay. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. gmr15049036, 2016.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; MARIUCCI, R. G.; LOPES, N. B.; TONIN, L. T.; VICENTINI, V. E. P. Radioprotective effect of the Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) against radiopharmaceutical Iodine-131 in Wistar rats in vivo. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v. 14, p. 41-59, 2014.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193–236, 2002.

ENDO, K. M.; BINI, R. D.; HERNANDES, E. P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; VICENTINI, V. E. P.; CÓTICA, L. F. Morphological and cytotoxic evaluation in human hepatoma cells (HepG2/C3A) exposed to magnetic nanoparticles. **Microscopy and Microanalysis**, v. 26, p. 111-113, 2020.

ENDO, K. M.; BINI, R. D.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; VICENTINI, V. E. P.; CÓTICA, L. F. Interaction of magnetic nanoparticles in cells of human breast adenocarcinoma (MCF-7). **Microscopy and Microanalysis**, v. 26, p. 79-81, 2020.

ESPÍRITO SANTO, B. C.; OLIVEIRA, J. A. S.; RIBEIRO, M. A. S.; SCHOFFEN, R. P.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; DA SILVA, A. A.; DE ABREU FILHO, B. A.; HECK, M. C.; MEURER, E. C.; CONSTANTIN, P. P.; PILEGGI, M.; VICENTINI, V. E. P.; GOLIAS, H. C.; PAMPHILE, J. A. Antitumor and antibacterial activity of metabolites of endophytic *Colletotrichum siamense* isolated from coffee (*Coffea arabica* L. cv IAPAR-59). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 03, p. 01-11, 2023.

SUMÁRIO

FENECH, M.; KNASMUELLER, S.; BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; KIRSCH-VOLDER, M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

GODOY, M. A. F.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica, genotóxica e modulação da expressão gênica do composto Bromelina em células humanas de carcinoma renal (786-0) e hepático (HepG2/C3A)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ambiental), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

GODOY, M. A. F.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação *in vivo* da genotoxicidade e efeito protetor do fitoterápico Bromelina contra danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida**. 2022. Tese (Doutorado em Biotecnologia Ambiental), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2022.

GUIDOTI, D. T.; GUIDOTI, D. G. G.; BERTI, A. P.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. P. Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências (Online)**, v. 12, p. 52-55, 2014.

HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Efeitos do cacau, flavonoide epicatequina e chocolate, na citotoxicidade, genotoxicidade e radioproteção, sobre o radiofármaco Iodo-131, em células de hepatoma humano HepG2/C3A**. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Comparada), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

HECK, M. C.; YOSHIMOTO-HIGAKI, M.; GODOY, M. A. F.; MENDONCA, D. E. A.; VICENTINI, V. E. P. Antimutagenic effects of copaiba oils (*Copaifera langsdorffii* Desf.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) against the clastogen - cyclophosphamide, in Wistar rat. **Research, Society and Development**, v. 11, p. e567111133539-09, 2022.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HERNANDES, E. P.; BINI, R. D.; ENDO, K. M.; OLIVERA-JUNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. V.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; OLIVEIRA, P. N.; VICENTINI, V. E. P.; COTICA, L. F. Doxorubicin-loaded magnetic nanoparticles: enhancement of doxorubicins effect on breast cancer cells (MCF-7). **Magnetochemistry**, v. 08, p. 01-17, 2022.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. H. Cell cycle analyses by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 15-25, 1993.

JOSEPH, B.; PRIYA, M. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, p. 291-309, 2011.

KODAMA, G. T. R.; PEREIRA, V. B.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da atividade genotóxica do composto natural bromelina em cultura de linfócitos humanos**. *In*: 30º Encontro Anual de Iniciação Científica (EAIC) e o 10º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 2021, on line. Anais do 30º EAIC e 10º EAIC JÚNIOR, 2021.

LOPES, N. B.; ALMEIDA, I. V.; LUCCHETTA, L.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. P. A Cytotoxicity of iodine-131 radiopharmaceutical in tumor and non-tumor human cells and radioprotection by integral juices of *Vitis labrusca* L. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e253206, 2022.

LOPES, N. B.; ALMEIDA, I. V.; LUCCHETTA, L.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxic effects of *Vitis labrusca* (fox grape) whole juices on human tumor and non-tumor cells, in vitro. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, p. 1-11, 2019.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MANICKAM, S.; RAJAGOPALAN, V. R.; KAMBALE, R.; RAJASEKARAN, R.; KANAGARAJAN, S.; MUTHURAJAN, R. Plant metabolomics: Current initiatives and future prospects. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 11, p. 8894-8906, 2023.

MENDONÇA, D. E. A.; GODOY, M. A. F.; LUCREDI, N. C.; COMAR, J. F.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Toxicogenic effects of the mushroom *Ganoderma lucidum* on human liver and kidney tumor cells and peripheral blood lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 307, p. 116226, 2023.

MØLLER, P. The comet assay: Ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, p. 1-7, 2018.

MØLLER, P.; AZQUETA, A.; BOUTET-ROBINET, E.; KOPPEN, G.; BONASSI, S.; MILIC, M.; GAJSKI, G.; COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P.; PEREIRA, C. C.; DUSINSKA, M.; GODSCHALK, R.; BRUNBORG, G.; GUTZKOW, K. B.; GIOVANELLI, L.; COOKE, M. S.; RICHLING, E.; LAFFON, B.; VALDIGLESIAS, V.; BASARAN, N.; BO, C. D.; ZEGURA, B.; NOVAK, M.; STOPPER, H.; VODICKA, P.; VODENKOVA, S.; ANDRADE, V. M.; SRAMKOVA, M.; GABELOVA, A.; COLLINS, A.; LANGIE, S. A. S. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): Recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

NGUYEN, H.; KUMAR, V.; PONNUSAMY, V.; MAI, T.; NHAT, P.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. Phytochemicals intended for anticancer effects at preclinical levels to clinical practice: Assessment of formulations at nanoscale for non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy. **Process Biochemistry**. v. 104, p. 55-75, 2021.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. Guideline 489, p. 1–27, 2016. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline 474, p. 1–21, 2016. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264224292-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

ORLANDELLI, R. C.; DA SILVA, M. L. C.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; PRIETO, A.; HERNANDEZ, M. D. D.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. β-(1→3,1→6)-d-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 431-437, 2017.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PEREIRA, V. B.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação da mutagenicidade do composto natural bromelina em cultura de linfócitos humanos**. *In*: 29º EAIC e 9º EAIC JÚNIOR, 2020, Maringá. Anais do 29º EAIC e 9º EAIC JÚNIOR. Maringá, 2020.

PERON, A. P.; MARIUCCI, R. G.; ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN, E.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), on vegetal and animal test systems. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v. 13, p. 97-105, 2013.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

ROCHA, A. M.; VIEGA, B. L.; FONTANA, M.; LUCCHETTA, L.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; DALMOLIN, I. A. L.; DÜSMAN, E. Grape bagasse extracts: Antioxidant and cytotoxic activity in HTC cells. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 01-09, 2023.

ROCZNIESKI, G. G.; GODOY, M. A. F.; VICENTINI, V. E. P. **Citotoxicidade e genotoxicidade do flavonoide epicatequina em células humanas de carcinoma de mama (MCF-7) e renal (786-0)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biologia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

SALVADORI, D. M. F.; TAKAHASHI, C. S.; GRISOLIA, C. K.; SANTOS, R. A. (Org.). **Da Toxicogenética à Toxicogenômica.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2021.

SANTOS, V. A. M.; BRESSIANI, P. A.; ZANOTTO, A. W.; ALMEIDA, I. V.; BERTI, A. P.; LUNKES, A. M.; VICENTINI, V. E. P.; DÜSMAN, E. Cytotoxicity of capsaicin and its analogs in vitro. **Brazilian Journal of Biology (Online)**, v. 83, p. e268941, 2023.

SCHIMID, W.; ARAKI, D. T.; BRESLAU, N. A.; CULBERTSON, J. S. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology obtained with alkylating agents. **Human Genetics**, p. 103-118, 1971.

SILVA, A. A.; POLONIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. S; BULLA, A. M.; GOLIAS, H. C.; POLLI, A. D.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P.; DE OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; AZEVEDO, J. L.; ABREU-FILHO, B. A.; PAMPHILE, J. A. Multilocus sequence analysis of endophytic fungi from *Justicia brandegeana* with the culture-dependent method and their bioprospection for health field. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 359-368, 2020.

SIMSEK, M.; WHITNEY, K. Examination of primary and secondary metabolites associated with a plant-based diet and their impact on human health. **Foods**, v. 13, n. 7, 2024.

SŁOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PĘKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, p. 273-285, 2014.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**. v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3. B.3, 2015.

SUN, W.; CHEN, Z.; HONG, J.; SHI, J. Promoting human nutrition and health through plant metabolomics: Current status and challenges. **Biology (Basel)**, v. 10, n. 1, 2020.

SYRITIUK, P. H. S.; VICENTINI, V. E. P. **Atividade citotóxica e genotóxica do flavonoide Taxifolina em linhagem de células tumorais renais humanas (786-0)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ambiental), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VAN ENGLAND, M.; NEILAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

VENDRUSCOLO, I.; VENTURELLA, S. R. T.; BRESSIANI, P. A.; MARCO, I. G.; NOVELLO, C. R.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; MELLO, J. C. P.; DÜSMAN, E. Cytotoxicity of extracts and compounds isolated from *Croton echioides* in animal tumor cell (HTC). **Brazilian Journal of Biology (Online)**, v. 82, p. e264356-09, 2022.

VIEGA, B. L.; ROCHA, A. M.; BERTI, A. P. NOVELLO, C. R.; NICOLIN, D. J.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; DÜSMAN, E. Cytotoxicity of isolated compounds from *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. in animal tumor cell (HTC). **Brazilian Journal of Biology (Online)**, v. 83, p. e273889-07, 2023.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; DOWNES, C. S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153-62, 2008.

WEAVER, J. L. Estimation of cell viability by flow cytometry. **Flow Cytometry Protocols**, v. 91, p. 77-83, 1998.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D., ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 369-376, 2005.

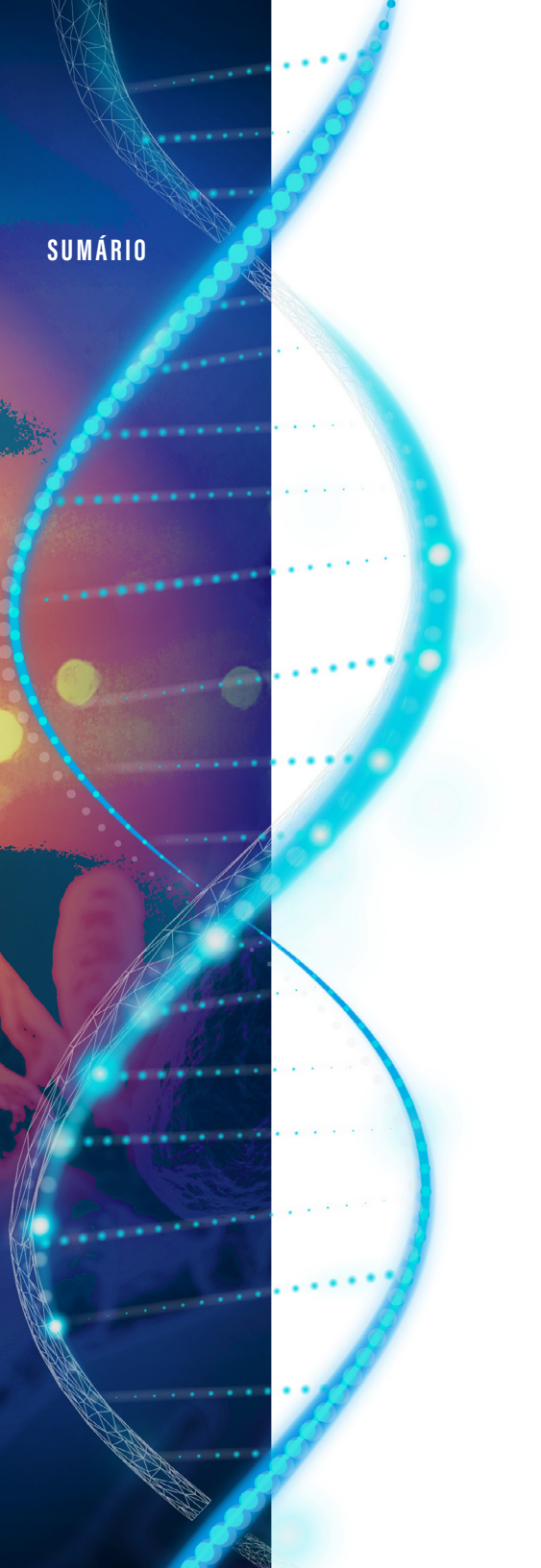
WINKLER, G. C.; BARLE, E. L.; GALATI, G.; KLUWE, W. M. Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 46-53, 2014.

YOSHIMOTO-HIGAKI, M.; VICENTINI, V. E. P. **Citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e monitoramento do ciclo celular e da indução de apoptose, do neolignoide Magnolol, em linhagens celulares humanas tumoral (HepG2/C3A, 786-0 e MCF-7) e não tumoral (linfócitos)**. 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020.

4.2

Michele Cristina Heck
Julio Cesar Polonio
Débora Elisa Antunes de Mendonça
Mariane Aparecida Franco de Godoy
Veronica Elisa Pimenta Vicentini

MONITORAMENTO AMBIENTAL E BIOPROSPECÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A poluição é definida como a contaminação do ambiente por qualquer agente químico, físico ou biológico, que modifique as características naturais de um ecossistema. As causas da poluição ambiental não estão restritas à industrialização, urbanização, crescimento populacional e agricultura, mas também à exploração dos recursos naturais e o movimento dos poluentes através das fronteiras e por isso, é uma séria ameaça a todos ecossistemas. Todos esses fatores estão relacionados a uma crescente necessidade das sociedades por um maior conforto e qualidade de vida, levando ao aumento da liberação de agentes estressores ambientais que a cada dia acentuam a poluição do ar, da água e do solo.

Entre os recursos naturais mais ameaçados estão as águas, pois a liberação inadequada de efluentes nos rios, as atividades humanas como a mineração e a degradação das águas subterrâneas, estão esgotando o suprimento de água potável e afetando o equilíbrio do meio ambiente. Por sua vez, o solo é impactado por quantidades excessivas de produtos químicos como pesticidas, amônia, hidrocarbonetos de petróleo, nitrato e metais pesados que reduzem a qualidade do solo. E a principal causa da poluição do ar é a queima de combustíveis fósseis, que contribui para a emissão de gases nocivos na atmosfera, sendo esse tipo de poluição um dos principais problemas de saúde pública no mundo.

Segundo Münzel *et al*. (2023), a poluição do ar, da água e do solo representam uma ameaça crescente para a saúde global, sendo a maior causa ambiental na atualidade, de doenças e mortes prematuras no mundo. Essa questão é tão relevante que a Comissão Europeia e o Plano de Ação da UE para 2050, determinam que a poluição deve ser reduzida a níveis que não provoquem danos à saúde humana ou dos ecossistemas até 2050 (European Commission, 2021).

A poluição ambiental é uma preocupação mundial, contudo, para a redução dos níveis da poluição vários fatores precisam ser levados em consideração, pois o tipo e a concentração de poluentes dependem dos setores e dos seus processos específicos de produção. O reflexo dessa especificidade são os riscos e efeitos ambientais diversos como da indústria de alimentos, que produz grandes quantidades de águas residuais ricas em matéria orgânica, reduzindo a demanda de oxigênio em corpos hídricos, e da agricultura convencional, que utiliza toneladas de agroquímicos, muitos dos quais agem como desreguladores endócrinos. Devido à diversidade de poluentes vários métodos de tratamento podem ser empregados, sempre baseados no tipo e concentração do contaminante, e das condições ambientais locais, visando sempre minimizar o impacto ambiental enquanto ocorre a maximização da eficácia do tratamento.

Existem diferentes técnicas de remediação de xenobióticos baseados em métodos físicos, químicos e biológicos. Normalmente, os processos de remediação envolvem uma combinação de processos e de operações físicas, químicas e biológicas, para remover sólidos, matéria orgânica, entre outros poluentes (Saravanathamizhan; Perarasu, 2021).

Os métodos químicos envolvem a adição de produtos químicos como minerais argilosos, fosfato, biocarvão e sais de alumínio, que reagem com os poluentes para transformá-los em compostos menos tóxicos ou insolúveis, facilitando assim, a sua remoção. Esses métodos são eficazes para uma ampla gama de contaminantes e envolvem os processos de adsorção, redução, oxidação, complexação, precipitação e troca iônica. No entanto, além do produto químico usado no tratamento, geralmente, esses métodos geram subprodutos indesejáveis que também podem ser uma fonte de poluição ambiental (Xu *et al*., 2022).

Os tratamentos físicos como filtração, sedimentação e centrifugação, utilizam processos mecânicos para separar os poluentes

do meio ambiente. Esses métodos são frequentemente mais simples, no entanto, eles podem ser menos eficazes para poluentes muito dispersos ou de baixa concentração, ademais, podem gerar resíduos sólidos que precisam ser adequadamente descartados (Vocciante *et al*., 2019; Kumari; Kumar, 2023).

Por outro lado, a biorremediação é um processo usado para remediar ambientes contaminados como água e solo, usando organismos como plantas e microrganismos, portanto, refere-se à descontaminação do ambiente contaminado por meio de organismos vivos. Esta é uma estratégia que vem ganhando cada vez mais importância como tecnologia alternativa amiga do ambiente (*ecofriendly*) para remediar locais poluídos. Trata-se de uma abordagem multidisciplinar, que utiliza a capacidade metabólica intrínseca de entidades biológicas para a degradação ou transformação de poluentes dos ambientes contaminados. Essas entidades biológicas são obtidas a partir da bioprospecção e podem ser organismos indígenas, do local contaminado ou de outro ambiente, como os microrganismos endofíticos que vivem no interior de tecidos vegetais (Vidali, 2001). Através da biorremediação os poluentes são degradados biologicamente para uma forma menos tóxica e sob condições controladas.

Para comprovar a eficiência dos processos de biorremediação é fundamental conhecer os possíveis efeitos ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos que os produtos da remediação podem produzir, visando a preservação do meio ambiente e dos organismos vivos. Portanto, é essencial a adoção de estratégias de monitoramento ambiental, já que é conhecida a ação citotóxica e a capacidade de entrar na cadeia alimentar, de elementos originados devido aos tratamentos insuficientes de metais pesados, corantes, substâncias farmacêuticas, pesticidas e outros materiais perigosos, presentes em solos e águas contaminadas.

Os objetivos deste capítulo incluem apresentar diversas abordagens de bioprospecção para o tratamento de xenobióticos,

enfatizando a importância da bioprospecção microbiana e do monitoramento ambiental. Busca-se demonstrar como o monitoramento ambiental pode auxiliar na compreensão dos efeitos ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos dos processos de biorremediação, destacando a necessidade de estratégias eficazes para minimizar os impactos ambientais, promovendo uma abordagem sustentável e economicamente viável para a remediação ambiental.

2. MONITORAMENTO AMBIENTAL

O monitoramento ambiental é baseado nas observações científicas de mudanças que acontecem no meio ambiente, especialmente relacionadas aos impactos de origem antrópica. Nesse sentido, as mudanças provocadas pela poluição ambiental podem ter uma ação lenta, crônica e por esse motivo, exigem múltiplas observações ao longo do tempo, ou ainda podem ter um efeito rápido, agudo e dessa maneira, podendo ser avaliado com observações simultâneas (Artiola; Brusseau, 2019). A realização do monitoramento contínuo do ambiente é algo extremamente necessário não apenas para a manutenção dos ecossistemas, mas também para a promoção da saúde dos organismos vivos, que são direta e/ou indiretamente afetados pelos impactos ambientais. A implantação do monitoramento ambiental necessita da escolha de indicadores, que são padrões que expressam as condições qualitativas e/ou quantitativas do que está sendo medido e avaliado. Nesse sentido, diferentes biomarcadores são usados a fim de identificar alterações decorrentes do evento ambiental a ser investigado.

O biomonitoramento consiste na determinação de biomarcadores ou indicadores biológicos de exposição e de efeitos, nos indivíduos expostos aos agentes presentes no ambiente, para avaliar a exposição e o risco a saúde, nos tecidos, secreções, ar expirado,

metabólitos, etc., comparando com padrões apropriados. As respostas dos bioindicadores aos agentes danosos (por exemplo, poluentes) podem ser observadas tanto em nível macroscópico, como podem ocorrer em nível microscópico, genético, morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular.

Existem três categorias de Indicadores Biológicos de Exposição, descritos a seguir.

Indicadores biológicos de dose interna: Objetiva caracterizar os riscos à saúde decorrentes da exposição a substâncias danosas. Avalia a presença de substância e/ou de seus produtos de biotransformação nos fluidos (sangue), excreções (urina, fezes), tecidos e outros (ar exalado, cabelo).

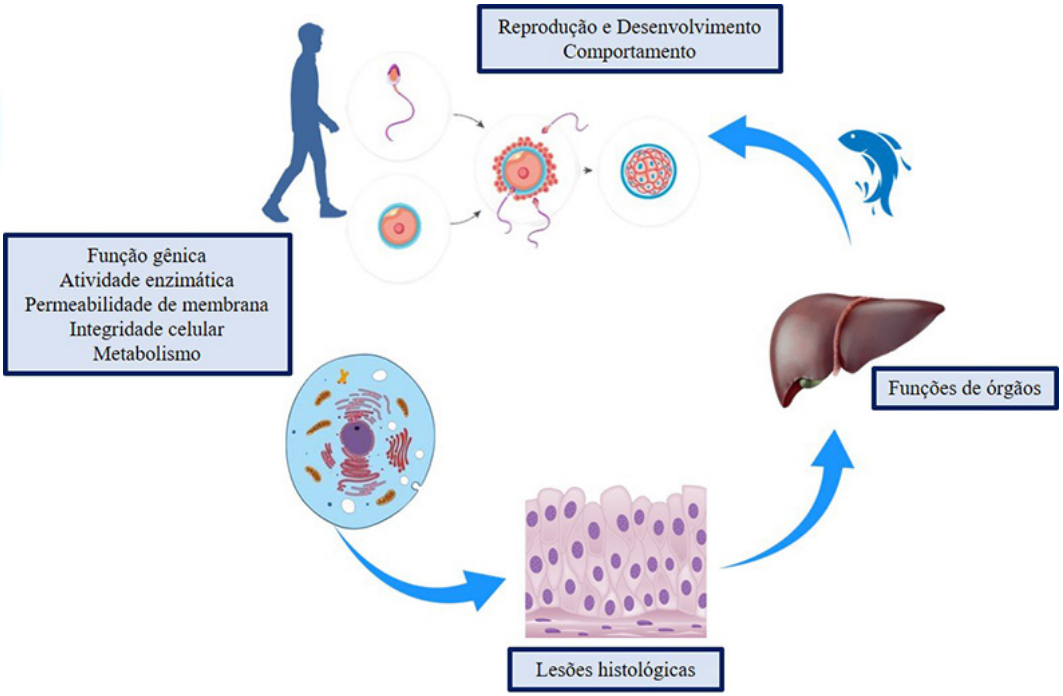
Indicadores biológicos de efeito: Objetiva avaliar a relação com agravo à saúde. Quantifica as alterações biológicas (bioquímicas, fisiológicas, morfológicas) produzidas pela interação do agente químico com o organismo.

Indicadores biológicos de susceptibilidade (Sensibilidade): Avalia diferenças (variabilidades) biológicas que conferem a diferentes populações, capacidades distintas de responder a exposições a agentes tóxicos.

Estes biomarcadores podem incluir desde parâmetros bioquímicos, histológicos, fisiológicos até reprodutivos e comportamentais, permitindo dessa maneira, uma avaliação integrada e detalhada dos efeitos de agentes ambientais sobre organismos vivos (Figura 1 e Tabela 1). Essa abordagem multidimensional não apenas amplia a sensibilidade e especificidade da avaliação, mas também oferece *insights* importantes sobre os mecanismos subjacentes aos impactos ambientais, possibilitando estratégias mais eficazes de monitoramento e mitigação dos efeitos dos poluentes.

SUMÁRIO

Figura 1 - Biomarcadores para os diferentes níveis de complexidade



Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 1 - Principais ensaios aplicados ao monitoramento ambiental

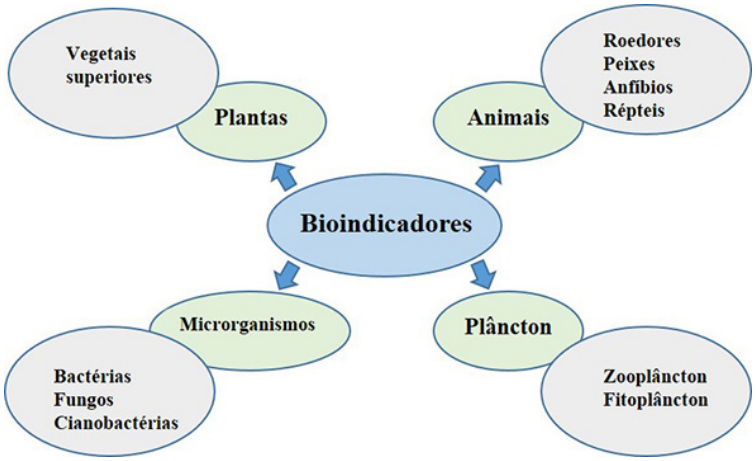
Avaliação	Metodologia	*In vivo*	*In vitro*	Referência
Citotoxicidade	Teste do MTT		Cultura de células animais	Mosmann (1983)
	Método de Exclusão por Azul de Trypan	Células animais obtidas de diferentes tecidos	Cultura de células animais	Strober (2015)
	Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (CBPI)		Cultura de linfócitos humanos	Fenech *et al.* (2020) OECD (2023)
	Relação Eritrócitos Policromáticos/ Normocromáticos (PCE/NCE)	Medula óssea e sangue de roedores		OECD (2016b)
	Índice Mitótico	*Allium cepa* L.		Fiskesjö (1993)
Genotoxicidade	Ensaio do Cometa	Animais (células somáticas e germinativas) e Vegetais	Cultura de células	Navarrete *et al.* (1997) Yauk *et al.* (2015) OECD (2016a) Gajski *et al.* (2019a,b) Møller *et al.* (2020)
	Teste do Micronúcleo	Animais (células somáticas e germinativas) e Vegetais	Cultura de células	Fiskesjö (1993) Ma *et al.* (1995) Yauk *et al.* (2015) OECD (2016b) Fenech *et al.* (2020) OECD (2023)
	Teste de Ames		*Salmonella typhimurium*	Ames *et al.* (1975) OECD (2020)
	Alterações Cromossômicas	Medula óssea de roedores	Cultura de células animais	Ford; Hamerton (1956) OECD (2016c)
Toxicidade	Aguda - DL50	Animais		OECD (1984) OECD (2013) OECD (2017) OECD (2022a)
	Crônica	Animais		OECD (2018)
Alterações Bioquímicas	Peroxidação Lipídica (ácido tiobarbitúrico–TBARS; peróxido de hidrogênio - H2O2)	Animais e Vegetais	Cultura de células animais	Zhou *et al.* (1997) Ohkawa *et al.* (1979) Velikova *et al.* (2000)
	Glutationa Reduzida (GSH)	Animais e Vegetais	Cultura de células animais	Ellman (1959)
	Enzimas Antioxidantes (Catalase-CAT; Superóxido Dismutase-SOD; Glutationa Peroxidase-GPx; Glutationa S-transferase-GST)	Animais e Vegetais	Cultura de células	Misra; Fridovich (1972) Aebi (1984) Hafeman *et al.* (1974) Habig *et al.* (1974) Gagné *et al.* (2014)

Avaliação	Metodologia	*In vivo*	*In vitro*	Referência
Alterações Histológicas		Animais		Bancroft; Gamble (2007)
Alterações Fisiológica/ Comportamental		Animais		OECD (1984) OECD (1997) ISO (2008) OECD (2013) OECD (2016f)
Células Germinativas e Efeitos Hereditários	Teste do Dominante Letal	Animais		OECD (2016d) Yauk *et al.* (2015)
	Teste de Aberração Cromossômica em Espermatogônias de Mamíferos	Animais		OECD (2016e)
	Teste de Translocação Herdável em Camundongo	Animais		OECD (1986) Yauk *et al.* (2015)
	Teste de Mutação Gênica em Células Somáticas e Germinativas de Roedores Transgênicos	Animais		OECD (2022b) Yauk *et al.* (2015)
	Teste do Micronúcleo em Espermátides	Animais		Tates (1992) Yauk *et al.* (2015)
	Teste da Estrutura da Cromatina do Espermatozoide (SCSA)	Animais		Schulte *et al.* (2010) Yauk *et al.* (2015)
	Marcação por dUTP e Deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL)	Animais		Schulte *et al.* (2010) Gorczyca *et al.* (1993)
	Ensaio do Cometa em Espermatozoides	Animais		Haines *et al.* (1998) Schulte *et al.* (2010)

Fonte: Elaborada pelos autores.

Além disso, no contexto ambiental deve-se levar em consideração o inter-relacionamento de agentes estressores físicos, químicos e biológicos, encontrados nestes ecossistemas, bem como entre os compartimentos ambientais aquático, terrestre e atmosférico, e dessa forma, além da investigação de diferentes biomarcadores, é relevante a análise de sistemas-teste *in vivo* e *in vitro* (Figura 2). Levando-se em consideração alterações químicas e microbiológicas, biotransformação, bioacumulação e biomagnificação nos diferentes níveis tróficos, dando atenção principal às populações expostas (Salvadori *et al.*, 2021).

Figura 2 - Diferentes bioindicadores utilizados para avaliar o impacto ambiental



Fonte: Adaptado de Pattanayak et al. (2020).

No ambiente aquático, por exemplo, são encontrados diferentes tipos de poluentes como metais pesados, agroquímicos, medicamentos, efluentes industriais, dentre outros, que mesmo em baixas concentrações, podem ser bioacumulados por organismos aquáticos e provocar diferentes tipos de alterações. O efeito dos herbicidas glifosato, atrazina, 2,4-D e a mistura dos três produtos (mix) foi avaliado em peixes endêmicos da bacia do rio Paraná, *Astyanax altiparanae*, por Silva *et al*. (2020b). Os resultados demonstraram que os herbicidas e o mix aumentaram a frequência de alterações nucleares em eritrócitos e de hiperplasia, hipertrofia e descamação em brânquias, especialmente o mix. Por sua vez, Pinha *et al.* (2019), relataram alterações comportamentais em *Moenkhausia forestii* que reduzem o instinto de busca de refúgio frente ao predador *Hoplias malabaricus*, além de alterações nucleares em células eritrocitárias quando expostos ao paraquat.

O cultivo de cana é caracterizado pela prática da queima das folhas secas no processo de colheita, nesse sentido a contaminação do ar por esse tipo de poluição é bem estabelecida na literatura,

contudo, o efeito em ambientes aquáticos é pouco explorado. Gonino; Benedito (2019), observaram que a espécie nativa *Astyanax lacustris* apresentou uma frequência de alterações nucleares eritrocitárias maior que a exótica *Oreochromis niloticus*, o que indica uma susceptibilidade maior da espécie endêmica em relação à introduzida. Cinzas provenientes de queimadas florestais também foram investigadas em *Luciobarbus bocagei*, um peixe nativo da Península Ibérica. Os autores relataram mudanças no índice hepatossomático e comportamental, como redução do nado em cardume (Gonino *et al*., 2019).

Nanopartículas de prata são amplamente utilizadas pelo homem, principalmente em formulações cosméticas, materiais dentários e hospitalares, em razão de sua atividade antimicrobiana, contudo, também são fonte de poluição ambiental, principalmente aquática. Segundo o trabalho realizado por Buzo *et al.* (2019), as nanopartículas avaliadas induziram alterações em núcleos eritrocitários e morfohistológicas em brânquias das espécies de peixes *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae.*

Prado *et al*. (2023), utilizaram o microscrustáceo *Artemia salina* para investigação da poluição ambiental decorrente do uso de glitter, à base de polietileno, e observaram atraso no desenvolvimento de naúplios dessa espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira *et al*. (2023), que avaliaram a toxicidade do microplástico glitter branco, usado na área cosmética, em *Artemia salina* e verificaram que o mesmo influencia negativamente a eclosão dos cistos e conduz a um atraso significativo no desenvolvimento, principalmente na passagem de instar 1 para 2 desse microcrustáceo.

Em outro estudo com o mesmo microcrustáceo a exposição aguda ao microplástico de polipropileno, com partículas menores que 50μm no formato esférico, foi avaliada. Nesse trabalho foi verificada a indução de alterações em biomarcadores bioquímicos, comportamentais e malformação intestinal (Jeyavani *et al*., 2022). Portanto, apesar de serem considerados organismos resistentes a contaminantes

ambientais, a *Artemia salina* é amplamente utilizada para a investigação dos efeitos de xenobióticos, possibilitando avaliação em organismos que estão em níveis tróficos inferiores, como o zooplâncton.

Dessa forma, os microcrustáceos e, principalmente, os peixes são sistemas-teste comumente utilizados no monitoramento deste ambiente, possibilitando a avaliação da exposição em nível sistêmico. Nesses casos, além da avaliação *in situ* com espécies endêmicas, também são realizados testes *ex situ* com organismos modelos, que já possuem anatomia, fisiologia e genética bem conhecidas, como o peixe *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish* ou peixe-zebra.

As águas contaminadas por produtos à base de compostos estrogênicos representam uma preocupação significativa devido à sua capacidade de interferir no sistema endócrino de organismos aquáticos e, potencialmente, de afetar a saúde humana. Um estudo desenvolvido por Cooper *et al*. (2021), com peixes *zebrafish*, demonstrou que houve atraso na maturação dos testículos em peixes machos, enquanto em fêmeas ocorreu a aceleração do desenvolvimento de ovários. Contaminantes de origem farmacêutica são tidos como poluentes emergentes e que normalmente não são retidos pelos sistemas de tratamento de água. Gauthier e Vijayan (2020), detectaram a presença de produtos farmacêuticos em efluentes municipais e verificaram que eles afetaram o desenvolvimento de embriões, larvas e juvenis de *zebrafish*.

Sistemas-teste com vegetais superiores também são usados para investigar a poluição aquática (Düsman *et al*., 2014; Costa *et al*., 2015; Vieira *et al*., 2016; Yamada *et al*., 2017; Restrepo *et al*., 2019). Caetano *et al*. (2021), observaram que as águas residuais de postos de combustíveis reduziram a divisão celular de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. Por sua vez, Volpato *et al*. (2020), constataram que o escoamento de águas pluviais urbanas no lago do Parque do Ingá, Maringá-PR, induziu o efeito citotóxico em raízes de *Allium cepa* L.

Silva *et al.* (2019), verificaram que as águas do cultivo de arroz irrigado reduziram a proliferação de células meristemáticas, possivelmente induzido pelos agroquímicos utilizados no cultivo convencional dessa cultura. Viana *et al*. (2014), demonstraram que o resíduo líquido gerado pelo esmagamento da mandioca brava, para a produção de farinha, associado com tiossulfato de sódio, apresentou atividade citotóxica em células de raiz de *Allium cepa* L.

Sistemas-teste vegetais como *Allium cepa* L., *Tradescantia* sp. e *Vicia faba* L. podem ser usados para avaliar contaminações no solo, pois representam os organismos que se desenvolvem diretamente nessa matriz complexa e dinâmica. *Allium cepa* L. é considerada a mais sensível para detecção de toxicidade e genotoxicidade, por isso é importante no biomonitoramento, já que suas raízes são sensíveis a quaisquer materiais tóxicos (Cresencio *et al*., 2017). Nesse sentido, o teste *Allium cepa* L. foi usado para investigar o efeito do solo tratado com pesticidas, os resultados demonstraram que houve redução da divisão celular, sendo citotóxico. Além disso, foi observado um aumento de alterações cromossômicas, especialmente quebras, indicando potencial mutagênico (Datta *et al*., 2018).

Outros animais também são utilizados como anelídeos e moluscos que estão em contato direto com o solo, além deles, mamíferos como roedores, que podem ser coletados diretamente de áreas expostas e ainda anfíbios e insetos. Os ensaios também são realizados tanto *in situ* quanto *ex situ* possibilitando a análise de diferentes parâmetros.

O uso de moluscos como modelos animais, vem crescendo nos últimos anos, especialmente para mensurar o impacto de xenobióticos no ambiente do solo. Entre esses organismos a espécie *Theba pisana* é usada para a avaliação da ecotoxicidade. Nesse sentido, o efeito do inseticida mais utilizado no mundo, indoxacarbe, foi avaliado em múltiplos biomarcadores, possibilitando avaliar respostas fisiológicas, bioquímicas e histopatológicas. Os resultados demonstraram

que a atividade das enzimas catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx) e acetilcolinesterase (AChE), bem como o conteúdo proteico (PC) foram alterados. O crescimento de *Theba pisana* foi reduzido e foram identificadas alterações histo-arquitetônicas no hepatopâncreas (Radwan *et al*., 2024).

O emprego de anelídeos como as minhocas, está relacionado ao fato de serem organismos-chave da biota dos solos, sendo considerados bons indicadores da ocorrência e toxicidade de poluentes. *Eisenia fetida* é empregada em testes padrão de ecotoxicidade e como exemplo recente desse uso, na investigação da toxicidade do cobre, muito aplicado no cultivo de uvas orgânicas, os autores demonstraram pelo teste de fuga que as minhocas, principalmente em concentrações mais elevadas, buscaram locais sem a presença de cobre no solo e apresentaram redução da atividade reprodutiva. Além disso, foi observado efeito genotóxico, com aumento no índice de lesões no DNA após curto tempo de exposição (Marini *et al*., 2024).

Com base nesses estudos e na ampla literatura sobre o assunto, podemos afirmar que as mudanças desencadeadas pelo uso da terra são tidas como o principal fator de degradação dos ecossistemas. De Bastiani *et al*. (2024), utilizaram três espécies de anuros, na fase de girinos, amostrados em lagoas na região subtropical de pastagens montanhosas do sul do Brasil, para avaliar o impacto de ambientes nativos e de regiões agrícolas. Os autores observaram que as três espécies de girinos de regiões agricultáveis apresentaram mais danos em nível de DNA e aumento do estresse oxidativo quando comparados àqueles de remanescentes de pastagens nativas.

Além dos anfíbios, os répteis são vistos como organismos para a avaliação ecotoxicológica de poluentes ambientais, pois apresentam metabolismo mais lento influenciando diretamente no seu poder de recuperação e por essa razão, são mais sensíveis aos efeitos xenobióticos. Em seu trabalho de revisão, Silva *et al*. (2020a),

explorou a resposta a contaminantes inorgânicos, metais pesados e radionuclídeos, e orgânicos como derivados de petróleo e pesticidas. Como conclusão, foi observado que os xenobióticos induziram alterações histopatológicas, estresse oxidativo, danos ao DNA e aumentaram a frequência de micronúcleos em lagartos. No entanto, é destacado a importância de se considerar a via de exposição, além do cenário ambiental.

A contaminação ambiental por agroquímicos é um assunto recorrente e de profunda preocupação, principalmente no Brasil que é um dos maiores consumidores mundiais desses produtos. Além do uso intensivo, a aplicação combinada de agroquímicos (mix) também é uma prática bastante comum, visando a redução do número de aplicações e o maior controle de diferentes espécies de plantas invasoras. Nesse cenário, além da avaliação de sistemas-teste vegetais e animais que são organismos-chave da biota, testes *in vitro* também podem ser utilizados para avaliar a ação destes contaminantes em nível celular, por meio da cultura de células. O trabalho desenvolvido por Prazeres *et al*. (2019), por exemplo, avaliou a ação citotóxica e genotóxica em linhagem de hepatocarcinoma (HepG2/C3A), e hemolítica em cultura de linfócitos humanos, do mix dos herbicidas glifosato, atrazina e 2,4-D nas concentrações de ingestão diária aceitável (ADI) e 1.000x e 10.000x a ADI. Foi observada ação citotóxica e genotóxica na concentração 1.000x maior que a ADI, além de atividade hemolítica na concentração 10.000x maior que a ADI. Tais dados mostram o risco em nível celular do uso combinado de agroquímicos, principalmente em altas doses.

A avaliação de exposição em nível sistêmico também é uma ferramenta útil para o monitoramento ambiental, uma vez que permite investigar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de xenobióticos potencialmente tóxicos, por meio de testes *in vivo* com organismos endêmicos ou em sistemas-teste bem estabelecidos como é o caso do roedor *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar. Syritiuk *et al*. (2022), utilizaram ratos Wistar para avaliar o efeito de baixas

concentrações de glifosato, atrazina e 2,4-D, além da mistura destes (mix), e observaram que todos os herbicidas e o mix induziram lesões no DNA das células de fígado, rim, cérebro, medula óssea e sangue periférico, além de aumentar a frequência de micronúcleos em células da medula óssea.

Dessa forma, o potencial tóxico de herbicidas foi observado tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* mostrando a necessidade do monitoramento de indivíduos expostos, que foi o objetivo do estudo desenvolvido por Lúcio *et al.* (2023), onde foi investigado o potencial genotóxico do uso de agroquímicos em trabalhadores rurais de Maringá-PR. Os resultados do ensaio do cometa mostraram maior índice de danos em agricultores expostos em relação a doadores não expostos. Além de aumento no número de células basais e alterações citogenéticas no ensaio de micronúcleo bucal. Portanto, os participantes expostos a pesticidas foram mais sensíveis a danos genéticos, tornando-os mais suscetíveis a doenças resultantes de tais danos.

A avaliação da poluição atmosférica é um pouco mais complexa pois está condicionada às transformações dinâmicas da atmosfera, relacionadas a fenômenos naturais e antrópicos, condições geográficas, características das fontes emissoras, concentração de poluentes, etc. Assim, o mais comum nesse caso é a utilização de cabines de exposição onde sistemas-teste preferencialmente vegetais, como a *Tradescantia* sp., são expostos aos contaminantes ali presentes (Salvadori *et al.*, 2021).

Godoi *et al*. (2021), avaliaram o efeito do fluxo de veículos, consequentemente a poluição decorrente da emissão de gases, em *Tradescantia pallida* e sua correlação com doenças cardiorrespiratórias. Os resultados demonstraram que houve indução de micronúcleos em tetrápodes de *Tradescantia pallida*, especialmente em períodos de baixa temperatura e umidade, porém a frequência diminuiu com o aumento da umidade relativa. Além disso, as cidades que apresentaram maior frequência de micronúcleos foram aquelas

que detêm maior fluxo de veículos e de indivíduos com doenças cardiorrespiratórias.

No entanto, outros sistemas-teste podem ser adotados para a avaliação de poluentes ambientais. Zani *et al*. (2021), realizaram testes *in vivo* a partir de células da mucosa bucal de crianças expostas à poluição atmosférica e *in vitro*, pelo Teste de Ames e cultura de leucócitos, com a obtenção dos poluentes atmosféricos em amostradores seguida, de extração orgânica do material. Foi observada a presença de micronúcleos nas células da mucosa bucal, indução da mutagenicidade pelo teste de Ames e lesões no DNA em leucócitos pelo teste do cometa. Os autores concluíram que os testes de genotoxicidade *in vitro*, e o teste do micronúcleo em células bucais da mucosa são bons biomarcadores de efeito biológico precoce e por isso uma ferramenta útil para monitorar o risco de danos genéticos devido à exposição à poluição atmosférica.

Considerando todo o exposto, embora existam limitações quanto à extrapolação dos resultados com organismos em laboratório ou ensaios *in vitro* para uma escala ambiental, as investigações em condições controladas e padronizadas para a verificação das respostas a diferentes ensaios, têm sido a fonte de informações predominantes para a avaliação dos efeitos dos compostos diversos (CETESB, 2023).

Portanto, o monitoramento ambiental é algo extremamente complexo, que deve sempre considerar inúmeras variáveis como as características do local avaliado, espécies endêmicas, as propriedades e a quantidade do(s) contaminante(s), se há interação entre diferentes poluentes, etc. No entanto, há uma infinidade de biomarcadores e sistemas-teste que podem ser usados como ferramentas para predizer os impactos biológicos decorrentes da contaminação ambiental, que servem como base para tomada de decisões e impulsionam a busca por soluções para tais problemas, onde destaca-se a biotecnologia com a obtenção de processos e produtos que visam remediar os impactos observados.

2.1 MONITORAMENTO AMBIENTAL E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE XENOBIÓTICOS

Existem diferentes tipos de estratégias para mitigar os efeitos nocivos dos xenobióticos sobre os organismos vivos e o meio ambiente. Dentre eles os métodos fisico-químicos são amplamente utilizados na remediação de poluentes ambientais devido à sua capacidade de remover contaminantes de forma rápida e eficiente. Técnicas como a filtração, adsorção, oxidação e precipitação são empregadas para tratar uma variedade de substâncias tóxicas presentes na água, solo e ar. A filtração, por exemplo, utiliza materiais porosos para capturar partículas contaminantes, enquanto a adsorção faz uso de substâncias como o carvão ativado para atrair compostos orgânicos indesejados. Já, os processos de oxidação, como a ozonização e a fotocatálise, destroem poluentes através da introdução de agentes oxidantes ou da ativação por luz ultravioleta (Kumari; Kumar, 2023).

No entanto, apesar de suas vantagens, esses métodos apresentam como limitações o custo operacional elevado, especialmente em grande escala, devido à necessidade de equipamentos complexos e consumíveis caros, como reagentes químicos e energia elétrica. A eficácia também pode ser limitada dependendo das características específicas do poluente e do ambiente contaminado. Além disso, muitos desses processos podem gerar resíduos secundários tóxicos ou de difícil disposição, o que pode dificultar o processo de remediação ambiental.

Nesse cenário, Magnoni *et al*. (2023), verificaram que efluentes provenientes de uma indústria de anodização de alumínio após o tratamento pela técnica de precipitação química, usando sais de cloreto de bário ($BaCl_2$) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$), aumentaram a frequência de alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* e induziram, de forma significativa, alterações histopatológicas

em brânquias. Os autores destacam a necessidade de otimização da técnica de tratamento por precipitação química para minimizar os efeitos tóxicos observados. Os efluentes de uma indústria de anodização de alumínio, bruto e tratados por precipitação química, também foram avaliados por Lima *et al.* (2018), que verificaram forte atividade inibitória e alterações cromossômicas induzidas pelo efluente tratado com cloreto de bário em células meristemáticas de *Allium cepa* L.

Outra estratégia para tratar os poluentes ambientais, são os processos oxidativos avançados (POA's), os quais são tecnologias que utilizam radicais hidroxil (OH) como base para a degradação de poluentes orgânicos persistentes e sua desinfecção (Kumari; Kumar, 2023). Esse método foi adotado para o tratamento de chorume, o líquido produzido a partir da decomposição de resíduos sólidos em aterros sanitários. Devido à heterogeneidade desses resíduos e aos fatores climatológicos, o chorume é considerado um composto com características químicas e biológicas variadas e altamente poluente. Almeida *et al.* (2015), mostraram que o tratamento desse lixiviado, proveniente do aterro municipal, por processos POAs a base de ozônio (O_3), não induziu efeito mutagênico pelo teste de Ames. Contudo, inibiu a divisão celular em células do meristema radicular de *Allium cepa* L., portanto, apresentou atividade citotóxica mesmo após o tratamento.

Volpato *et al*. (2019), verificaram que o corante azul de metileno, usado na área laboratorial, após tratamentos de fotólise, fotocatálise, ozonização e ozonização associado à fotocatálise induziu a citotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* L. nos dois primeiros tratamentos, indicando a produção de metabólitos tóxicos após sua degradação.

Os POAs também foram empregados para a degradação da atrazina, herbicida de difícil degradação. Almeida *et al*. (2018), investigaram o efeito da fotocatálise heterogênea, combinação de luz UV ou solar com os catalisadores óxido de Zinco (ZnO), dióxido de

Titânio (TiO2) e óxido de Zinco impregnado com dióxido de Titânio, dopado com Ferro (ZnO/TiO2+Fe), pelo teste do micronúcleo em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*. Os resultados demonstraram que houve a degradação da atrazina, no entanto, os produtos gerados, assim como a atrazina, induziram alterações nucleares.

Furtado *et al*. (2020), avaliaram as águas residuais de uma lavanderia hospitalar antes e após tratamento por processo físico-químico e sua associação com POAs, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. Os autores verificaram que apesar dos tratamentos terem sido eficientes a ponto de os parâmetros físico-químicos alcançarem os padrões de lançamentos de efluentes, a associação do processo de tratamento físico-químico com UV e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentou efeito citotóxico.

Ainda nesse sentido, o setor têxtil está entre aqueles que mais utilizam a água nas suas etapas produtivas, levando a geração de grandes quantidades de efluentes ricos em corantes, metais pesados, surfactantes, entre outros. Vários processos são usados para o tratamento desses efluentes, os quais envolvem processos físicos e químicos como precipitação-coagulação, seguida de separação por flotação ou sedimentação, e nos últimos anos os POAs. Domingues *et al*. (2020), mostraram pelo teste com *Allium cepa* L. que os efluentes de uma indústria de tingimento de tecidos, tratados por métodos tradicionais e por POAs, induziram a citotoxicidade em células meristemáticas, ainda que tenham reduzido de forma significativa dos valores de demanda química e bioquímica de oxigênio, nitratos e nitritos, após esses tratamentos. Por sua vez, um estudo desenvolvido por Silva *et al*. (2018), com efluentes de uma lavanderia industrial tratados por sistema biológico com bactérias aeróbias, mostrou que o tratamento foi efetivo ao reduzir a citotoxicidade em *Allium cepa* L. observada no efluente bruto, além de melhorar os parâmetros físico-químicos.

Assim, o uso de sistemas biológicos para tratar os poluentes ambientais é uma abordagem efetiva e sustentável para mitigar os impactos adversos sobre o meio ambiente, já que este método acelera a decomposição de substâncias nocivas, transformando-as em produtos menos ou não tóxicos. Outro exemplo que reforça essa afirmativa é o trabalho de Heck *et al*. (2022), ao verificar que o efeito citotóxico encontrado em células meristemáticas de *Allium cepa* L. para o efluente bruto de uma indústria de embutidos, não foi mais observado após os processos de tratamento por remediação biológica com bactérias anaeróbicas e aeróbicas.

Portanto, enquanto os métodos fisico-químicos continuam a desempenhar um papel crucial na remediação de poluentes ambientais, é essencial considerar suas limitações e explorar abordagens complementares como os tratamentos biológicos e a remediação natural, para alcançar soluções mais abrangentes e sustentáveis para os desafios ambientais contemporâneos.

3. BIOPROSPECÇÃO

Dentro da biotecnologia, a integração da bioprospecção e do monitoramento ambiental oferece uma abordagem abrangente para a compreensão e gestão das complexas interações entre as atividades humanas e os ecossistemas naturais (Deroy; Darimont, 2019). A prospecção de recursos biológicos tem papel crucial no monitoramento e recuperação ambiental, principalmente na identificação de organismos que possuam a capacidade de degradar poluentes transformando-os metabolicamente em produtos finais menos tóxicos. Além disso, a compreensão e a bioprospecção de organismos vivos para avaliar a saúde e o estado de um ecossistema são estratégias que fortalecem ainda mais, a relação sinérgica entre a bioprospecção e o monitoramento ambiental (Bosch-Orea *et al.*, 2017; Aguilar-Pérez *et al.*, 2020).

Choix *et al*. (2023), trazem importantes apontamentos sobre o uso tradicional e moderno de microrganismos como indicadores de qualidade ambiental. Indicadores biológicos tradicionais como bactérias, vírus, fungos e helmintos são amplamente utilizados para monitorar contaminação ambiental, enquanto métodos modernos baseados em ciências ômicas oferecem análises mais complexas. A bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, é empregada para indicar contaminação fecal apesar das discussões sobre sua viabilidade em ambientes extra intestinais. *Enterococos* são indicadores ideais em áreas costeiras devido à sua correlação com patógenos halofílicos. Bactérias resistentes a antibióticos indicam urbanização e presença de resíduos de antibióticos, representando riscos à saúde ao transferir resistência a outros microrganismos. Fungos como *Aspergillus* e *Candida* são úteis como indicadores de poluição fecal e contaminação por metais pesados, embora seu crescimento lento seja uma limitação. Vírus entéricos, como norovírus e adenovírus, estão associados a efluentes de águas residuais, enquanto bacteriófagos são propostos como indicadores fecais alternativos. Helmintos servem como indicadores de contaminação fecal devido à sua durabilidade e capacidade de acumulação de metais pesados. Microalgas respondem a poluentes ambientais alterando seus níveis metabólicos e de diversidade, enquanto diatomáceas são eficazes na avaliação da poluição orgânica e nutricional de corpos d›água. Novos bioindicadores emergindo das ciências ômicas incluem comunidades microbianas específicas de diferentes tipos de poluição como plásticos e metais pesados. O avanço no desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas para detecção e quantificação desses bioindicadores torna-se, portanto, crucial para a implementação de estratégias eficientes de prospecção, restauração e conservação de ecossistemas.

Como um dos principais focos deste nicho, o uso da bioprospecção para identificar e caracterizar novos recursos biológicos como enzimas, proteínas ou microrganismos, pode levar ao desenvolvimento de estratégias inovadoras de biorremediação (Lellis *et al.*, 2019).

Na bioprospecção é comum que atenção seja dada a ambientes peculiares como desertos, fontes termais, florestas, locais inóspitos, águas ou solos contaminados. Isso acontece pois é esperado que nesses ambientes uma nova adaptação seja identificada, a qual poderá oportunizar a bioprospecção (Astolfi Filho *et al.*, 2014; Da Fonsêca *et al.*, 2022).

Um aspecto crítico na bioprospecção voltada à biorremediação é a identificação e exploração de diversas comunidades microbianas em ambientes contaminados, uma vez que esta biodiversidade detém a chave para desbloquear estratégias de biorremediação novas e mais eficientes (Gupta; Joia, 2016; Ojuederie; Babalola, 2017). Ao estudar as adaptações e mecanismos utilizados pelos micróbios nestes ambientes hostis, é possível obter conhecimentos sobre potenciais agentes de biorremediação e os fatores que influenciam a sua eficácia (Antízar-Ladislao, 2010; Kapahi; Sachdeva, 2019). Portanto, neste ponto de vista, quanto maior for a biodiversidade de um dado local, maior será a probabilidade de identificar moléculas diversas, sendo assim, maior o potencial de bioprospecção. Porém, ambientes com pressões seletivas específicas como a presença de contaminantes, podem favorecer o desenvolvimento e a proliferação de organismos que são resistentes e/ou que tenham ferramentas capazes de lidar com o agente biótico/abiótico, reduzindo, consequentemente, a biodiversidade.

Alguns trabalhos demonstram essa exploração em diferentes nichos. Da Fonsêca *et al.* (2022), identificaram grande diversidade microbiana indígena, desconhecida até o momento, em reservatórios profundos de petróleo do pré-sal, com potencial uso de genes ou organismos como remediadores de ambientes contaminados por petróleo ou derivados. Freitas *et al*. (2023), identificaram uma nova subespécie, com o nome proposto de *Acinetobacter baumannii oleum ficedula*, em reservatórios de petróleo com capacidade de crescer tendo o petróleo como única fonte de carbono, além de demonstrar habilidade de emulsificar querosene. De acordo com os autores, os isolados apresentam diversos genes envolvidos na degradação de

hidrocarbonetos, o que indica um potencial de degradar a maioria dos compostos tóxicos listados pelas agências reguladoras ambientais como ATSDR, EPA e CONAMA.

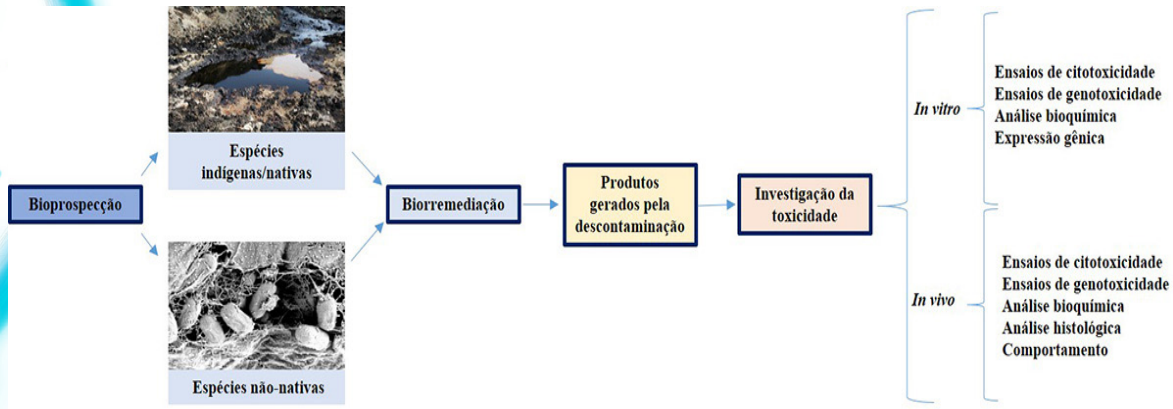
Os diferentes tipos de solo são também uma rica fonte para a bioprospecção microbiana. Firincă *et al*. (2024), por exemplo, descobriram que *Bacillus marisflavi* e *Trichoderma longibrachiatum* isolados de solo contaminado por atividades químicas e petroquímicas, de longo prazo, apresentaram tolerância, acima de moderada, a Cr, Pb e Zn. Além disso, o estudo demonstrou que *Trichoderma longibrachiatum* é uma opção viável para a biorremediação para Cr e Zn, enquanto que *Bacillus marisflavi* é para Pb.

Os microrganismos também podem viver em efluentes como os industriais. A capacidade de biorremediação de cepas bacterianas indígenas isoladas de efluente têxtil foi investigada por Gowri *et al*. (2020), e os resultados demonstraram que consórcios de bactérias nativas e a monocultura de *Bacillus velezensis* foram eficientes na descoloração e por esse motivo, são uma abordagem ambientalmente benéfica de baixo custo, e uma alternativa para métodos químicos de alto custo e prejudiciais ao meio ambiente.

Os corantes utilizados na indústria têxtil têm sido alvos de muitos estudos. Na revisão de Lellis *et al*. (2019), são discutidos os impactos prejudiciais dos corantes da indústria têxtil no meio ambiente e na saúde humana, destacando como estes corantes deterioram substancialmente a qualidade da água, inibem a fotossíntese e contribuem para a bioacumulação, mutagenicidade, toxicidade e carcinogenicidade, levando ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo dermatite, problemas respiratórios e câncer. O estudo ressalta as ineficiências e os altos custos associados aos tratamentos físico-químicos tradicionais de efluentes corantes e promove a biorremediação como uma solução sustentável. Para isso, o estudo destaca a utilização de plantas, bactérias, extremófilos e fungos para a degradação e mineralização destes poluentes, e afirma

que as tecnologias de biorremediação podem proporcionar benefícios econômicos e operacionais, ao mesmo tempo que representam menos riscos ambientais. Assim, destaca-se a importância da ação sinérgica entre a bioprospecção e o monitoramento ambiental para a investigação da toxicidade do próprio produto de bioprocessos, como na biorremediação (Figura 3).

Figura 3 - Bioprospecção e o monitoramento ambiental



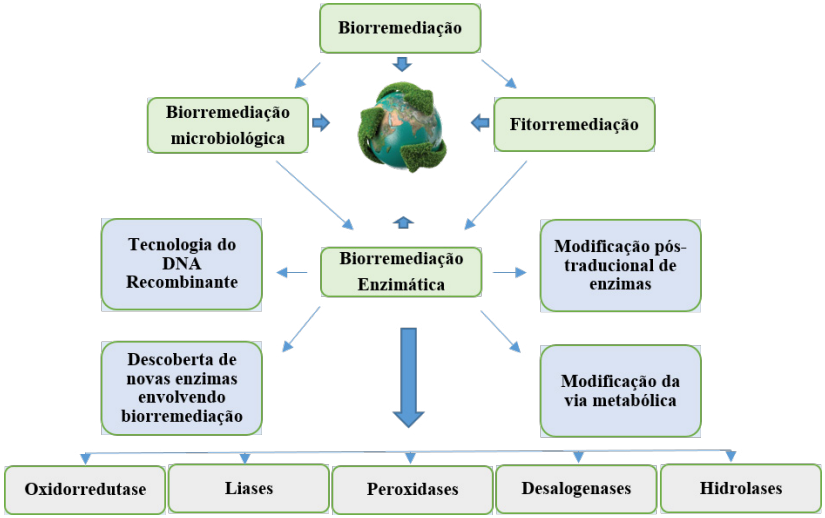
Fonte: Elaborada pelos autores.

Ainda nesta problemática, a bioprospecção de endófitos para estes fins tem sido explorada como um promissor nicho para a descoberta de novas linhagens microbianas. Os fungos endofíticos, que vivem nos tecidos vegetais sem causar danos, proporcionam benefícios substanciais na mitigação da poluição por corantes (Bulla *et al.*, 2017; Polli *et al.*, 2023). Eles são particularmente conhecidos por produzirem enzimas como lacase, lignina peroxidase, manganês peroxidase e tirosinase, que são eficazes na degradação de vários compostos corantes (Corrêa *et al.*, 2014). Os fungos endofíticos podem melhorar o processo de biodegradação através da sua ação enzimática, que inclui a quebra de moléculas complexas de corantes em substâncias menos nocivas. Isso os torna um recurso valioso para a biorremediação natural, segura e econômica de corantes têxteis.

5. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma área da biotecnologia ambiental que utiliza organismos vivos para degradar poluentes ambientais, transformando-os em subprodutos não maléficos ao meio ambiente e aos seres humanos. Dentre os organismos vivos mais utilizados, pode-se citar os microrganismos como fungos e bactérias, que através de suas atividades enzimáticas (liases, lacases, peroxidades, entre outras) e a utilização dos contaminantes como fonte de energia, podem desempenhar um excelente papel remediador (Figura 4). Além disso, é possível a utilização de microrganismos geneticamente modificados a fim de estimular maior produção de enzimas, que aumentarão a sua capacidade de biodegradação (Megharaj *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2022; Ayilara; Babalola, 2023).

Figura 4 - Estratégias de biorremediação



Fonte: Adaptado de Peralta (2022).

O emprego de fungos para a degradação de contaminantes ambientais também pode ser denominada de micorremediação. Além dos microrganismos, as plantas também apresentam um bom desempenho na redução de danos ambientais atuando como biorremediadoras, conhecido como fitorremediação. Ainda, a ficorremediação emprega microalgas e macroalgas na remediação de poluentes (Kumar *et al.*, 2022; Patel *et al.*, 2022).

A biorremediação pode ser realizada de maneira *in situ* ou *ex situ*. Os procedimentos *in situ* tratam a área contaminada no local da contaminação apresentando vantagens em relação ao custo de manuseio de materiais e ainda, alguns impactos ambientais podem ser reduzidos. Já, o procedimento *ex situ* envolve a remoção do meio contaminado para uma área de tratamento controlado, porém, possui custos elevados. Para a determinação de uma dessas abordagens algumas características devem ser levadas em consideração como: a natureza do poluente, profundidade e quantidade, tipo de ambiente, localização, custo e políticas ambientais. Além do mais, o desempenho dos agentes biorremediadores baseado nas concentrações de oxigênio e nutrientes, temperatura, pH e outros fatores abióticos, são importantes para o sucesso dos processos de biorremediação, e por esse motivo, sua padronização é muito importante (Smith *et al.*, 2015).

A remediação pode ser diferenciada em aeróbica, anaeróbica ou cometabólica, que será escolhida de acordo com o tipo de contaminante a ser tratado. Desta forma, a biorremediação aeróbica necessita de oxigênio para que ocorram as reações remediadoras, através da utilização de substrato de carbono como doador de elétrons e oxigênio como aceptor de elétrons por meio dos microrganismos. A anaeróbica aborda outra tática, por meio da fermentação, metanogênese, descoloração redutiva e condições de redução de sulfato e nitrato. Por fim, a biorremediação cometabólica degrada o contaminante através de uma reação secundária, ou seja, ocorre pela ação da atividade enzimática (Bala *et al.*, 2022).

Neste contexto, há medidas que podem ser tomadas com o objetivo de auxiliar e garantir a eficácia da remediação de um local como por adição (bioaumento) ou alterações (bioestimulação) de microrganismos no local poluído. A bioaumentação pode ser usada quando os microrganismos necessários para degradar os poluentes estão presentes naturalmente no local contaminado, ou estão em uma população muito baixa para serem eficazes. A bioestimulação pode ser realizada quando há os microrganismos necessários para degradar o poluente no local contaminado, porém, as condições ambientais não favorecem o seu crescimento. Assim, é de extrema importância a manutenção do local a ser tratado, garantindo que haja disponibilidade suficiente de nutrientes para que os microrganismos biodegradadores consigam crescer e multiplicar-se e dessa forma, atuarem na remediação de locais contaminados (Bala *et al.*, 2022).

Portanto, a partir da biorremediação os poluentes podem ser alterados para metabólitos menos nocivos ou inócuos ou ainda ser degradados, ou seja, é um processo onde organismos ou parte deles como enzimas, são usados para remover ou neutralizar um poluente ambiental por meio de processos metabólicos.

5.1 BIORREMEDIAÇÃO E CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Os microrganismos vêm sendo aplicados em estudos biotecnológicos para avaliar o potencial de descoloração e/ou degradação de diferentes agentes contaminantes. Um poluente que vem ganhando cada vez mais atenção, devido ao seu alto risco de ser prejudicial aos ecossistemas, são os corantes dos efluentes têxteis.

Desta maneira, Ali e Muhammad (2008), utilizaram o fungo endofítico *Alternaria solani* para descolorir soluções aquosas contendo o corante Acid Violet 19. Os resultados demonstraram que o fungo mostrou potencial promissor para a descoloração do corante com capacidade de descoloração de 88,6% após quatro dias.

Os autores destacam que com o aumento do tempo de contato, a descoloração diminuiu, mostrando que parte do corante adsorvido foi dessorvido, principalmente em concentrações mais altas de corante.

Processos parecidos foram descritos por Polli *et al.* (2023), uma vez que nanobiocompósitos (NBC) produzidos a partir de fungos endofíticos (*Aspergillus flavus*: A*f*-CL-7) e nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) foram utilizados na biorremediação do corante têxtil Preto Reativo 5 (RB5). O A*f*-CL-7 descoloriu o meio de cultura contendo RB5 (0,1 g/L^{-1}) após sete dias de incubação. O micélio apresentou coloração semelhante à do corante no meio de cultura, indicando a possibilidade de biorremediação por biossorção e/ou biodegradação. Estudos de Chakraborty *et al.* (2013), também abordaram a descoloração de um corante têxtil. Os autores utilizaram uma cepa fúngica de podridão branca, *Alternaria alternata* (CMERI F6), na descoloração do corante vermelho congo. Nesse caso ocorreu uma descoloração de 99,99% de 600mg/L do corante em 48 horas, tendo como condições ideais o meio de extrato de levedura-glicose a 25°C, pH 5 e sob agitação à 150 rpm.

A importância da otimização das condições para a biorremediação também foi trazida no estudo de Lima *et al*. (2023), ao avaliar a capacidade de descoloração do corante azo Disperse Red 1, por fungos endofíticos. Os autores verificaram que os principais fatores que influenciaram na descoloração foram a condição de incubação e a concentração de glicose. Após a padronização, a capacidade de descoloração das linhagens foi superior a 81%, com atividade principalmente de enzimas lacases.

Na mesma linha de pesquisa, três cepas bacterianas foram isoladas de efluentes de indústrias têxteis objetivando a biorremediação de corantes. Após o isolamento, as cepas *Bacillus cereus*, *Micrococcus roseus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram colocadas em contato com o corante vermelho de metila. Ao final do processo foi possível notar que entre os isolados, *Pseudomonas aeruginosa*

mostrou maior eficiência de descoloração (99,09%) após sete dias. *Micrococcus roseus* apresentou uma redução de 80,22% na cor da solução teste, enquanto *Bacillus cereus* apresentou 85,63% de descoloração. E o potencial descolorante do consórcio das três cepas resultou em 78,36% de redução da cor (Chellanpandian *et al.*, 2024). Desta forma, nota-se o grande potencial descolorante que os fungos e bactérias podem desempenhar, deixando-os em evidência como ferramentas biotecnológicas que podem ser empregadas na biorremediação de poluentes.

Os microrganismos não são empregados apenas na descoloração e/ou biodegradação de efluentes têxteis, eles também podem ser utilizados como auxiliares na descontaminação de solos atingidos por poluentes. Isso foi observado no estudo de Liu *et al*. (2020), em que bactérias *Stenotrophomonas maltophilia* foram isoladas de uma área de desmantelamento de lixo eletrônico, com o objetivo de avaliar sua capacidade em degradar hidrocarboneto de petróleo. Essa cepa foi adicionada a solos contaminados com óleo por um período de 60 dias. Durante o período de remediação foi possível verificar que as taxas de remoção de petróleo aumentaram gradualmente ao longo do tempo, e após o período de tratamento, a taxa máxima de remoção foi de 57% e a mínima foi de 22,4%. Os autores concluíram que a atividade microbiana seria mais eficiente se houvesse a reposição de nutrientes nos solos, para que os microrganismos mantivessem sua atividade metabólica e assim, continuassem utilizando o óleo como fonte de carbono.

A descontaminação de solos também foi avaliada por meio do potencial biodegradador de bactérias *Acinetobacter* sp. 33F, onde os solos agrícolas foram pulverizados com dibutil ftalato (DBP) e os resultados demonstraram que houve redução de aproximadamente 50% de DBP após 144 horas de exposição (Sharma *et al.*, 2021). Com isso, pode-se ver também, o grande potencial da atividade biodegradadora dos microrganismos no combate à poluição de solos.

5.2 BIORREMEDIAÇÃO E MONITORAMENTO AMBIENTAL

De acordo com Guo *et al.* (2021), são escassos os trabalhos sobre os potenciais impactos ambientais remanescentes após abordagens de biorremediação. Contudo, é importante que a afirmativa de que a biorremediação produz ou conduz a xenobióticos menos tóxicos seja de fato atestada, para garantir que esse tipo de tratamento reduza o impacto de contaminantes ambientais e assim garanta a sua efetividade. Portanto, os ensaios ecotoxicológicos são uma ferramenta complementar para monitorar a eficiência da biorremediação (Wei *et al*., 2020).

Nesse sentido, dois estudos desenvolvidos no Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental da Universidade Estadual de Maringá, demonstraram que fungos endofíticos apresentaram alta atividade de descoloração para os azo corantes Disperse Blue 291 e Disperse Violet 93. O efeito dos produtos da descoloração dos corantes também foi avaliado sobre o microcrustáceo *Artemia salina* e os resultados demonstraram um percentual de letalidade significativamente menor do que o tratamento somente com os corantes (dados ainda não publicados).

Ainda em relação a biorremediação de corantes Bulla *et al*. (2017), verificaram que fungos endofíticos *Phlebia* sp. e *Paecilomyces formosus*, após 30 dias de tratamento, descoloriram os corantes têxteis Reactive Blue 19 e Reactive Black 5. Os autores avaliaram, pelo teste do micronúcleo em eritrócitos de *Astyanax* sp. o potencial de indução de danos no DNA. Os resultados demonstraram que os corantes na concentração de 0,01 g mL^{-1} induziram o aparecimento de micronúcleos, enquanto os produtos da descoloração reduziram a frequência de células micronucleadas em aproximadamente 20%, indicando um potencial para aplicação destes fungos na biorremediação destes dois corantes têxteis.

Por sua vez, Silva *et al*. (2023), utilizaram um efluente bruto, proveniente de uma indústria têxtil, consistindo em uma mistura de diversos corantes e outras substâncias químicas, como detergentes, amaciantes, metabissulfito, abrasivos e permanganato, para avaliar a efetividade da biorremediação por *Bacillus subitilis* CCT 7712. De acordo com os autores o efluente bruto, em todas as concentrações testadas, assim como o efluente tratado por biorremediação, induziram um aumento da frequência de micronúcleos, de alterações na morfologia celular e lesões no DNA, de eritrócitos de *Astyanax lacustris*. Segundo o estudo, são necessárias melhorias no processo de biorremediação para reduzir a toxicidade do efluente gerado após o tratamento.

A avaliação dos parâmetros ecotoxicológicos da biorremediação do solo são ainda mais escassos quando comparados aos ambientes aquáticos e águas residuais. Zawierucha *et al*. (2022), analisaram a capacidade de biorremediação de bactérias presentes em solos contaminados por hidrocarbonetos. Além disso, verificaram a toxicidade por meio do teste de germinação em vegetais superiores e pelo teste com microcrustáceos ostracodes. Os resultados demonstraram que embora os hidrocarbonetos tivessem sido biodegradados, os solos foram moderadamente fitotóxicos e extremamente tóxicos para os ostracodes, já que houve 100% de mortalidade para os microcrustáceos. O estudo destaca a importância desse tipo de investigação no progresso do processo de descontaminação do solo, por possibilitar uma abordagem adequada de recuperação de áreas degradadas.

Shen *et al*. (2016), monitoraram a ecotoxicidade de solos contaminados artificialmente por óleo, durante as diferentes fases da biorremediação. A biorremediação foi realizada com um consórcio de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo, cepas *Burkholderia cepacia* GS3C, *Sphingomonas* GY2B e *Pandoraea pnomenusa* GP3B, adaptadas ao petróleo bruto. Vários parâmetros foram avaliados para o monitoramento, dentre eles a inibição da

germinação de sementes e crescimento de plantas e luminescência de *Photobacterium fosforeum*. Foi observada uma redução de 64,4% de hidrocarbonetos de petróleo, no entanto, durante as etapas do tratamento essa redução não acompanhou a redução da ecotoxicidade do solo, especialmente em relação ao crescimento das plantas e a luminescência. Os autores enfocam ainda, que ocorreu um aumento da toxicidade na fase inicial do processo de biorremediação, possivelmente em razão da formação de metabólitos intermediários caracterizados por alta toxicidade.

Assim, ressalta-se que as condições encontradas para a biorremediação e o monitoramento ecotoxicológico desse processo devem ser avaliados caso a caso, pois, são únicos. Entre os fatores que precisam ser considerados estão os níveis de contaminação baixos, moderados ou altos, a sensibilidade e disponibilidade dos bioindicadores e os tipos de biomarcadores, objetivando minimizar potenciais falhas durante a investigação pela falta de responsividade do sistema utilizado, além de considerar a relação custo-eficácia.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A poluição ambiental é uma problemática mundial e por isso não está limitada apenas aos grandes centros urbanos ou regiões agricultáveis, pois, os poluentes ambientais podem ser encontrados inclusive em locais remotos. A industrialização intensiva e o aumento da demanda por produtos, para atender os mais diversos setores da sociedade, têm contribuído significativamente para a disseminação de poluentes. Obviamente que esse aumento está relacionado ao crescimento populacional que intensifica a pressão sobre os recursos naturais, aumentando a produção e o consumo de produtos, e consequentemente, a liberação de xenobióticos no meio ambiente.

Nesse sentido, o monitoramento ambiental é uma estratégia importante para gerenciar e minimizar o impacto que as atividades humanas têm no ambiente, objetivando tanto cumprir as normas regulatórias quanto mitigar os riscos de efeitos nocivos aos diferentes ecossistemas e organismos. Por esse motivo, abordagens que envolvam a biorremediação também devem ser monitoradas, especialmente levando em consideração que os estudos ecotoxicológicos nessa área ainda apresentam grandes lacunas. Investigações mais aprofundadas e amplas, que envolvam o uso de diferentes bioindicadores e biomarcadores são necessários para compreender melhor os mecanismos de transformação e degradação dos contaminantes durante o processo de biorremediação, especialmente em contextos ambientais variados e complexos. Além disso, é importante avaliar o impacto da biorremediação não apenas no momento em que ela ocorra, mas também de maneira periódica, principalmente para compreender e comprovar os efeitos em longo prazo, após o processo de descontaminação, para testar a sua eficácia e segurança.

Em suma, a investigação ecotoxicológica dos produtos gerados e as fases do processo de biorremediação continua a ser um campo em evolução, com vasto potencial para contribuir significativamente para a gestão sustentável de ambientes contaminados. Se enquadra nessa gestão, para um futuro mais sustentável, o estabelecimento de padrões de qualidade ambiental e a definição de limites aceitáveis para a presença de subprodutos e metabólitos no ambiente após a aplicação de técnicas de biorremediação, contudo, para que isso seja possível é fundamental a adoção dos ensaios ecotoxicológicos, que envolvam abordagens multidisciplinares.

7. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *In*: **Methods in Enzymology**. Academic Press, p. 121-126. 1984.

AGUILAR-PÉREZ, K. M.; HEYA, M. S.; PARRA-SALDÍVAR, R.; IQBAL, H. M. Nano-biomaterials in-focus as sensing/detection cues for environmental pollutants. Case **Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, p. 100055, 2020.

ALI, H.; MUHAMMAD, S. K. Biodecolorization of Acid Violet 19 by *Alternaria solani*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 831-833, 2008.

ALMEIDA, A. C. C.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Efeitos da Exposição ao Herbicida Atrazina Degradado por Fotocatálise e dos seus Metabólitos: Análise por Biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

ALMEIDA, A. C. C.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da Citotoxicidade e Mutagenicidade dos Lixiviados, Bruto e Tratado, do Aterro Sanitário de Maringá-PR, em *Allium cepa* L. e Teste de Ames**. 2015. Monografia (Graduação) - Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonela/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects**. v. 31, p. 347-363, 1975.

ANTÍZAR-LADISLAO, B. Bioremediation: working with bacteria. **Mineralogical Society of America**, v. 6, n. 6, p. 389-394, 2010.

ARTIOLA, J. F.; BRUSSEAU, M. L. The Role of Environmental Monitoring in Pollution Science. *In*: BRUSSEAU, M.L; PEPPER, I. L.; GERBA, C.P. **Environmental and Pollution Science**. Academic Press, p. 149-162, 2019.

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014.

AYILARA, M. S.; BABALOLA, O. O. Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. **Frontiers in Agronomy**, v. 5, 2023.

BALA, S.; GARG, D.; THIRUMALESH, B. V.; SHARMA, M.; SRIDHAR, K.; INBARAJ, B. S.; TRIPATHI, M. Recent Strategies for bioremediation of emerging pollutants: A review for a green and sustainable environment. **Toxics**, v. 10, n. 8, p. 484, 2022.

SUMÁRIO

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. Elsevier Health Sciences, 6 ed., p. 1-744, 2007.

BOSCH-OREA, C.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Biosensors and Bioassays for Environmental Monitoring. *In*: PALCHETTI, I.; HANSEN, P.-T.; BARCELÓ, D. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 77, p. 337-383, 2017.

BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. D. B.; KAVA, V.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, p. 1-11, 2017.

BUZO, M. G.; CÓTICA, L. F.; VICENTINI, V. E. P. **Alterações Genéticas e Histológicas em Peixes Neotropicais Expostos a Nanopartículas de Prata**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

CAETANO, M. S.; VOLPATO, L. M.; VICENTINI, V. E. P. 2021. **Avaliação do Potencial Citotóxico e Mutagênico das Águas Residuais de Postos de Combustíveis de Maringá-PR, em *Allium cepa* L**. PIBIC (Graduação) – Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2021.

CETESB. **Bioindicadores: O uso de bioindicadores vegetais no controle da poluição atmosférica**. Disponível em: Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/solo/bioindicadores/. Acesso em 10 de mar de 2023.

CHAKRABORTY, S.; BASAK, B.; DUTTA, S.; BHUNIA, B.; DEY, A. Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 662-666, 2013.

CHELLANPANDIAN, K.; DEVAPRIAM, J. J.; LAKSHMIPATIA, V.; ARUMUGAM, B.; RAMARAJ, S. K.; AL-QAHTANI, W. H. Biorremediação de efluentes têxteis usando micróbios indígenas. **Jornal da Sociedade Química Indiana**, v. 101, n. 9, 2024.

CHOIX, F. J.; PALACIOS, O. A.; NEVAREZ-MOORILLÓN, G. V. Traditional and new proposals for environmental microbial indicators - a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 12, p. 1521, 2023.

COOPER, R.; DAVID, A.; LANGE, A.; TYLER, C. R. Health effects and life stage sensitivities in zebrafish exposed to an estrogenic wastewater treatment works efluent. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 666656, 2021.

SUMÁRIO

CORRÊA, R. C.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; DE SOUZA, C. G.; POLIZELI, M. DE L.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

COSTA, A.; DOMINGUES, G.; DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxicity of Waters of the River Peixe (São Paulo-Brazil), in meristematic root cells of Allium cepa L. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 248-258, 2015.

CRESENCIO, C. JR.; ABELADA, J. J. Z.; APOSTADO, R. R. Q.; HERNANDO, B. J. H.; LADOR, J. E. C.; OBENZA, O. L. P.; PRESILDA, C. J. R.; HAVANA, H. C. *Allium cepa* test: an evaluation of genotoxicity. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 7, p. 12-19, 2017.

DA FONSÊCA, M. M. B.; FREITAS, J. F.; SILVA-PORTELA, R. C. B.; MINNICELLI, C. F.; DA SILVA-BARBALHO, K. K.; AGNEZ-LIMA, L. F. First insights into bacterial communities in pre-salt oil reveal a far-from-sterile environment. **Fuel**, v. 312, p. 122860, 2022.

DATTA, S.; SINGH, J.; SINGH, J.; SINGH, S.; SINGH, S. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 4, p. 171-178, 2018.

DE BASTIANI, V. I. M.; SPIES, M. R.; FRANCO, J. L.; ZANIOL, F.; DAL MAGRO, J.; LUCAS, E. M.; SANTOS, T. G. Agro is not cool: DNA damage and oxidative stress in anurans evidencing the devastation of subtropical grasslands. **Aquatic Science**, v. 86, n. 2, p. 15, 2024.

DEROY, B. C.; DARIMONT, C. T. Biocultural indicators to support locally led environmental management and monitoring. **Ecology and Society**, v. 24, n. 4, p. 21, 2019.

DOMINGUES, G.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxicity of crude and treated liquid effluents from textile industry dyeing using bioindicator *Allium cepa* L. **Water Air Soil Pollution**, v. 231, p. 448, 2020.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. Allium cepa L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1793-1800, 2014.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

EUROPEAN COMMISSION. Directorrate-General for Environment**. EU Action Plan: Towards Zero Pollution for Air, Water and Soil**. Document 52021DC0400, 2021.

FENECH, M.; KNASMUELLER, S.; BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; KIRSCH-VOLDER, M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FIRINCĂ, C.; ZAMFIR, L.-G.; CONSTANTIN, M.; RĂUT, I.; CAPRĂ, L.; POPA, D.; JINGA, M.-L.; BAROI, A.M.; FIERĂSCU, R.C.; CORNELI, N.O.; POSTOLACHE, C.; DONI, M.; GURBAN, A.-M.; JECU, L.; ȘESAN, T.E. Microbial Removal of Heavy Metals from Contaminated Environments Using Metal-Resistant Indigenous Strains. **Journal of Xenobiotics**, v. 14, p. 51-78, 2024.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, n. 3, p. 291-298, 1993.

FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosome. **Stain Technology**, 3, 247-251, 1956.

FREITAS, J. F.; SILVA, D. F. L.; SILVA, B. S.; CASTRO, J. N. F.; FELIPE, M. B. M. C.; SILVA-PORTELA, R. C. B.; MINNICELLI, C. F.; AGNEZ-LIMA, L. F. Genomic and phenotypic features of Acinetobacter baumannii isolated from oil reservoirs reveal a novel subspecies specialized in degrading hazardous hydrocarbons. **Microbiological Research**, v. 273, p. 127420, 2023.

FURTADO, A. O.; ALMEIDA, I. V.; ALMEIDA, A. C. C.; ZOTESSO, J. P.; TAVARES, C. R. G.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of hospital laundry effluents treated by advanced oxidation processes and their cytotoxic effects on *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 192, n. 6, p. 360, 2020.

GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; AUCLAIR, J.; LACAZE, É.; QUINN, B. **Biochemical Ecotoxicology: Principles and methodos**. United States of America: Elsevier, 1 ed., p.1-282, 2014.

GAJSKI, G.; ZEGURA, B.; LADEIRA, C.; NOVAK, M.; SRAMKOVA, M.; POURRUT, B.; BO, C. D.; MILIÉ, M.; GUTZKOW, K. B.; COSTA, S.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 130-164, 2019a.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO, C.; NOVAK, M.; SRAMKOVA, M.; MILIC, M.; GUTZKOW, K. B.; COSTA, S.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 779, p. 82-113, 2019b.

SUMÁRIO

GAUTHIER, P. T.; VIJAYAN, M. M. Municipal wastewater effluent exposure disrupts early development, larval behavior, and stress response in zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 259, p. 113757, 2020.

GODOI, K. D. S. P.; SPÓSITO, J. C. V.; ROCHA, A. D. N.; CANDIDO, L. S.; SILVA, C. A. M.; LEMKE, A. P.; DA SILVA, S. V.; SCALON, S. D. P. Q.; DE CARVALHO, E. M.; MUSSURY, R. M. Mutagenicity in *Tradescantia pallida* as an indicator of the effect of air pollution and human health. **Atmosphere**, v. 12, p. 1185, 2021.

GONINO, G. M. R.; BENEDITO, E. **Efeitos Antrópicos sobre a Comunidade de Peixes e a Integridade Biótica de Riachos: Monoculturas, Cinzas e Espécies Não-Nativas**. 2019. Tese (Doutorado) - Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

GONINO, G.; BRANCO, P.; BENEDITO, E.; FERREIRA, M.T.; SANTOS, J.M. Short-term effects of wildfire ash exposure on behaviour and hepatosomatic condition of a potamodromous cyprinid fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864). **Science of The Total Environment**, v. 665, p. 226-234, 2019.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Research**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.

GOWRI, A.K.; KARUNAKARAN, M.J.; MUTHUNARAYANAN, V.; RAVINDRAN, B.; NGUYEN-TRI, P.; NGO, H. H.; BUI, X.-T.; NGUYEN, X. H.; NGUYEN, D. D.; CHANG, S. W.; CHANDRAN, T. Evaluation of bioremediation competence of indigenous bacterial strains isolated from fabric dyeing efluente. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100536, 2020.

GUO, S.; XIAO, C.; ZHOU, N.; CHI, R. Speciation, toxicity, microbial remediation and phytoremediation of soil chromium contamination. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1413–1431, 2021.

GUPTA, A. S.; JOIA, J. Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: a review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 8, n. 4, p. 364-372, 2016.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 580-587, 1974.

HAINES, G.; MARPLES, B.; DANIEL, P.; MORRIS, I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. **Reproductive Toxicology: In Vitro Germ Cell Developmental Toxicology, from Science to Social and Industrial Demand**, p. 79-93, 1998.

HECK, M. C.; ITO, S. S. F.; YOSHIMOTO-HIGAKI, M.; GODOY, M. A. F. de; VICENTINI, V. E. P. Effects of sausage industry effluents before and after bacterial biodegradation treatment and cytotoxicity in Allium test. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e22811931525, 2022.

ISO. INTERNATIONAL OGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1:2008 Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviourPart 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*), 1 ed., 2008. Disponível em: < https://www.iso.org/standard/38402.html>. Acesso em Acesso em: 30 mai. 2024.

JEYAVANI, J.; SIBIYA, A.; BHAVANIRAMYA, S.; MAHBOOB, S.; AL-GHANIM, K. A.; NISA, ZAIB-UN.; RIAZ, M. N.; NICOLETTI, M.; GOVINDARAJAN, M.; VASEEHARAN, B. Toxicity evaluation of polypropylene microplastic on marine microcrustacean *Artemia salina*: An analysis of implications and vulnerability. **Chemosphere**, v. 296, p. 133990, 2022.

KAPAHI, M.; SACHDEVA, S. Bioremediation options for heavy metal pollution. **Journal of Health and Pollution**, v. 9, n. 24, p. 191203, 2019.

KUMAR, A.; MALLICK, S. P.; SINGH, D.; GUPTA, N. **Chapter 1: Advances in bioremediation: introduction, applications, and limitations**. *In*: KUMAR, S.; HASHMI, M. Z. Advances in pollution research: Biological approaches to controlling pollutants. Elsevier, p. 1-11, 2022.

KUMARI, P.; KUMAR, A. Advanced oxidation process: A remediation technique for organic and non-biodegradable pollutant. **Results in Surfaces and Interfaces**, v. 11, p. 100122, 2023.

LELLIS, B.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275-290, 2019.

LIMA, P. R.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. **Danos Induzidos em *Allium cepa* L. pela Ação de Efluentes Industriais Oriundos do Processo de Anodização de Alumínio**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

LIMA, P. R.; SALVADORI, D. M. F.; VICENTINI, V. E. P. **Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Degradação do Corante Azo Disperse Red 1.** 2023. Qualificação (Doutorado) – Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023.

LIU, H.; TAN, H.; GUO, J.; LIANG, X.; XIE, Q.; CHEN, S. Bioremediation of oil-contaminated soil by combination of soil conditioner and microorganism. **Journal of Soils and Sediments**, v. 20, p. 2121–2129, 2020.

LÚCIO, F. T.; ALMEIDA, I. V.; BUZO, M. G.; VICENTINI, V. E. P. Genetic instability in farmers using pesticides: A study in Brazil with analysis combining alkaline comet and micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 886, p. 503587, 2023.

MA, T. H; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MAGNONI, D. M.; HECK, M. C.; GIGLIOLLI, A. A. S.; BUZO, M. G.; MOLKE, A. S.; DE SYLLOS, R. S.; LIMA, O. C. M.; VICENTINI, V. E. P. Nuclear and morpho-histopathological alterations in *Astyanax altiparanae* exposed to effluent from the process of anodizing aluminum. **Aquatic Toxicology**, v. 262, p. 106637, 2023.

MARINI, E.; DE BERNARDI, A.; TAGLIABUE, F.; CASUCCI, C.; TIANO, L.; MARCHEGGIANI, F.; VACCARI, F.; TASKIN, E.; PUGLISI, E.; BRUNETTI, G.; VISCHETTI, C. Copper toxicity on *Eisenia fetida* in a vineyard soil: a combined study with standard tests, genotoxicity assessment and gut metagenomic analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 13141-13154, 2024.

MEGHARAJ, M. VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. **Bioremediation**. In: WEXLER, P. Encyclopedia of toxicology. Elsevier, Ed. 3, p. 485-489, 2014.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MØLLER, P.; AZQUETA, A.; BOUTET-ROBINET, E.; KOPPEN, G.; BONASSI, S.; MILIC, M.; GAJSKI, G.; COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P.; PEREIRA, C. C.; DUSINSKA, M.; GODSCHALK, R.; BRUNBORG, G.; GUTZKOW, K. B.; GIOVANELLI, L.; COOKE, M. S.; RICHLING, E.; LAFFON, B.; VALDIGLESIAS, V.; BASARAN, N.; BO, C. D.; ZEGURA, B.; NOVAK, M.; STOPPER, H.; VODICKA, P.; VODENKOVA, S.; ANDRADE, V. M.; SRAMKOVA, M.; GABELOVA, A.; COLLINS, A.; LANGIE, S. A. S. Minimum information for reporting on the comet assay (MIRCA): Recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020.

MOREIRA, F. A. S.; MENDONÇA, D. E. A.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da Toxicidade do Microplástico Glitter Branco sobre o Microcrustáceo *Artemia salina***. 2023. Monografia (Graduação) - Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63., 1983.

MÜNZEL, T.; HAHAD, O.; DAIBER, A.; LANDRIGAN, P. J. Soil and water pollution and human health: what should cardiologists worry about? **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 2, p. 440-449, 2023.

NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; DE MIGUEL, M.; DE LA TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 389, n. 2-3, p. 271-277, 1997.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Earthworm, Acute Toxicity Tests. Guideline 207, p. 1-9, 1984. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests_9789264070042-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Neurotoxicity Study in Rodents. Guideline 242, p. 1-15, 1997. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-424-neurotoxicity-study-in-rodents_9789264071025-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Guideline 236, p. 1-22, 2013. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Guideline 489, p. 1–27, 2016a. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline 474, p. 1–21, 2016b. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264224292-en>. Acesso em: 30 mai. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. Guideline 473, p. 1-22, 2016c. Disponível em: < https://www.oecd.org/en/publications/2016/07/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_g1g6ed0e.html>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Rodent Dominant Lethal Test. Guideline 478, p. 1-15, 2016d. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-478-rodent-dominant-lethal-test_9789264264823-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test. Guideline 483, p. 1-13, 2016e. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-483-mammalian-spermatogonial-chromosomal-aberration-test_9789264264847-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Genetic toxicology, Mouse Heritable Translocation Assay. Guideline 485, p. 1-6, 1986. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-485-genetic-toxicology-mouse-heritable-translocation-assay_9789264071506-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Guideline 425, p. 1-29, 2022a. Disponível em: < https://www.oecd.org/en/publications/2022/06/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_g1gh2953.html>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays. Guideline 488, p. 1-29, 2022b. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-488-transgenic-rodent-somatic-and-germ-cell-gene-mutation-assays_9789264203907-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure. Guideline 402, p. 1-13, 2017. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-402-acute-dermal-toxicity_9789264070585-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test. Guideline 471, p. 1-12, 2020. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Guideline 487, p. 1–30, 2023. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Chronic Toxicity Studies. Guideline 452, p. 1-18, 2018. Disponível em: < https://www.oecd.org/en/publications/2018/06/test-no-452-chronic-toxicity-studies_g1gh2957.html>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Earthworms reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Guideline 222, p. 1-21, 2016f. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>. Acesso em: 30 jun. 2024.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OJUEDERIE, O. B.; BABALOLA, O. O. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1504-1504, 2017.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; ALBARICO, F. P. J. B.; PANDEY, A.; CHEN, C. W.; DONG, C. D. Organic wastes bioremediation and its changing prospects. **Science of The Total Environment**, v. 824, 2022.

PATTANAYAK, S.; DAS, S.; NAVYASRI, K. Bioindicator Emerged as a Potential Environmental Marker. **International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology**, v.13, n.3, p. 339-344, 2020.

PERALTA, R. M. **Biodegradação e Biorremediação (Ênfase em Bactérias e Fungos)**. Canoas: Meérida Publishers, 228p, 2022.

SUMÁRIO

PINHA, L.; FIGUEIREDO, B. R. S.; HECK, M. C. **Investigação do Potencial Genotóxico e de Alterações Comportamentais em *Moenkhausia forestii* Expostos ao Herbicida Paraquat**. 2019. Monografia (Graduação) - Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

POLLI, A. D.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; RIBEIRO, M. A. D. S.; POLONIO, J. C.; ROSINI, B.; OLIVEIRA, J. A. D. S.; BINI, R. D.; GOLIAS, H. C.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; ORLANDELLI, R. C.; VICENTINI, V. E. P.; COTICA, L. F.; PERALTA, R. M.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Synthesis, characterization, and reusability of novel nanobiocomposite of endophytic fungus *Aspergillus flavus* and magnetic nanoparticles (Fe3O4) with dye bioremediation potential. **Chemosphere**, v. 340, p. 139956, 2023.

PRADO, P. A.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Glitter Prata e o Impacto sobre o Microcrustáceo *Artemia salina***. 2023. Monografia (Graduação) - Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023.

PRAZERES, J. A.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. **Citotoxicidade e genotoxicidade do mix dos agroquímicos 2,4-D, glifosato e atrazina *in vitro***. 2019. Monografia (Graduação) – Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

RADWAN, M. A.; GAD, A. F.; ABD EL-AZIZ, A. M.; EL-GENDY, K. S. Does commercial indoxacarb pose ecotoxicological consequences? Employing a multi-marker approach in the model species *Theba pisana*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 22, p. 31911-31924, 2024.

RESTREPO, J. C. P. S.; ANTONELO, D. I.; SAUER, T.; TONIAL, I. B.; MANOSSO, F. C.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; DÜSMAN, E. Changes in physicochemical and toxicological parameters of waters of Trincheira's River caused by road construction. **Revista Ambiente e Água**, v. 14, p. 1-14, 2019.

SALVADORI, D. M. F.; TAKAHASHI, C. S.; GRISOLIA, C. K.; SANTOS, R. A. (Org.). **Da toxicogenética à toxicogenômica.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2021.

SARAVANATHAMIZHAN, R.; PERARASU, V. T. Improvement of Biodegradability Index of Industrial Wastewater Using Different Pretreatment Techniques, *In* SHAH, M. P.; SARKAR, A.; MANDAL, S. **Wastewater Treatment**, Elsevier, p. 103-136, 2021.

SCHULTE, R. T. OHL, D. A.; SIGMAN, M.; SMITH, G. D. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p. 3-12, 2010.

SHARMA, N.; KUMAR, V.; MAITRA, S. S.; LAKKABOYANA, S. K.; KHANTONG, S. DBP biodegradation kinetics by *Acinetobacter* sp. 33F in pristine agricultural soil. **Environmental Technology and Innovation**, v. 21, 2021.

SHEN, W.; ZHU, N.; CUI, J.; WANG, H.; DANG, Z.; WU, P.; LUO, Y.; SHI, C. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 120-128, 2016.

SILVA, J. M.; NAVONI, J. A.; FREIRE, E. M. X. Lizards as model organisms to evaluate environmental contamination and biomonitoring. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 192, n. 7, p. 454, 2020a.

SILVA, J. R. R.; GREGÓRIO, A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; FERNANDES, C. A. Genotoxicity and cytotoxicity of textile production effluents, before and after *Bacillus subitilis* bioremediation, in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae). **Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 886, p. 503-588, 2023.

SILVA, J. S.; ALMEIDA, I. V.; LIMA, P. R.; YOSHIMOTO-HIGAKI, M.; VICENTINI, V. E. P. **Water Cytotoxicity of the Irrigated Rice Farming from the Ivaí River Valley - PR, in *Allium cepa* L.** *In*: XIV Congresso da Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental, 2019, Bento Gonçalves. Anais do XIV Congresso da Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental. Bento Gonçalves: Mutagen, p. 83, 2019.

SILVA, J. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. **Efeitos Citotóxico, Genotóxico e Alterações Morfológicas Induzidas pelos Herbicidas Glifosato, Atrazina, 2,4-D em Sistemas Vegetal e Animal**. 2020. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020b.

SILVA, J. S.; HECK, M. C.; BUZO, M. G.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of textile laundry effluents and their cytotoxic effects on *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 27890–27898, 2018.

SMITH, E.; THAVAMANI, P.; RAMADASS, K.; NAIDU, R.; SRIVASTAVA, P.; MEGHARAJ, M. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques. **Integrated Journal of Biodeterioration Biodegradation**, v. 101, p. 56-65, 2015.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**. v. 111, n. 1, p.A3.B.1-A3. B.3, 2015.

SUMÁRIO

SYRITIUK, P. H. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. **Atividade Genotóxica de Doses Permitidas para o Consumo Humano dos Herbicidas Glifosato, Atrazina e 2,4-D em Diferentes Tecidos de Ratos Wistar**. 2022. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2022.

TATES, A. D. Validation studies with the micronucleus test for early spermatids of rats. A tool for detecting clastogenicity of chemicals in differentiating spermatogonia and spermatocytes. **Mutagenesis**, v. 7, n. 6, p. 411-419, 1992.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. J. P. S. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VIANA, L. Á.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. Mutagenicity and cytotoxicity of liquid waste, press water and pond water, produced in the cassava flour industry, and of antitoxic sodium thiosulfate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 453-458, 2014.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VIEIRA, C. A. M.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Investigação da Citotoxicidade das Águas do Córrego Carioca, Localizado no Município de Ourizona-PR, em *Allium cepa* L.** 2016. Monografia (Graduação) – Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

VOCCIANTE, M.; FINOCCHI, A.; DE FOLLY D' AURIS, A.; CONTE, A.; TONZIELLO, J.; POLA, A.; REVERBEN, A. P. Enhanced oil spill remediation by adsorption with interlinked multilayered graphene. **Materials**, v. 12, n. 14, p. 2231, 2019.

VOLPATO, L. M.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. 2020. **Avaliação do Potencial Citotóxico e Mutagênico das Águas Superficiais do Lago do Parque do Ingá, em Maringá-PR, em *Allium cepa* L.** PIBIC (Graduação) – Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020.

VOLPATO, L. M.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação Citotóxica e Mutagênica do Efluente com o Corante Azul de Metileno Tratado por Ozonização Fotocatalítica em Sistema-Teste *Allium cepa* L.** *In*: 28° Encontro Anual de Iniciação Científica e 8° Encontro Anual de Iniciação Científica Junior, 2019, Maringá. Anais do 28° Encontro Anual de Iniciação Científica e 8° Encontro Anual de Iniciação Científica Junior, 2019.

WEI, Z.; WANG, J. J.; MENG, Y.; LI, J.; GASTON, L. A.; FULTZ, L. M.; DELAUNE, R. D. Potential use of biochar and rhamnolipid biosurfactant for remediation of crude oil-contaminated coastal wetland soil: ecotoxicity assessment. **Chemosphere**, n. 253, p. 126617, 2020.

XU, Q.; WU, B.; CHAI, X. In situ remediation technology for heavy metal contaminated sediment: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 24, p. 16767, 2022.

YAMADA, A. Y.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação da Citotoxicidade das Águas do Córrego Mandacaru-PR em *Allium cepa* L.** 2017. Monografia (Graduação) – Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

YAUK, C. L.; AARDEMA, M. J.; VAN BENTHEM, J.; BISHOP, J. B.; DEARFIELD, K. L.; DEMARINI, D. M.; DUBROVA, Y. E.; HONMA, M.; LUPSKI, J. R.; MARCHETTI, F.; MEISTRICH, M. L.; PACCHIEROTTI, F.; STEWART, J.; WATERS, M. D.; DOUGLAS, G. R. Approaches for identifying germ cell mutagens: Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 783, p. 36-54, 2015.

ZANI, C.; DONATO, F.; CERETTI, E.; PEDRAZZANI, R.; ZERBINI, I.; GELATTI, U.; FERETTI, D. Genotoxic activity of particulate matter and in vivo tests in children exposed to air pollution. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5345, 2021.

ZAWIERUCHA, I.; MALINA, G.; HERMAN, B.; RYCHTER, P.; BICZAK, R.; PAWLOWSKA, B.; BANDURSKA, K.; BARCZYNSKA, R. Ecotoxicity and bioremediation potential assessment of soil from oil refinery station area. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 20, p. 337-346, 2022.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.

4.3

Anna Carla Ribeiro
Mariana Fernandes Rocha
Rosângela Bergamasco
Raquel Guttierres Gomes

PROSPECÇÃO DE MATERIAIS BIOADSORVENTES PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos possuem numerosas funções, sendo a produção de alimentos e o abastecimento de água potável à população as principais delas, portanto a água tem papel essencial para uma qualidade de vida e para o desenvolvimento socioeconômico, assim como a necessidade de definir uma gestão de qualidade satisfatória (Gomes *et al*., 2022).

A demanda de água mundial teve um aumento de 600% nos últimos 100 anos, e até 2050 espera-se um acréscimo de 20 a 30%. Devido a este fator juntamente com o elevado índice de contaminação dos mananciais, se fazem imprescindíveis tecnologias de tratamento cada vez mais avançadas para atender a população, tornando assim a universalização do saneamento cada vez mais distante (Boretti; Rosa, 2019).

Inúmeras substâncias com possíveis efeitos tóxicos ao ambiente e aos seres humanos têm sido identificados em estações de tratamento de água (ETA), mesmo em concentrações extremamente baixas, da ordem de ng L^{-1} a µg L^{-1}. Estes contaminantes abrangem diversas classes e são derivados das mais variadas atividades urbanas, manufatureiras e agrícolas, podendo também ser de ocorrência natural (Naidu *et al*., 2016). Alguns exemplos são fármacos de uso humano e veterinário, hormônios, produtos cosméticos e de higiene pessoal, retardantes de chama, produtos de desinfecção, aditivos da gasolina, organometálicos, surfactantes, biocidas e pesticidas (Gautam *et al.,* 2023).

Múltiplos fatores, como crescimento da população mundial, ampliação do acesso a compostos fármacos e desenvolvimento de novas formulações, assim como o aumento da dependência e das doses utilizadas destes insumos, fazem com que o consumo atual de fármacos, seja crescente em todo o mundo (Tiwari *et al*., 2017).

Esses fatores se tornam um agravante já que uma quantidade considerável de países não possui um tratamento adequado de coleta e tratamento de esgoto, como é o caso do Brasil (Silva, 2019), sendo essa a principal rota de entrada destes compostos em águas superficiais (Singh; Suthar, 2021).

Considerando a resistência dos fármacos aos processos de tratamentos convencionais (Nguyen *et al*., 2020), uma variedade de métodos, como irradiação ultrassônica, degradação eletroquímica, extração de fase, fotodegradação e ozonização ou processos oxidativos avançados (Sacco *et al.,* 2020; Silvestri *et al.,* 2020), foram desenvolvidos e aplicados para capturar/degradar contaminantes orgânicos da água. No entanto, devido aos elevados custos, estes processos não são incorporados na rotina da maioria das estações de tratamento de efluentes, consequentemente, os resíduos dessas moléculas orgânicas nocivas podem ser encontrados em água potável (Bhadra; Jhung, 2017).

O desenvolvimento de técnicas alternativas, com capacidade de remoção em baixas concentrações, custo reduzido e que possuam facilidade na implementação, é crucial como é o caso da adsorção (Schmitz *et al.,* 2021). Essa técnica tem se destacado com o melhor custo/benefício, menor custo total de implantação e operação, maior facilidade de aplicação, possibilidade de regeneração do adsorvente, elevada eficiência de remoção para diferentes contaminantes e que não produz subprodutos tóxicos que podem ser liberados junto a água ou efluente tratado (Bonilla; Mendonza; Reynel, 2017; Rathi; Kuman; Vo, 2021).

Na busca por diminuir o custo do processo adsortivo, diferentes adsorventes alternativos, como é o caso dos resíduos agrícolas, vêm sendo desenvolvidos e avaliados quanto a sua capacidade de remoção, amplitude de fármacos, estabilidade, acessibilidade, resistência e custo-benefício no processo de remoção (Pimentel *et al*., 2022; Bankole; Oluyori; Inynbor, 2023). Dessa maneira, a área de

desenvolvimento de materiais adsorventes possui grande potencial em auxiliar na universalização do saneamento básico, proporcionando novos recursos para uma análise mais ampla e eficaz.

2. ÁGUA

Apesar de ser o elemento mais importante para manutenção da vida na terra, a água viável para consumo corresponde somente a 2,5% de toda água presente, tendo em vista que apenas 0,3% desses são ideais para o consumo humano, produção de alimentos, geração de energia, dentre outros fins, considerando que a maior concentração (2,2%) se encontra indisponível em geleiras e calotas polares (Van Vliet *et al.,* 2021). Cerca de 4 bilhões de pessoas enfrentam escassez de água pelo menos uma vez ao ano, gerando uma grande preocupação social (Tzanakakis; Paranychianakis; Angelakis, 2020).

Mesmo apresentando uma porcentagem significativa em território brasileiro (12%), este recurso é distribuído geograficamente de maneira desigual no país e vem sofrendo degradação gradativa por meio da ação antrópica, impulsionada pelo crescimento populacional e consequente maior demanda na produção de alimentos, destacando-se a poluição doméstica, emissão direta e indireta de esgotos, poluição industrial e escoamento do solo por meio de atividades agrícolas (Montoya; Finamore, 2021).

O controle da qualidade da água é obrigatório por meio de regulamentos técnicos e legislações para garantir a saúde da população (Salgot; Folch, 2018), porém a implantação e operação de sistemas de tratamento sozinhos não são eficientes para assegurar a qualidade da água distribuída à população, sendo crucial estabelecer ações de controle e vigilância e medidas estruturais, como as normas de potabilidade, com os requisitos de segurança e de qualidade da água ofertada (Linden; Hull; Speight, 2019; Tsaridou; Karabelas, 2021).

Apesar do conceito de potabilidade ser considerado global, as legislações e os padrões de potabilidade variam em função de parâmetros ambientais, sociais, culturais, econômicos e tecnológicos nos mais diversos países, refletindo a viabilidade de aplicação. Conforme a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) N° 430 de 2011 (Brasil, 2011) e da Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021, do Ministério da Saúde (Brasil, 2021), os parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade da água nas análises laboratoriais são o oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio, fósforo, clorofila, coliformes totais, coliformes termotolerantes e a *Escherichia coli*.

2.1 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DO MEIO AQUÁTICO

O crescimento da atividade agropecuária aliado a contaminação da água por fertilizantes e outros produtos químicos e a perda de sedimentos por meio do escoamento superficial, tem gerado severas consequências para o ambiente e para a saúde humana. Essa contaminação possui a capacidade de afetar a qualidade das águas no local de origem e também em outros pontos de interferência dos recursos hídricos (Okumura *et al*., 2020).

Principais responsáveis pelo despejo de resíduos químicos nos rios e solo, as indústrias de mineração, fundição, tecidos, petroquímicas, microeletrônica, fertilizantes, pesticidas, tintas, além dos incineradores de lixo urbano e industrial, geram impactos frequentemente irreversíveis na saúde das populações residentes na região, sendo o arsênio, cádmio, enxofre, benzeno, chumbo, cobre, mercúrio e zinco alguns dos metais pesados mais atribuídos a essas atividades (Xiong; Wu; Li, 2021). Grandes impactos eutróficos foram causados na flora, fauna e nos seres humanos, oriundos do crescimento das atividades industriais juntamente com o depósito de esgotos não tratados (Akinnawo, 2023).

O descarte de esgotos domésticos ou industriais, tratados ou não, podem ser classificados como fontes pontuais de poluição, ou seja, podem ser identificados, podendo estabelecer ações repressivas, disciplinadoras e até penais (Riyadi *et al.,* 2020; Oliveira *et al.,* 2023). Diferente das fontes pontuais, as fontes difusas de poluição não possuem sua origem prontamente identificadas (Lintern *et al.,* 2020). Em regra, a poluição difusa emerge a partir de repetidas operações sobre grandes áreas, podendo ser intensificada em razão da irrigação, da compactação e ausência de práticas conservacionistas do solo, do desflorestamento, dos processos erosivos, além da interferência de fatores naturais, uma vez que o principal meio pelo qual os poluentes atingem corpos de água, de maneira difusa, é através do escoamento superficial e subterrâneo (Pericherla; Vara, 2023).

Como resultado dos impactos ambientais negativos derivados das emissões antropogênicas de contaminantes, os componentes em concentrações traços (ng L^{-1} ou µg L^{-1}) têm sido encontrados no meio ambiente e na água potável, denominados microcontaminantes (Sousa *et al.,* 2018), levantando questões sobre saúde pública e impactos no meio (Veras *et al.,* 2019). Esses compostos só puderam ser detectados e quantificados devido ao aperfeiçoamento das técnicas analíticas de separação e detecção como a cromatografia e a espectrometria de massas (Cheng *et al.,* 2020). Alguns exemplos de microcontaminantes incluem cianotoxinas, micotoxinas, aditivos de gasolina e industriais, hormônios esteroides, surfactantes, nanomateriais, subprodutos de desinfecção e, principalmente, os desreguladores endócrinos e fármacos. Os microcontaminantes possuem pequena biodegradabilidade no meio, aumentando a prevalência e o impacto sobre organismos aquáticos gerados por esses contaminantes (Patel *et al.,* 2020).

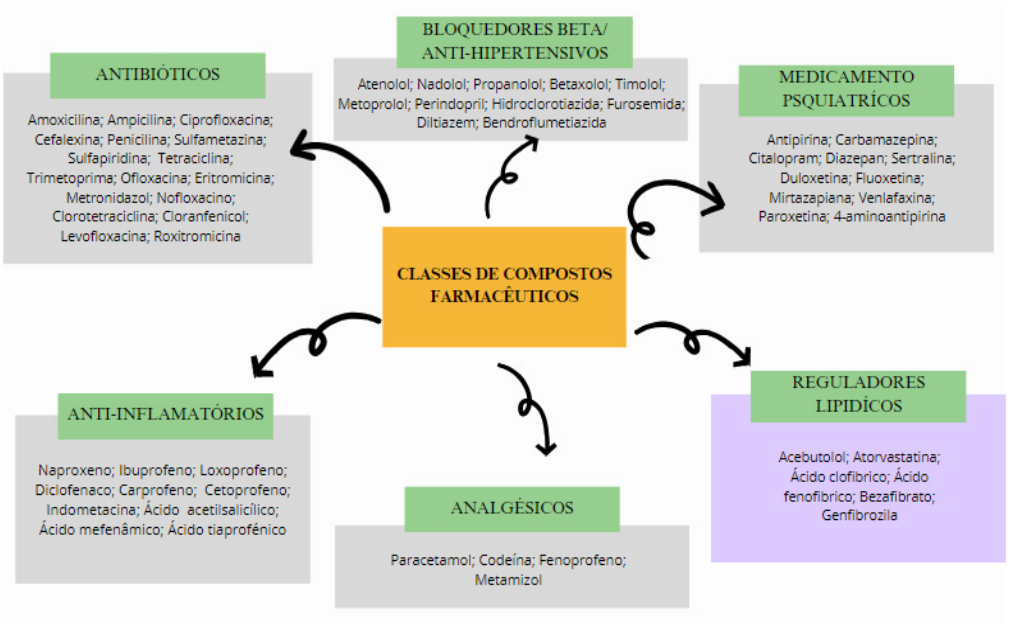
Lesões celulares, desregulação endócrina, infertilidade, alteração comportamental, resistência aos antibióticos e alteração da pressão arterial são alguns dos efeitos adversos na saúde humana, gerados pela exposição crônica a baixas concentrações

de determinadas classes de fármacos existentes no meio ambiente. Dentre esses contaminantes estão presentes os antineoplásicos, hormônios, antidepressivos, antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, antipiréticos e reguladores lipídicos, o que torna cada vez mais relevante o estudo da ocorrência e frequência desses compostos no meio ambiente, assim como a avaliação e determinação do risco de exposição à saúde humana (Saidulu *et al.,* 2021; Yadav *et al.,* 2021; Babuji *et al.,* 2023).

2.2 OCORRÊNCIA E EFEITO DOS FÁRMACOS E METABÓLITOS

Devido aos múltiplos benefícios que oferecem no tratamento das mais diversas doenças, os compostos farmacêuticos se tornaram indispensáveis para a sociedade no mundo todo. No entanto, em razão do aumento da produção, da ampliação do acesso, ao desenvolvimento de novas formulações e pelo aumento das doses utilizadas, e da dependência da população, a contaminação dos ecossistemas aquáticos pelos resíduos farmacêuticos acentuou-se nos últimos anos (Leal; Alencar, 2020). Só no ano de 2020 foram consumidas 4,5 trilhões de doses de fármacos no mundo. Dentre as principais classes de medicamentos (Figura 1), os mais consumidos são analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Esse aumento ocorre porque na maioria dos países os anti-inflamatórios não esteroides não precisam de prescrições médicas para serem adquiridos em drogarias, permitindo a automedicação, além de constituírem a classe de medicamentos mais prescrita (Escher *et al.,* 2019; Barros *et al.,* 2020).

Figura 1. Principais classes de fármacos detectados em ambiente aquático



Dependendo da via de administração, forma e propriedade físico-química do fármaco, o mesmo pode ser absorvido pelo organismo em diferentes locais. Dessa maneira, partes do composto são excretados para as águas de origem doméstica na forma de metabólitos ou ainda, sem ser metabolizados por completo, podendo ser transportado até as águas superficiais ou ainda para os sistemas de tratamento de águas residuais (ETAR´s) (Irandost *et al*., 2019; Ibáñez *et al*., 2021). Não obstante, existem outras vias de liberação desses compostos para o ambiente, como a emissão de resíduos durante a fabricação e pelo descarte de embalagens e fármacos juntamente com o lixo doméstico, e que representa uma ameaça para as águas subterrâneas ao ser depositado em aterros sanitários (Reyes *et al*., 2021). Ademais, esses resíduos e metabólitos gerados podem ser apenas parcialmente degradados, levando a formação de produtos de transformação, que quando hidrolisados são convertidos novamente no fármaco original, tornando-se ainda mais nocivos (Jaén-Gil *et al*., 2020).

Considerando que os fármacos são formados por numerosas substâncias ativas e aditivos, e que os mesmos podem apresentar diferentes combinações complexas no ambiente, ocorre a potencialização dos efeitos sinérgicos e combinados nos organismos. No trabalho de Wei, Tang e Xu (2023) foi determinado o grau de dissociação de grupos ácidos do poluente no meio (constante de acidez - K_a), a medida da lipofilicidade (coeficiente de partição octanol/água - K_{ow}), a capacidade dos microrganismos em degradar os contaminantes (constante de biodegradação - K_{bio}), e a estimativa da adsorção do poluente em fase sólida (coeficiente de distribuição sólido-líquido - K_d), sendo as mesmas algumas das principais características físico-químicas de um composto farmacêutico (Jafari *et al.,* 2020).

Além das características físico-químicas, esses compostos detêm outras propriedades específicas, tal como alta estabilidade química, baixa biodegradabilidade, alta solubilidade em água e baixo coeficiente de adsorção (Natarajan *et al.,* 2022). Um grupo de compostos em especial, os disruptores endócrinos, é responsável por desregular o funcionamento adequado do sistema endócrino dos seres vivos, perturbando a saúde, crescimento e reprodução dos mesmos (Akashi; Regman; Hashmi, 2021). Esse grupo pode ser categorizado entre os hormônios naturais, como é o caso do 17β-estradiol, estrona e estriol, e entre os hormônios sintéticos, como 17α-etinilestradiol, que faz parte da composição da pílula anticoncepcional (Ismail; Wee; Aris, 2017). Anomalias no sistema reprodutivo de animais, comprometimento da função reprodutiva através da indução da síntese de vitelogenina no plasma dos peixes, e efeitos na saúde humana como a redução na produção de esperma e aumento da incidência de câncer, são algumas das inúmeras implicações já relatadas que podem ser causadas em consequência desses compostos (Bhandari *et al.,* 2015; Hu *et al.,* 2018; Shafei *et al.,* 2018).

Os antibióticos formam outra classe que merece alerta devido aos efeitos prejudiciais que podem provocar nos organismos vivos. A crescente preocupação com os antibióticos ocorre em virtude da

sua ampla utilização na medicina, sendo frequentemente associados ao desenvolvimento de bactérias resistentes (Zhang *et al.,* 2020). Uma variedade de estudos demonstrou associação entre a presença de antibióticos nos efluentes tratados das ETAR's e o subsequente desenvolvimento de bactérias resistentes nos reservatórios e lagos de água potável (Blaak *et al.,* 2015; Araújo *et al.,* 2020; Li *et al.,* 2020). Neste contexto, é evidente a necessidade de ampliação dos estudos abordando a ocorrência, os efeitos nocivos e o aperfeiçoamento dos sistemas de tratamento de fármacos no ambiente.

3. REMOÇÃO POR ADSORÇÃO

O desenvolvimento de técnicas alternativas eficientes e pouco dispendiosas para a remoção de fármacos e outros micro-contaminantes das águas é extremamente favorável tendo em vista a crescente preocupação ambiental. Uma dessas principais técnicas tecnológicas e eficazes na remoção de vários tipos de contaminantes é a adsorção (Viotti *et al*., 2019; Dehghani *et al*., 2024).

Segundo Rathi e Kumar (2021) a adsorção pode ser definida como um processo físico-químico no qual o contato entre um sólido e um líquido acontece, onde em razão do gradiente de concentração entre a solução e a superfície do adsorvente, uma transferência de massa ocorre devido a difusão da fase líquida para a superfície do sólido. Em conformidade, a técnica de adsorção sólido-líquido concentra prioritariamente os contaminantes que se encontram na superfície de materiais sólidos, assim, a porção que mantém o contaminante na sua superfície é nomeada adsorvente e a substância adsorvida é denominada adsorvato (Nayak; Bhushan; Kotnala, 2024). Nesse processo, o contaminante pode se propagar por meio dos microporos presentes no adsorvente e, assim, ser adsorvido pelos sítios ativos ou somente ser adsorvido à sua superfície (Howe *et al.,* 2016; Atkins; Paula, 2017).

A elevada eficiência de remoção de contaminantes, simplicidade de aplicação, flexibilidade, baixo custo e consumo de energia, possibilidade de regeneração do adsorvente, não-geração de subprodutos tóxicos, baixa sensibilidade a substâncias nocivas e elevado custo-benefício, são algumas das vantagens da adsorção frente a outras tecnologias de tratamento avançado de água e de efluentes (Bonilla; Mendoza; Reynel, 2017). Para que a adsorção seja viabilizada como um processo tecnológico no tratamento de água, diversos fatores devem ser considerados durante sua aplicação, tais como o tipo de adsorvente, de contaminante, as características do solvente e os parâmetros do processo (Rathi; Kuman; Vo, 2021).

A solubilidade, polaridade e estrutura molecular são algumas das propriedades químicas que ditam o tipo de interação que ocorre entre o adsorvente e o adsorvato (Lanin *et al.*, 2020; Cortés; Ortega; Miranda, 2023). Dessa forma, fatores como acessibilidade do material, periculosidade, carbono e teor de oxigênio, resistência à abrasão, estabilidade térmica, diâmetro dos poros e a alta capacidade de adsorção e regeneração, alta seletividade, cinética favorável entre adsorvente e adsorvato, baixa ou nenhuma solubilidade, dureza e força mecânica e baixo custo, devem ser levados em consideração durante o processo de seleção dos materiais (Quesada *et al*., 2019a).

À vista disso, a aplicação de produtos naturais, denominados bioadsorventes, com intuito de promover a remoção de contaminantes, torna-se uma maneira propícia e positiva de lucrar com os resíduos provindos de atividades industriais e agrícolas, graças a sustentabilidade, acessibilidade, baixo custo e abundância dos bioadsorventes nos mais diversos países.

3.1 BIOADSORVENTES

A biossorção é um processo que envolve a remoção de contaminantes do meio aquoso por meio da utilização de matrizes biológicas, que podem incluir microrganismos vivos ou material biológico não vivo (Adewuyi, 2020).

Pesquisas sobre o potencial de bioacumulação de poluentes, especialmente de metais pesados, por microrganismos (bactérias, fungos e algas), têm sido exploradas desde o século XVIII (Nnaji *et al.*, 2023). Entretanto, a investigação sobre o potencial tecnológico da utilização de biomassa não viva no tratamento de efluentes também tem despertado o interesse da comunidade científica desde o último século, visto sua maior aplicabilidade em larga escala. Quando comparado com a utilização de microrganismos, que requerem um maior rigor dos parâmetros operacionais para manutenção das condições ótimas de funcionamento (pH, temperatura, concentração inicial do poluente e fontes nutricionais), a utilização de biomassa não viva apresenta vantagens por ser consideravelmente menos sensível às variações das condições do meio, não requer condições assépticas para operação, apresentar um tempo de reação relativamente rápido (minutos ou horas) e por ter possibilidade de recuperação dos contaminantes (Jatoi *et al.*, 2023).

As primeiras pesquisas com materiais de natureza orgânica em processos adsortivos envolveram a utilização de carvão à base de milho para a remoção de metais pesados da água, pelos pesquisadores Pichler e Wobler (Bhargava; Srivastava, 2017). Desde então, muitos estudos têm sido desenvolvidos utilizando os mais diferentes tipos de materiais, visando descrever os mecanismos de equilíbrio e cinética envolvidos nos processos adsortivos utilizando bioadsorventes (Benjelloun *et al.*, 2021).

Considerando a diversidade de resíduos sólidos e subprodutos gerados pelo setor industrial e agrícola, é bastante atrativo que esses biomateriais sejam investigados acerca de sua eficiência como bioadsorventes (Tamjidi *et al.*, 2024). Essa é uma abordagem que contribui tanto para a valorização de resíduos, que dentro de uma cadeia produtiva linear seriam destinados para aterros sanitários, quanto para a problemática do tratamento de águas e efluentes com materiais mais sustentáveis e menos tóxicos (Bhat, 2021).

O aumento da população mundial tem levado ao aumento global da demanda e consumo de alimentos. No setor alimentar, as frutas, legumes e verduras devem atender a um padrão de qualidade para estarem aptas à comercialização. Nesse sentido, as mercadorias classificadas como 'não conformes' tornam-se resíduos desse processo seletivo e representam mais de 42% do desperdício total de alimentos (Ganesh; Sridhar; Vishali, 2022).

Os resíduos agrícolas e florestais são ricos em lignina, celulose e hemicelulose, e apresentam diversos grupos funcionais em sua superfície como hidroxila, carbonila, amina e carboxila, que propiciam excelentes capacidades adsortivas de moléculas poluentes de natureza orgânica ou inorgânica presentes no meio aquoso (Yaashikaa *et al.,* 2021).

Nesses casos, a adsorção de moléculas poluentes é fortemente influenciada tanto pelas características intrínsecas do bioadsorvente como sua composição e estrutura, como também, pelas propriedades do adsorvato como peso molecular e força iônica. Influem também, os parâmetros operacionais do processo como temperatura, pH, concentração do bioadsorvente e do adsorvato, tempo de contato, força iônica e a presença de outros contaminantes em simultâneo. Portanto, o estudo profundo desses fatores e sua manipulação para a otimização do processo adsortivo é um desafio bastante relevante para tornar a utilização de bioadsorventes amplamente difundida (Okoro *et al.,* 2022).

A escolha do bioadsorvente deve levar em consideração a sua disponibilidade e abundância na região onde será utilizado, facilitando a logística de reposição e transporte. Além disso, geralmente o material *in natura* pode precisar de algum tipo de preparo prévio para otimização de sua capacidade adsortiva (Osmar *et al*., 2022). Os pré-tratamentos aplicados podem ser de natureza física ou química de acordo com os objetivos desejados, como aumento da porosidade ou ativação/eliminação de grupos químicos superficiais.

A funcionalização dos bioadsorventes com nanopartículas, como nanopartículas magnéticas, também têm sido amplamente investigadas para otimizar sua eficiência adsortiva e facilitar o processo de separação sólido-líquido (Magalhães-Ghiotto *et al*., 2021).

A seguir serão abordados exemplos de resíduos de natureza orgânica provenientes de processos agroindustriais que têm sido explorados como bioadsorventes de micropoluentes da água como pesticidas, fármacos e corantes.

4. TIPOS DE RESÍDUOS

4.1 RESÍDUO DE SOJA

A soja (*Glycine max*) faz parte da dieta alimentar de sociedades orientais ancestrais e seu preparo pode incluir práticas fermentativas ou não (Sedibe; Mofokeng; Masvodza, 2023). Ao longo da história descobriu-se os diferentes usos que este grão pode ter para a indústria, o que o transformou em uma *commodity* altamente rentável (Prodohl, 2013) e um dos grãos mais cultivados do mundo. Atualmente, os maiores produtores mundiais de soja são os Brasil, Estados Unidos e Argentina (Karp *et al.,* 2022).

As sementes de soja são ricas em carboidratos, proteínas e lipídios e, a partir delas, diferentes produtos de valor agregado podem ser derivados. Suas operações de processamento envolvem a extração de óleo, cuja maior parte é destinada ao refino para consumo comestível e o restante é usada para produção de sabão e biodiesel. A fração sólida obtida após a extração do óleo é o farelo de soja desengordurado, que apresenta alto teor de proteínas. Cerca de 98% do farelo é destinado à alimentação animal e o restante é utilizado para a produção do concentrado de proteína de soja (CPS)

e do isolado de proteína de soja (IPS). Portanto, a cadeia produtiva da soja é bastante complexa, do ponto de vista de processos unitários, pois vários tipos de produtos e subprodutos são produzidos, o que consequentemente, gera um grande volume de resíduos (Pretto *et al.,* 2018).

Após a colheita da soja e independente do produto final desejado, a primeira operação envolvida no processo é a retirada da casca da semente. Isso acontece, pois, a casca reduz a eficácia de extração do óleo e também apresenta uma quantidade elevada de carboidratos (86%), o que não é nutricionalmente atraente para a indústria de rações animais porque diminui o teor proteico (Toomer *et al.*, 2023). Visto que somente a casca representa cerca de 5-8 % do peso seco da semente de soja, pode-se notar que o volume de resíduos produzidos, apenas nessa etapa, é bastante significativo. Considerando que a produção anual do resíduo de casca de soja em todo o mundo foi estimada em torno de 18 a 28.7 milhões de toneladas métricas em 2020/2021, o gerenciamento deste material apresenta um enorme impacto ambiental e econômico (Bittencourt *et al.,* 2021).

Nesse sentido, diversos autores têm investigado o potencial da utilização da casa de soja *in natura* ou modificada como bioadsorvente de micropoluentes da água. Januário *et al.* (2023) investigaram um adsorvente à base de casca de soja preta *in natura* para remoção de cloroquina e obtiveram uma capacidade máxima adsortiva de 74,56 mg g^{-1} a 288 K. Neste estudo ainda avaliaram o desempenho do bioadsorvente em uma mistura sintética contendo outros dois contaminantes como laranja safranina (LS), triclosan (TRI) e cloroquina (CQN), com desempenho bastante satisfatório: 90,81% para LS, 66,79% para TRI e 70,62% de remoção para CQN. Já, a casca da soja *in natura* apresentou capacidade adsortiva bastante significativa para corantes catiônicos a 318 K, nomeadamente safranina e vermelho neutro, representando 221.74 mg g^{-1} e 287.30 mg g^{-1} respectivamente (Vidovix *et al.,* 2022a).

Visando melhorar o processo de separação do adsorvente/adsorvato ao final do processo adsortivo, a funcionalização do resíduo da casca de soja com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foi estudada para remoção de cloroquina (CQN) (Vidovix *et al.,* 2022b) e tricosan (TRI) (Vidovix *et al.,* 2022c). O bioadsorvente apresentou desempenho adsortivo de 98,84 mg g^{-1} (CQN) e 158,35 mg g^{-1} (TRI) a temperatura de 318 K. Já, a remoção de diclofenaco da água utilizando um bioadsorvente da casca de soja submetido a modificação química (ácido fosfórico) e térmica, demonstrou capacidade adsortiva de 96 mg g^{-1} a temperatura de 308 K (Souza *et al.,* 2021).

O processamento do leite de soja gera um subproduto chamado okara, cuja maior parte não é aproveitável em outros processos. Além disso, esse material é altamente deteriorante e perecível devido à sua elevada umidade e teor proteico. Estima-se que a cada 1.000 L de leite de soja produzidos são gerados 250 kg de okara, que normalmente é destinada à queima, descarte incorretamente ou uma pequena parte é adicionada na alimentação animal (Nguyen *et al.,* 2014). Por isso, tem-se investigado aplicações alternativas para sua utilização em novos processos, o que foi objato da pesquisa de Natal *et al.* (2023), que utilizaram a Okara *in natura* como um bioadsorvente e obtiveram resultados bastante satisfatórios na adsorção de corantes da água, no caso a safranina (184,60 mg g^{-1}) e azul de metileno (93,20 mg g^{-1}).

A contaminação das águas por cianobactérias e seus metabólitos secundários é também uma preocupação acerca da qualidade da água (Rocha *et al.,* 2024). Nesse âmbito, Magalhães-Ghiotto *et al.* (2023) obtiveram resultados relevantes para a remoção de *Microcystis aeruginosa* por um bioadsorvente à base de okara *in natura* e okara modificada por hidrólise e funcionalizada com nanopartículas de óxido de ferro. A modificação proposta no bioadsorvente apresentou 47% de remoção das células de cianobactérias da água 804,17 cel g^{-1}.

4.2 RESÍDUO DA MORINGA

A *Moringa oleifera* (MO) é uma das 13 espécies da família Moringaceae, nativa da região norte da Índia e Paquistão (Mashamaite *et al.,* 2021). A qualidade nutricional de suas folhas e sementes tem sido amplamente investigada, e se apresenta como uma plataforma de desenvolvimento para projetos contra a desnutrição em diversas regiões do mundo (Saa *et al.,* 2019). A MO é uma espécie que se adapta facilmente a ambientes tropicais e subtropicais e tem sido cultivada em diferentes partes do mundo como América do Norte e do Sul, África, Oriente Médio e ilhas do pacífico (Dzuvor *et al.,* 2022).

O aproveitamento de todas as partes da planta faz da MO uma planta de elevado valor econômico com potencial para diferentes aplicações, como produção de biomassa, forragem para gados, coagulante para tratamento de águas, fertilizante para plantas, medicamentos e também, está presente na indústria alimentícia (Nouman *et al.,* 2013; Gandij *et al.,* 2018).

O pó da folha da MO apresenta um valor comercial bastante atrativo para a indústria devido a sua composição rica em compostos bioativos, vitaminas, proteínas e minerais (Oliveira *et al*., 2021; Trigo *et al*., 2021). Da semente da MO é extraído o óleo, e a fração sólida pode ser utilizada como coagulante no tratamento de água. Já, a casca da semente e a vagem são consideradas como um resíduo (Lester-Card *et al*., 2023).

A utilização da MO no tratamento de água já é bastante explorada. Por exemplo, a aplicação do seu extrato e suas frações proteicas para o tratamento microbiológico da água, como na remoção da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, tem efeito bacteriostático em 18 minutos e efeito bactericida em 48 minutos após a aplicação (Silveira *et al*., 2020).

Baptista *et al.* (2017) reportaram a utilização de coagulantes a base das frações proteicas da semente de MO. A albumina e globulina da semente demonstraram alta eficiência no tratamento da água de baixa turbidez (50 NTU). A funcionalização da semente de MO com nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foi explorada tanto para o tratamento de água por meio de coagulação e floculação, quanto para remoção da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Oliveira *et al.,* 2021).

Devido à ampla utilização da MO e ao volume gerado de resíduo de casca da sua semente, foi necessário investigar formas sustentáveis para seu gerenciamento (Okaya *et al.*, 2020; Pfeil *et al.,* 2021). Yamaguchi *et al.* (2021) apresentaram em uma revisão, as tendências e desafios futuros quanto a aplicação das sementes de MO no tratamento de água.

A remoção de fármacos por bioadsorventes à base de MO têm sido investigadas por diversos autores. Quesada *et al.* (2019b) propuseram modificações químicas e térmicas nas cacas de semente de MO para síntese de um bioadsorvente para a remoção do fármaco acetaminofeno da água. A capacidade máxima adsortiva alcançada foi de 17,48 mg g^{-1} na temperatura de 318 K. Já, na funcionalização das cascas de semente de MO com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, a capacidade adsortiva foi de 65,01 mg g^{-1} para a remoção do medicamento metformina de solução aquosa (Cusioli *et al.,* 2020).

Araújo *et al.* (2018) submeteram as cascas de semente de MO a tratamento químico com ácido nítrico (4%) e tratamento térmico na mufla a 300 ºC por 1 hora, para síntese de um bioadsorvente que exibiu 28,73 mg g^{-1} de capacidade adsortiva de diclofenaco em pH 5.

Além da modificação química e térmica, Cusioli *et al.* (2021a) também realizaram sua funcionalização com nanopartículas de óxido de ferro para remoção de triclosan e atrazina (Cusioli *et al.,* 2021b). A capacidade máxima adsortiva foi de 103,45 mg g^{-1} e 10,32 mg g^{-1} a 293 K para triclosan e atrazina, respectivamente.

4.3 RESÍDUO DE FRUTAS

As cadeias de abastecimento de alimentos no mundo têm focado em suprir a demanda crescente de seus produtos, visto o aumento da população mundial. No entanto, a geração de resíduos em diversos níveis, desde as condições inadequadas de armazenamento ao desperdício alimentar gerado pelas famílias e estabelecimentos comerciais, tem despertado enorme preocupação (Ganesh; Sridhar; Vishali, 2022). Dados de 2021 mostram que foram gerados 1.3 milhões de toneladas de resíduos alimentares, sendo este valor equivalente a um terço da produção mundial de alimentos (Adamu *et al.,* 2023).

Ao longo da cadeia produtiva, existem diversos processos que apresentam geração de resíduos de frutas e legumes, que vão desde a pós-colheita, produção, empacotamento, venda à varejo até o consumo propriamente dito. Essa biomassa residual que inclui sementes, cascas, caules, folhas, palhas e raízes, é rica em compostos fitoquímicos de elevado valor, como agentes antioxidantes, conservantes e aromatizantes naturais, porém ao invés do reaproveitamento desses resíduos, os mesmos são destinados à aterros sanitários e à produção primária de metano (Salim; Singh; Raghavan, 2017).

Visto os custos envolvidos no gerenciamento desses resíduos e seu potencial poluidor para o meio ambiente (Mekouar, 2017), abordagens que abram novas perspectivas de utilização dessa biomassa são extremamente válidas a partir do ponto de vista da economia circular (Hossain *et al.,* 2020). O potencial de diversas frutas como bioadsorventes para o tratamento de águas e efluentes contaminados tem sido amplamente investigado (Ali; Assim, Khan, 2012; Solangi, *et al*., 2021; Chong; Soh; Yong, 2023).

Portanto, investigações que visem contribuir com o aprofundamento do conhecimento acerca da síntese, caracterização e aplicações desses resíduos orgânicos em adsorção de micropoluentes,

como fármacos, pesticidas e metais pesados, é essencial para avanços efetivos na área (Akpomie; Conradie, 2020; Solangi *et al*., 2021). A Figura 2 apresenta alguns tipos de resíduos utilizados como bioadsorventes discutidos em seguida.

Em 2021, a produção mundial de pêssego (*Prunus persica*) atingiu 21 milhões de toneladas métricas, sendo a terceira fruta mais produzida mundialmente (Şahin; Bilgin, 2022). A partir da fruta, muitos produtos e subprodutos são derivados e comercializados no mercado como sucos, geleias e frutas cristalizadas e/ou enlatadas e assim, enormes quantidades de resíduos são geradas (Manhongo *et al.,* 2022). Nesse sentido, Januário *et al.* (2022a) reportaram o aproveitamento do caroço de pêssego para produção de um bioadsorvente para remoção de cafeína da água. O hidrochar à base de caroço de pêssego apresentou bom desempenho e capacidade adsortiva 68,39 mg g^{-1} em de 298 K.

Figura 2. Resíduos agroindustriais com potencial para utilização como bioadsorventes

Fonte: autores.

Outra fruta que apresenta elevado consumo e produção é a manga (*Mangifera indica*), e o volume de resíduos gerados a partir da sua comercialização também tem chamado atenção dos pesquisadores. É estimado que cerca de 1 milhão de toneladas de caroço de manga são descartados por não apresentarem potencial econômico para as indústrias (Torres-Léon *et al.,* 2016). Ribeiro *et al.* (2024) utilizaram resíduos de caroço de manga funcionalizado com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para remoção de cloroquina (49,42 mg g^{-1}) e sertralina (64,79 mg g^{-1}) em solução aquosa. Foi avaliado também o comportamento do bioadsorvente em uma mistura sintética contendo outros contaminantes, além de sertralina e cloroquina, como o triclosan e laranja safranina. O bioadsorvente proposto apresentou uma eficiência global de remoção de 86% dos contaminantes da água.

A produção mundial de bananas, em 2021, foi de 119.83 milhões de toneladas métricas (Adamu *et al*., 2023). Diversos pesquisadores têm investigado a utilização de seus resíduos no tratamento de água, como remoção de corantes e metais pesados (Stawiński; Wal, 2021). Por exemplo, um bioadsorvente à base de casca de banana modificada quimicamente apresentou remoção de manganês (II) (Ali *et al.,* 2017) e de cromo (VI) (Ali *et al.,* 2016). Relativamente à remoção de fármacos da água, a casca de banana funcionalizada com nanopartículas de óxido de ferro para remoção de sertralina da água foi explorada por Vidovix *et al*. (2023) e apresentou capacidade adsortiva de 142,85 mg g^{-1}.

A pele de *Citrus reticulata* foi utilizada para remoção de laranja safranina de solução aquosa (Januário *et al.,* 2022b). Além da elevada capacidade de adsorção apresentada (464 mg g^{-1}) também se avaliou a reutilização do bioadsorvente, que manteve desempenho de 50 % até o quarto ciclo de reuso.

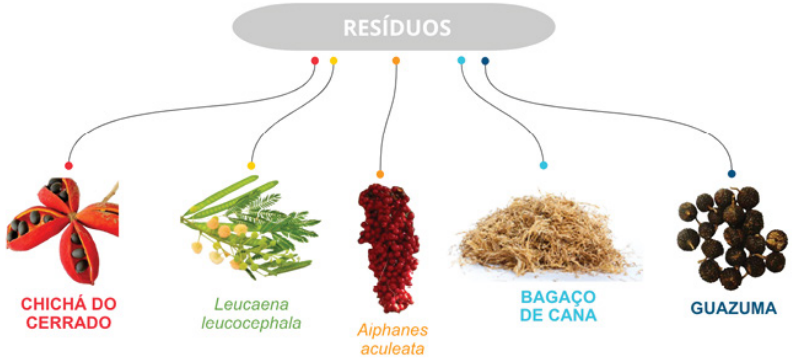
O açaí é uma fruta tropical produzida no Brasil. Apenas 20% de seu peso corresponde à polpa que, mediante a diversos processamentos, dá origem a outros subprodutos de valor comercial

(Ramirez *et al.,* 2022). Vidovix *et al.* (2022c) utilizaram a casca de açaí impregnada com nanopartículas de óxido de ferro como bioadsorvente para remoção de triclosan da água, e os resultados se mostraram bastante promissores (158,35 mg g^{-1}).

4.4 RESÍDUOS DE OUTRAS ESPÉCIES DE PLANTAS

Resíduos de diversas espécies de plantas podem ser utilizados como matéria-prima para síntese de bioadsorventes para o tratamento de água contaminada. As espécies com valor econômico agregado são geralmente cultivadas em larga escala e destinadas para fins alimentares humano e animal. Os processos envolvidos na industrialização e comercialização de seus subprodutos levam à geração de resíduos orgânicos. A Figura 3 mostra algumas espécies que abordaremos em seguida.

Figura 3. Resíduos com potencial para utilização como bioadsorvente



Fonte: autores.

A Leucena (*Leucaena leucocephala)* é uma espécie de leguminosa que pertence à família Fabaceae e pode ser encontrada em regiões tropicais (Santos; Jerônimo; Miranda, 2021). Devido ao alto valor nutricional sua produção tem sido direcionada principalmente

para alimentação animal, porém sua utilização também tem sido investigada para fins terapêuticos como agentes anticâncer e antidiabéticos (Wardatun *et al.,* 2020). Assim, considerando a geração de resíduos durante sua cadeia de valor, alguns autores têm explorado sua utilização como bioadsorventes para o tratamento de água. Cusioli *et al.* (2023) aplicaram os resíduos da poda da planta submetidos a tratamento químico e tratamento térmico na remoção de metformina 56,18 mg g^{-1} a 313K.

Outra árvore que possui valor comercial agregado, é a espécie *Sterculia striata* St. Hill et Naud, conhecida popularmente como Chichá-do-Cerrado. A espécie é nativa do cerrado brasileiro e de seu fruto são extraídas nozes com rico valor nutricional (Policarpi *et al*., 2018), porém as cascas são consideradas como resíduos. Nesse âmbito, Quesada *et al.* (2021) produziram dois tipos de carvões ativados a partir das cascas da fruta do Chichá-do-Cerrado para remoção do fármaco metformina da água. O carvão ativado por meio do método químico apresentou maior capacidade adsortiva do que o carvão produzido pela modificação física, sendo 45,50 e 33,75 mg g^{-1}, respectivamente.

A *Guazuma ulmifolia* popularmente conhecida como mutamba ou fruto-do-macaco, é uma espécie arbórea da família Malvaceae, comumente encontrada em países da América Latina, como Brasil, México, Cuba, Equador e Guatemala (Silva *et al*., 2023). Essa espécie também é bastante conhecida por suas propriedades nutricionais e terapêuticas, como no tratamento de distúrbios cardiovasculares e gastrointestinais. Além disso, apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobiana e antiprotozoária amplamente comprovadas por estudos *in vitro* e *in vivo* (Pereira *et al.,* 2019). Araújo *et al.* (2021) modificaram a fruta da *Guazuma ulmifolia* por meio de tratamento químico e térmico para síntese de um bioadsorvente destinado ao tratamento de água. O material apresentou uma satisfatória remoção de diclofenaco da água com capacidade adsortiva de 27,80 mg g^{-1}.

A espécie *Aiphanes aculeata* da família Arecaceae, por sua vez, é uma espécie de palmeira nativa da América Central e Brasil (Mohammed *et al.,* 2023). Sua utilização comercial inclui produtos alimentares, farmacêuticos e fins ornamentais (Fernandes *et al.*, 2021). Araújo *et al.* (2019) conduziram ensaios exploratórios para remoção de laranja safranina por bioadsorvente à base de endocarpos *in natura* da espécie e obtiveram 90% de remoção do contaminante em pH 10.

Em uma aplicação para a indústria de bebidas, Honorato *et al.* (2022) utilizaram diferentes bioadsorventes para a remoção de cobre da cachaça, e que é considerado um dos requisitos de garantia de qualidade do produto. Os melhores resultados obtidos foram com o bagaço de cana tratado termicamente (17 mg g^{-1}), okara (5,33 mg g^{-1}) e semente de moringa (0,77 mg g^{-1}).

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O setor agroindustrial e os processos subsequentes de industrialização de matérias-primas possuem alto impacto na geração de resíduos, portanto é necessário repensar o fluxo da cadeia de produção e apontar novas rotas de reutilização dos recursos. A disposição inadequada desses materiais no ambiente tem se tornado uma fonte de contaminação causando a diminuição da qualidade do solo, da água e do ar. Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de vias sustentáveis para evitar a sobrecarga dos compartimentos ambientais, em termos de contaminação e de exploração de novos recursos naturais.

A aplicação de resíduos orgânicos como bioadsorventes tem sido amplamente explorada para o tratamento de águas e efluentes contaminados com poluentes emergentes, como corantes, pesticidas, fármacos e metais pesados. Suas propriedades físico-químicas

como composição e grupos funcionais superficiais, são bastante atrativas do ponto de vista do processo adsortivo. Além disso, modificações superficiais podem ser manipuladas para otimizar a eficiência de adsorção. Os tratamentos químicos, térmicos e físicos têm demonstrado ser uma excelente abordagem para sintetizar bioadsorventes funcionalizados.

Embora a comunidade científica esteja comprometida com a investigação de diversos resíduos para utilização como bioadsorventes, ainda existem muitas limitações que impedem sua aplicação em escala industrial. A análise técnico-econômica do processo deve levar em conta o consumo energético, necessidade de tratamento prévio, processamento dos resíduos e operações de logística e transporte. Os custos associados aos métodos da regeneração do bioadsorvente, como métodos térmicos, químicos, eletroquímicos e por ultrassom, também devem ser analisados. O descarte do bioadsorvente ao final de seu ciclo de vida é um processo que deve ser abordado. E neste caso, os bioadsorventes modificados com íons metálicos, por exemplo, necessitam receber um tratamento prévio antes do destino final.

Portanto, a prospecção da reutilização de resíduos agroindustriais e de outras fontes vegetais para a síntese de materiais com novas funcionalidades, contribui para o fortalecimento dos pilares, água, energia e alimentos, contribuindo para a aplicação efetiva de uma economia circular. Além disso, essa abordagem converge para políticas sustentáveis alinhadas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável números 6 e 12, elaboradas pela Organização das Nações Unidas (ONU), que se referem à garantia de uma gestão eficiente e de qualidade dos recursos hídricos e à garantia de um padrão de consumo e produção responsáveis, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS

ADAMU, H.; BELLO, U.; YUGUDA, A. U.; TAFIDA, U. I.; JALAM, A. M.; SABO, A.; QAMAR, M., Production processes, techno-economic and policy challenges of bioenergy production from fruit and vegetable wastes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 186, p. 113686, 2023.

ADEWUYI, A. Chemically modified biosorbents and their role in the removal of emerging pharmaceutical waste in the water system. **Water**, v. 12, n. 6, p. 1551, 2020.

AKINNWO, S.O., Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies, **Environmental Challenges**, v. 12, p. 1-18, 100733, 2023.

AKASH, M. S. H., REGMAN, K., HASHMI, M. Z. (Eds.). **Endocrine disrupting chemicals-induced metabolic disorders and treatment strategies**. Cham: Springer, 2021.

AKPOMIE, K.G.; CONRADIE, J. Banana peel as a biosorbent for the decontamination of water pollutants. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 4, p. 1085-1112, 2020.

ALI, A., Removal of Mn (II) from water using chemically modified banana peels as efficient adsorbent. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 7, p. 57-63, 2017.

ALI, A.; SAEED, K.; MABOOD, F., Removal of chromium (VI) from aqueous medium using chemically modified banana peels as efficient low-cost adsorbent. **Alexandria Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 2933-2942, 2016.

ARAUJO, L. A.; BEZERRA, C. O.; CUSIOLI, L. F.; SILVA, M. F.; NISHI, L.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Moringa oleifera biomass residue for the removal of pharmaceuticals from water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 6, p. 7192-7199, 2018.

ARAÚJO, L. A.; JANUÁRIO, E. F. D.; BELTRAN, L. B.; GUERRA, A. C. S.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Estudo cinético da biossorção de corante por fruto de *Aiophanes aculeata*, *In:* XI Encontro Internacional de Produção Científica, Maringá. **Anais** (...). Maringá: Unicesumar, 2019.

ARAUJO, L. A.; BEZERRA, C. O.; CUSIOLI, L. F.; MIGUEL, T. R.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Diclofenac adsorption using a low-cost adsorbent derived from Guazuma ulmifolia Lam. fruit via chemical and thermal treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 6, p. 106629, 2021.

SUMÁRIO

ARAÚJO, L. C. A.; SILVA, S. M.; SÁ, R. A. Q. C.; LIMA, A. V. A.; BARBOSA, A. V.; SILVA, J. S.; LEITE, K. M.; NASCIMENTO-JUNIOR, J.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; MENDES-MARQUES, C. L.; SILVA, F. H. S.; OLIVEIRA, M. B. M., Emerging Contaminants, IN: **Effects of Antibiotics on Impacted Aquatic Environment Microorganisms. Emerging Contaminants**. Ed. Aurel Nuro, 2020, p.191-203.

ATKINS, P.; PAULA, J. D., **Físico-Química** - v. 2, 10ª Ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2017.

BABUJI, P.; THIRUMALAISAMY, S.; DURAISAMY, K.; PERIYASAMY, G., Human health risks due to exposure to water pollution: a review. **Water**, v. 15, n. 14, 2532, p. 1-14, 2023.

BANKOLE, D. T.; OLUYORI, A. P.; INYNBOR, A. A. The removal of pharmaceutical pollutants from aqueous solution by Agro-waste. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 5, 104699, p. 1-21, 2023.

BAPTISTA, A. T. A.; SILVA, M. O.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Protein fractionation of seeds of Moringa oleifera lam and its application in superficial water treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 180, p. 114-124, 2017.

BARROS, G.A.M.D.; CALONEGO, M. A. M.; MENDES, R. F.; CASTRO, R. A. M.; FARIA, J. F. G.; TRIVELLATO, S. A.; CAVALCANTE, R. S.; FUKUSHIMA, F. B.; DIAS, A., The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 69, p.529-536, 2020.

BHAT, R., Sustainability challenges in the valorization of agri-food wastes and by-products, In: **Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products**, Academic Press, 2021, p. 1-17.

BENJELLOUN, M.; MIYAH, Y.; EVRENDILEK, G. A.; ZERROUG, F. LAIRINI, S., Recent Advances in Adsorption Kinetic Models: Their Application to Dye Types**, Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 4, 103031, 2021.

BHANDARI, R. K.; DEEM, S. L.; HOLLIDAY, D. K.; JANDEGIAN, C. M.; KASSOTIS, C. D.; NAGEL, S. C.; TILLITT, D. E.; SAAL, F. S. V.; ROSENFELD, C. S., Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17α-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 214, p. 195-219, 2015.

BHADRA, B. N.; JHUNG, S. H. A remarkable adsorbent for removal of contaminants of emerging concern from water: Porous carbon derived from metal azolate framework. **Journal of Hazardous Materials**. v. 340, p. 179-188, 2017.

BHARGAVA, A.; SRIVASTAVA, S., **Biotechnology: Recent Trends and Emerging Dimensions,** 1 Ed. Boca Raton, 192 p., 2017.

BITTENCOURT, G. A.; VANDERBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K.; HERRMANN, L. W.; MELLO, A. F. M.; VASQUEZ, Z. S.; KARP, S. G.; SOCCOL, CC. R., Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: a review. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125594, 2021.

BLAAK, H.; LYNCH, G.; ITALIAANDER, R.; HAMIDJAIA, R. A.; SCHETS, F. M.; HUSMAN, A. M. R., Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-LactamaseProducing Escherichia coli in Dutch Surface Water and Wastewater. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0127752, 2015.

BONILLA, A.P.; MENDOZA, D. I. C.; REYNEL, H. E. A., **Adsorption Processes for Water Treatment and Purification**. Ed. Springer, 2017.

BORETTI, A.; ROSA, L., Reassessing the projections of the World Water Development Report, **Clean Water,** v. 15, p. 1-6, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, n. 85, p. 127-127, 2021.

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-Conama. São Paulo, SP, 2011

CHENG, K. W.; HSIEH, C. M.; CHEN, H. W.; CHI, P. C.; YASNG, D. P.; CHAN, S. H.; CHEN, J. Y.; HWA, H. L.; FANG, C. C.; WENG, T. L.; CHEN, P. S., Determination of synthetic cathinone α-pyrrolidinovalero-phenone and its metabolite in urine using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34(SI), e8579, p. 1-6, 2020.

CHONG, Z. T.; SOH, L. S.; YONG, W. F., Valorization of agriculture wastes as biosorbents for adsorption of emerging pollutants: Modification, remediation and industry application, **Results in Engineering**, v. 17, 100960, 2023.

CORTÉS, D. A.; ORTEGA, D. E.; MIRANDA, S. R., Mechanistic insights into the adsorption of endocrine disruptors onto polystyrene microplastics in water. **Environmental Pollution**, 319, 121017, p. 1-11, 2023.

CUSIOLI, L. F.; QUESADA, H. B.; CASTRO, A. L. B. P.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Development of a new low-cost adsorbent functionalized with iron nanoparticles for removal of metformin from contaminated water. **Chemosphere**, v. 247, 125852, p. 1-4, 2020.

CUSIOLI, L. F., QUESADA, H. B.; ANDRADE, M. B.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Application of a novel low-cost adsorbent functioned with iron oxide nanoparticles for the removal of triclosan present in contaminated water. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 325, p. 111328, 2021a.

CUSIOLI, L. F.; BEZERRA, C. O.; QUESADA, H. B.; BAPTISTA, A. T. A.; NISHI, L.; VIEIRA, M. F.; BERGAMASCO, R., Modified Moringa oleifera Lam. Seed husks as low-cost biosorbent for atrazine removal. **Environmental Technology**, v. 42, n. 7, p. 1092-1103, 2021b.

CUSIOLI, L. F.; NISHI, L.; BELTRAN, L. B.; RIBEIRO, A. C.; BERGAMASCO, R.; BULLA, M. K.; FACINA, R. K.; MATEUS, G. A. P., Synthesis of a Chemically Modified Biosorbent Based on the Invasive Plant Leucaena leucocephala and Its Application in Metformin Removal. **Water**, v. 15, n. 14, p. 2600, 2023.

DEHGHANI, M. H.; AHMADI, S. GHOSH, S.; KHAN, M. S.; OTHMANI, A.; KHANDAY, W. A.; GOKKUS, O.; OSAGIE, C.; AHMARUZZAMAN, M.; MISHRA, S. R.; LIMA, E. C.; MUBARAK, N. M.; KARRIM R. R.; ANSARI, K., Sustainable remediation technologies for removal of pesticides as organic micro-pollutants from water environments: A review, **Applied Surface Science Advances**, v. 19, 100558, 2024.

DZUVOR, C. K. O.; PAN, S.; AMANZE, C.; AMUZU, P.; ASAKIYA, C.; KIBI, F., Bioactive components from Moringa oleifera seeds: production, functionalities and applications–a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 271-293, 2022.

ESCHER, M. A. S.; PINHEIRO, J. H. P. A.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R., The Environmental problem of contamination of water resources by pharmaceuticals, **Brazilian Journal of Environmental Sciences**, n. 51, p. 141–148, 2019.

FERNANDES, I. A. A.; PONHOZI, I. B.; MEIRA, A. P.; BERGAMIN, G. P.; GOMES, R. G., Characterization of Aiphanes aculeata fruit pulp and application in ice cream formulations. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e45710515184, 2021.

GANDJI, K.; CHADARE, F. J.; IDOHOU, R.; SALAKO, V. K., Status and utilisation of Moringa oleifera Lam: A review. **African Crop Science Journal**, v. 26, n. 1, p. 137-156, 2018.

GANESH, K. S.; SRIDHAR, A.; VISHALI, S. Utilization of fruit and vegetable waste to produce value-added products: Conventional utilization and emerging opportunities-A review. **Chemosphere**, v. 287, p. 132221, 2022.

GAUTAM, K.; SHARMA, P.; DWIVEDI, S.; SINGH, A.; GAUR, V. K.; VARIANI, S.; SRIVASTAVA, J. K.; PANDEY, A.; CHANG, J. S.; NGO, H. H., A review on control and abatement of soil pollution by heavy metals: Emphasis on artificial intelligence in recovery of contaminated soil, **Environmental Research**, v. 225, 115592, 2023.

GOMES, H. D. O.; FREIRE, P. T. C.; NASCIMENTO, R. F.; TEIXEIRA, R. N. P., Removal of contaminants from water using Moringa oleifera Lam. as biosorbent: An overview of the last decade. **Journal of Water Process Engineering**, v. 46, 102576, p. 1-14, 2022.

HONORATO, K. R.; PAULINO, I. M. R.; OLIVEIRA, A. M.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S.; GOMES, R. G., Removal of copper ions from alembic cachaça using agro-industrial residues as biosorbents. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 8, p. 1424-1438, 2022.

HOSSAIN, N.; BHUIYAN, M. A.; PRAMANIK, B. K.; SABZOI, N., Waste materials for wastewater treatment and waste adsorbents for biofuel and cement supplement applications: a critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, 120261, p. 1-13, 2020.

HOWE, K. J. *et al.* **Princípios de Tratamento de Água**. São Paulo, Ed. Cengage Learning Brasil, 624 p., 2016.

HU, Y.; WEN, S.; YUAN, D.; PENG, L.; ZENG, R.; YANG, Z.; LIU, Q.; XU, L.; KANG, D., The association between the environmental endocrine disruptor bisphenol A and polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 5, p. 370-377, 2018.

IBÁÑEZ, M.; BIJLSMA, L.; PITARCH, E.; LÓPEZ, F., Occurrence of pharmaceutical metabolites and transformation products in the aquatic environment of the Mediterranean area. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 29, e00118, p. 1-24, 2021.

IRANDOST, M., AKBARZADEH, R.; PIRSAHEB, M.; ASADI, A.; MOHAMMADI, P.; SILLANPAA, M., Fabrication of highly visible active N, S co-doped TiO2MoS2 heterojunction with synergistic effect for photocatalytic degradation of diclofenac: Mechanisms, modeling and degradation pathway. **Journal of Molecular Liquids**, v. 291, 111342, p. 1-14, 2019.

ISMAIL, N. A. H.; WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. **Chemosphere**, v. 188, p. 375-388, 2017

JAÉN-GIL, A.; FARRÉ, M. J.; MELSIÓ, A. S.; COMPTE, A. S.; BARCELÓ, D.; MOZAZ, S. R., Effect-Based Identification of Hazardous Antibiotic Transformation Products after Water Chlorination. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 14, p. 9062–9073, 2020.

SUMÁRIO

JAFARI, E. O.; HAMIDIAN, A. H.; ZHANG, Y.; YANG, M., Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment. **Water Environment Research**, v. 92, n. 2, p. 177-188, 2020.

JANUÁRIO, E. F. D.; VIDOVIX, T. B.; BISSARO, C. A.; DEFENDI, R. O.; JORGE, L. M. M.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Evaluation of the black soybean hulls agro-industrial waste for chloroquine removal from aqueous medium and treatment of multi-components. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 45, n. 5, p. 880-890, 2023.

JANUÁRIO, E. F. D.; VIDOVIX, T. B.; ARAUJO, L. A.; BELTRAN, L. B.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Investigation of Citrus reticulata peels as an efficient and low-cost adsorbent for the removal of safranin orange dye. **Environmental Technology**, v. 43, n. 27, p. 4315-4329, 2022a.

JANUÁRIO, E. F. D.; VIDOVIX, T. B.; RIBEIRO, A. C.; DUARTE, D. C. N. F. A.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Evaluation of hydrochar from peach stones for caffeine removal from aqueous medium and treatment of a synthetic mixture. **Environmental Technology**, v. 45, n. 6, p. 1141-1154, 2022b.

JATOI, A. S.; AHMED, I. AKHTER, F. SULTAN, S. H.; CHANDIO, G. S.; AHMED, S.; HASHMI, Z.; USTO, A.; SHAIKH, M. S.; NASAR, M. S.; MAITLO, G., Recent advances and Treatment of Emerging Contaminants through the Bio-assisted Method: A Comprehensive Review, **Water, Air & Soil Pollution**, v. 234, n. 49, p. 1-15, 2023.

KARP, S. G.; VANDENBERGHE, L.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VASQUEZ, Z. S.; BURGOS, W. S. M.; PRADO, F.; HERRMANN, L. W.; LETTI, L.; MEZZALIRA, F.; SOCCOL, C., Integrated processing of soybean in a circular bioeconomy. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals,** p. 189-216, 2022.

LANIN, S. N.; PLATONOVA, S. A.; VINOGRADOV, A. E.; LAMINA, K. S.; NESTERENKO, E. P.; NESTERENKO, P. N., Comparative study of different polar adsorbents for adsorption of water soluble vitamins. **Adsorption**, v. 26, p. 339-348, 2020.

LEAL, R.; ALENCAR, G. A. B. C., Uso indevido e dependência de opioides: da prevenção ao tratamento. **Revista de Medicina de Família e Saúde Mental**, v. 2, n. 1, p. 29-44, 2020.

LESTER-CARD, E.; SMITH, G.; LLOYD, G.; TIZAOUI, C., A green approach for the treatment of oily steelworks wastewater using natural coagulant of *Moringa oleifera* seed, **Bioresource Technology Reports**, v. 22, 101393, 2023.

LI, P.; WU, Y.; HE, Y.; ZHANG, B.; HUANG, Y.; YUAN, O.; CHEN, Y., Occurrence and fate of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in a reservoir with ecological purification facilities for drinking water sources, **Science of The Total Environment**, v. 707.135276, 2020.

LINDEN, K. G.; HULL, N.; SPEIGHT, V., Thinking Outside the Treatment Plant: UV for Water Distribution System DisinfectioN, **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 5, p. 1226–1233, 2019.

LINTERN, A.; PHILLIPS, L. E. M.; WINFREY, B. K.; DUNCAN, J.; GRADY, C. A., Best management practices for diffuse nutrient pollution: Wicked problems across urban and agricultural watersheds. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 15, p. 9159-9174, 2020.

MAGALHÃES-GHIOTTO, G. A. V.; OLIVEIRA, A. M.; NATAL, J. P. S.; BERGAMASCO, R. GOMES, R. G., Green nanoparticles in water treatment: a review of research trends, applications, environmental aspects and large-scale production. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, 100526, p. 1-11, 2021.

MAGALHÃES-GHIOTTO, G. A.V.; NATAL, J. P. S.; NICHI, L.; ANDRADE, M. B.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Okara and okara modified and functionalized with iron oxide nanoparticles for the removal of Microcystis aeruginosa and cyanotoxin. **Environmental Technology**, v. 44, n. 18, p. 2737-2752, 2023.

MANHONGO, T. T.; CHIMPHANGO, A. F. A.; THORNLEY, P.; RODER, M., Current status and opportunities for fruit processing waste biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 155, 111823, p. 1-19, 2022.

MASHAMAITE, C. V.; PIETERSE, P. J.; MOTHAPO, P. N.; PHIRI, E. E., Moringa oleifera in South Africa: A review on its production, growing conditions and consumption as a food source. **South African Journal of Science**, v. 117, n. 3-4, p. 1-7, 2021.

MEKOUAR, M. A. Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). **Yearbook of International Environmental Law**, v. 28, p. 506-520, 2017.

MOHAMMED, M. H. H.; HAMED, A. N. E.; ELHABAL, S. F.; MOKHTAR, F. A.; ABDELMONHSEN, U. R.; FOUAD, M. A.; KAMEL, M. S., Metabolic profiling and cytotoxic activities of ethanol extract of *Dypsis leptocheilos* aerial parts and its green synthesized silver nanoparticles supported by network pharmacology analysis, **South African Journal of Botany**, v. 161, p. 648-665, 2023.

MONTOYA, M. A., FINAMORE, E. B. Os recursos hídricos no agronegócio brasileiro: Uma análise insumo-produto do uso, consumo, eficiência e intensidade. **Revista Brasileira de Economia**, 74, 441-464, 2021.

NAIDU, R.; JIT, J.; KENNEDY, B.; ARIAS, V., Emerging contaminant uncertainties and policy: The chicken or the egg conundrum. **Chemosphere**, v.154, p. 385–390, 2016.

NAYAK, A.; BHUSHAN, B.; KOTNALA, S. Fundamentals and mechanism of adsorption, *In*: **Sustainable Technologies for Remediation of Emerging Pollutants from Aqueous Environment,** Elsevier, 2024, p. 29-62.

NNAJI, N. D.; ONYEAKA, H.; MIRI, T.; UGWA, C., Bioaccumulation for heavy metal removal: a review, **S N Applied Sciences,** v. 5, n. 125, p. 1-12, 2023.

NATAL, J. P. S.; CUSIOLI, L. F.; MAGALHÃES-GHIOTTO, G. A. V.; BERGAMASCO, R.; GOMES, R. G., Removal of methylene blue and safranin orange pollutants from liquid effluents by soy residue. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 101, n. 10, p. 5561-5575, 2023.

NATARAJAN, R.; SAIKIA, K.; PONNUSAMY, S. K.; RATHANKUMAR, A. K.; RAJENDRAN, D. S.; VENKATARAMAN, S.; TANNANI, D. B.; ARVIND, V.; SOMANNA, T.; BANERJEE, K., MOHIDEEN, N., VAIDYANATHAN, V. K., Understanding the factors affecting adsorption of pharmaceuticals on different adsorbents–A critical literature update. **Chemosphere**, v. 287, Part 1, 131958, p. 1-21, 2022.

NGUYEN, T. A. H.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; ZHOU, J. L.; WANG, J.; LIANG, H.; LI, G., Phosphorus elimination from aqueous solution using 'zirconium loaded okara'as a biosorbent. **Bioresource technology**, v. 170, p. 30-37, 2014.

NGUYEN, T. P.; TRAN, Q. B.; LY, Q. V.; HAI, L. T.; LE, D. T.; TRAN, M. B.; HO, T. T. T.; NGUYEN, X. C.; SHOKOUHIMEHR, M.; VO, D. V. N.; LAM, S. S.; DO, H. T.; KIM, S. Y.; TUNG, T. V.; LE, Q. V., Enhanced visible photocatalytic degradation of diclofen over N-doped Ti02 assisted with H202: A kinetic and pathway study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 8361-8371, 2020.

NOUMAN, W.; SIDDIQUI, M. T.; MAGSOOD, S.; FAROOQ, H.; ZUBAIR, M.; GULL, T., Biomass production and nutritional quality of Moringa oleifera as a field crop. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 37, n. 4, p. 410-419, 2013.

OKORO, H. K.; PANDEY, S.; OGUNKUNLE, C. O.; NGILA, C. J.; ZVINOWANDA, C.; JIMOH, I.; LAWAL, I. A.; OROSUN, M. M.; ADENIYI, A. G., Nanomaterial-based biosorbents: Adsorbent for efficient removal of selected organic pollutants from industrial wastewater, **Emerging Contaminants**, v. 8, p. 46-58, 2022.

OKOYA, A. A.; OLAIYA, O. O.; AKINYELE, A. B.; OCHOR, N. O., Efficacy of Moringa oleifera seed husk as adsorptive agent for trihalomethanes from a water treatment plant in southwestern, Nigeria. **Journal of Chemistry**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

SUMÁRIO

OKUMURA, A. T. R.; SILVA, A.; SILVA, N. R. S.; REIS, E.; BIFANO, R. B. A.; QUILENATO, R. V., Determinação da qualidade da água de um rio tropical sob a perspectiva do uso. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 13, n. 04, p. 1835-1850, 2020.

OLIVEIRA, A. M.; MATEUS, G. A. P.; SANTOS, T. R. T.; ABREU-FILHO, B. A.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Functionalized magnetite nanoparticles with Moringa oleifera with potent antibacterial action in wastewater. **Environmental Technology**, v. 42, n. 27, p. 4296-4305, 2021.

OLIVEIRA, V. B.; DONATO, M. E. A. A. L.; LIMA, C. G. S. L.; FREITAS, E. C.; SANTOS, I. R. F.; LEAL, T. P.; ALMEIDA, S. M., Impactos ambientais e toxicológicos pela contaminação de fármacos principalmente antibióticos em ambientes aquáticos: revisão da literatura. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n.7, p. 838-850, 2023

OSMAR, A. I.; MONAEM, E. A. A. E.; ELGARAHY, A. M.; ANIAGOR, C.; HOSNY, M.; FARGHALI, M.; RASHAD, E.; EJIMOFOR, M. I.; LÓPEZ-MALDONADO, E. A.; IHARA, I.; YAP, P. S.; ROONEY, D.; ELTAWEIL, A., Methods to prepare biosorbentes and magnetic sorbents for water treatment: a review**. Environmental Chemistry Letters**, v. 21, p. 2337-2398, 2023.

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. The past, present, and future trends of biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 86-102, 2010.

PATEL, N.; KHAN, Z. A.; SHAHANE, S.; RAI, D.; CHAUHAN, D.; KANT, C.; CHAUDHARY, V. K., Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review, **Pollution**, v. 6, n. 1, p. 99-113, 2020.

PEREIRA, G. A.; ARAUJO, N. M. P.; ARRUDA, H. S.; FARIAS, D. P.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M., Phytochemicals and biological activities of mutamba (Guazuma ulmifolia Lam.): A review. **Food Research International**, v. 126, p. 108713, 2019.

PERICHERLA, S.; VARA, S., Effects of Diffused Pollution on Surface Waters Due to Agricultural Runoff**. Journal of Advanced Zoology**, v. 44, n. S-3, p. 811-826, 2023.

PFEIL, M.; PÉREZ, I. T.; DENFELD, D.; DOMINGUEZ, Y. D.; POHL, S.; PILOTO-RODRIGUEZ, R., Characterization and assessment of Jatropha curcas and Moringa oleifera husk and their potential use in gasification. **Energy, Ecology and Environment**, v. 6, n. 2, p. 170-182, 2021.

PIMENTEL, R. G.; REZENDE, N.; BENATTI, C. T.; LAUTENSCHLAGER, S. R.; BERGAMASCO, R., Utilização de adsorventes para remoção de compostos farmacêuticos no tratamento de água: uma revisão, **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental,** v. 11, p. 292-305, 2022.

POLICARPI, P. B.; TURCATTO, L.; DEMOLINER, F.; FERRARI, R. A.; BASCUNAN, V. L. A. F.; RAMOS, J. C.; JACHMANNIÁN, I.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; BLOCK, J. M., Nutritional potential, chemical profile and antioxidant activity of Chichá (Sterculia striata) nuts and its by-products. **Food Research International**, v. 106, p. 736-744, 2018.

PRETTO, C.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; COSTA, C., Possibilities for producing energy, fuels, and chemicals from soybean: a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 1703-1730, 2018.

QUESADA, H. B.; ATAÚJO, T. P.; CUSIOLI, L. F.; BARROS, M. A. S. D.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Evaluation of novel activated carbons from chichá-do-cerrado (Sterculia striata St. Hil. et Naud) fruit shells on metformin adsorption and treatment of a synthetic mixture. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, 104914, 2021.

QUESADA, H. B.; BAPTISTA, A. T. A.; CUSIOLI, L. F.; SEIBERT, D.; BEZERRA, C. O.; BERGAMASCO, R., Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. **Chemosphere**, v. 222, p. 766-780, 2019a.

QUESADA, H. B.; CUSIOLI, L. F.; BEZERRA, C. O.; BAPTISTA, A. T. A.; NISHI, L.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Acetaminophen adsorption using a low-cost adsorbent prepared from modified residues of Moringa oleifera Lam. seed husks. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 10, p. 3147-3157, 2019b.

RAMIREZ, R.; SCHNORR, C. E.; GEORGIN, J.; NETTO, M. S.; FRANCO, D. S. P.; CARISSIMI, E.; WOLFF, D.; SILVA, L. F. O.; DOTTO, G. L., Transformation of residual açai fruit (Euterpe oleracea) seeds into porous adsorbent for efficient removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide from waters. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7781, 2022.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S., Application of adsorption process for effective removal of emerging contaminants from water and wastewater, **Environmental Pollution**, v. 280, 2021.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; VO, D. V. N., Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 797, n. 149134, p. 1-22, 2021.

REYES, N. J. D.; GERONIMO, F. K. F.; YANO, K. A. V.; GUERRA, H. B.; KIM, L. H., Pharmaceutical and personal care products in different matrices: occurrence, pathways, and treatment processes. **Water**, v. 13, n.9, 1159, p. 1-25. 2021.

RIBEIRO, A. C.; JANUÁRIO, E. F. D.; VIDOVIX, T. B.; BERGAMASCO, R., Synthesis of a novel functionalized biosorbent from mango stone and its application in the pharmaceutical's removal from water and a synthetic mixture. **Chemosphere**, v. 346, p. 140520, 2024.

RIYADI, B. S.; ALHAMDA, S.; AIRLAMBANG, S.; ANGGREINY, R.; ANGGARA, A. T.; SUDARYAT, Environmental Damage Due to Hazardous and Toxic Pollution: A Case Study of Citarum River, West Java, Indonesia, **International Journal of Criminology and Sociology**, v. 9, p. 1844-1852, 2020.

ROCHA, M. F.; MAGALHÃES-GHIOTTO, G. A. V.; BERGAMASCO, R.; GOMES, R. G., Cyanobacteria and cyanotoxins in the environment and water intakes: Reports, diversity of congeners, detection by mass spectrometry and their impact on health. **Toxicon**, v. 238, 107589, p. 1-16, 2024.

SAA, R. W.; FOMBANG, E. N.; NDJANTOU, E. B.; NJINTANG, N. Y., Treatments and uses of Moringa oleifera seeds in human nutrition: A review. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 6, p. 1911-1919, 2019.

SACCO, O.; MURCIA, J. J.; LARA, A. E.; LAVERDE, M. H.; ROJAS, H.; NAVIO, J. A.; HIDALGO, M. C.; VAIANO, V., Pt–TiO2–Nb2O5 heterojunction as effective photocatalyst for the degradation of diclofenac and ketoprofen. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 107, 104839, p. 1-13, 2020.

SAIDULU, D.; GUPTA, B.; GUPTA, A. K.; GHOSAL, P. S., A review on occurrences, eco-toxic effects, and remediation of emerging contaminants from wastewater: special emphasis on biological treatment based hybrid systems. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, 105282, p. 1-24, 2021.

ŞAHIN, S.; BILGIN, M., Valorization of peach (Prunus persica L.) waste into speciality products via green methods. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 123-132, 2022.

SALGOT, M.; FOLCH, M., **Wastewater treatment and water reuse, Current Opinion in Environmental Science & Health, v. 2, p. 64-74, 2018.**

SALIM, N. S. M; SINGH, A.; RAGHAVAN, V. Potential utilization of fruit and vegetable wastes for food through drying or extraction techniques. **Nov. Technology Nutrition Food Science**, v. 1, n. 2, p. 1-12, 2017.

SANTOS, B. H.; JERÓNIMO, O. Q.; MIRANDA, J. R., Physical, chemical, tecno-functional, and thermal properties of Leucaena leucocephala seed. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e74921, 2022.

SCHMITZ, A. P. O.; VIEIRA, M.; ANTONIOLLI, C. A.; SILVEIRA, W.; PRADO, J. P.; BELTRAN, L. B.; CUSIOLI, F. L.; BERGAMASCO, R., Estudo da cinética de adsorção do carvão ativado impregnado com óxido de grafeno. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10732-10743, 2021

SEDIBE, M. M.; MOFOKENG, A. M.; MASVODZA, D. R. **Production and Utilization of Legumes - Progress and Prospects,** Soybean production, constraints, and future prospects in poorer countries: a review., 1. Ed. Intech Open, p. 192, 2023.

SHAFEI, A.; RAMZY, M. M.; HEGAZY, A. I.; HUSSENY, A. K.; HADARY, U. G. E.; TAHA, M. M.; MOSA, A. A., The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. **Gene,** v. 647, p. 235-243, 2018.

SILVA, A. P. R. F. Descarte de medicamentos e seus impactos à saúde e meio ambiente. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research,** v. 28, n. 4, p. 92-96, 2019a.

SILVA, P. O.; COSTA, A. M.; SILVA, A. A.; RODRIGUES, C. R.; CARLOS, L., Physiological and morphological responses of seedlings of *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) grown under phosphorus levels. **Rodriguésia**, v. 73, e01462021, 2023.

SILVEIRA, F. M. R.; BAPTISTA, A. T. A.; DUTRA, T. V.; ABREU-FILHO, B. A.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R., Application of *Moringa oleifera* Lam. fractionated proteins for inactivation of Escherichia coli from water. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 2, p. 265-273, 2020.

SILVESTRI, S.; BURGO, T. A. L.; FERREIRA, C. D.; LABRINCHA, J. A.; TOBALDI, D. M., Polypyrrole-TiO2 composite for removal of 4-chlorophenol and diclofenac. **Reactive and Functional Polymers**, v. 146, 104401, 2020.

SINGH, V.; SUTHAR, S. Occurrence, seasonal variation, mass loading and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage treatment plants in cities of upper Ganges bank, India. **Journal of Water Process Engineering**, v. 44, 102399, p.1-13, 2021.

SOLANGI, N. H.; KUMAR, J.; MAZARI, S.; AHMED, S.; FATIMA, N.; MUJAWAR, M. N., Development of fruit waste derived bio-adsorbents for wastewater treatment: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, 125848, p. 1-31, 2021.

SOUSA, J. C. G.; RIBEIRO, A. R.; BARBOSA, M. O.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T., A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines, **Journal of Hazardous Materials**, v. 344**,** p. 146-162, 2018.

SOUZA, R. M.; QUESADA, H. B.; CUSIOLI, L. F.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; BERGAMASCO, R., Adsorption of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) by agro-industrial by-product with chemical and thermal modification: Adsorption studies and mechanism, **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 1-12, 2021.

TAMJIDI, S.; MOGHADAS, B. K.; ABDOLAHI, P.; PARNIAN, N.; FARHADI, A.; Industrial by-products as potentially economic and promising adsorbents for removing dyes from effluents: A review study. **Physical Chemistry Research**, v. 12, n. 2, p. 361-382, 2024.

TIWARI, B; SELLAMUTHU, B.; OUARDA, Y.; DROGUI, P.; TYAGI, R. D.; BUELNA, G., Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 1-12, 2017.

TOOMER, O. T.; OVIEDO, E. O.; ALI, M.; PATINO, D.; JOSEPH, M.; FRINSKO, M.; VU, T.; MAHARJAN, P.; FALLEN, B.; MIAN, R., Current agronomic practices, harvest & post-harvest processing of soybeans (*Glycine max*) - A review. **Agronomy**, v. 13, n. 2, p. 427, 2023.

TORRES-LEÓN, C.; ROJA, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; SERNA-COCK, L.; BELMARES-CERDA, R. E.; AGUILAR, C. N., Mango seed: Functional and nutritional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 109-117, 2016.

TRIGO, C.; CASTELLÓ, M. L.; ORTOLÁ, M. D.; GARCIA-MARES, F. J.; SORIANO, M. D., *Moringa oleifera*: An unknown crop in developed countries with great potential for industry and adapted to climate change. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 31, 2021.

TSARIDOU, C.; KARABELAS, A. J. Drinking water standards and their implementation—A critical assessment. **Water,** v. 13, n. 20, 2918, p.1-33, 2021.

TZANAKAKIS, V. A.; PARANYCHIANAKIS, N. V.; ANGELAKIS, A. N.; Water Supply and Water Scarcity, *Water, v. 12, n. 9, 2347,* 2020.

VAN VLIET, M. T.; JONES, E. R.; FLORKE, M.; FRANSSEN, W. H. P.; HANASAKI, N.; WADA, Y.; YEARSLEY, J. R., Global water scarcity including surface water quality and expansions of clean water technologies**. Environmental Research Letters**, v. 16, n. 2, 024020, 2021.

VERAS, T. B.; PAIVA, A. L. R.; DUARTE, M. M. M. B.; NAPOLEÃO, D. C.; CABRAL, J. J. S. P., Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, p. 961–969, 2019.

VIDOVIX, T. B.; JANUÁRIO, E. F. D.; CUSIOLI, L. F.; QUESADA, H. B.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Low-cost adsorbent prepared from soybean hulls residues as potential alternative for cationic dyes removal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 44, n. 11, p. 2034-2044, 2022a.

VIDOVIX, T. B.; JANUARIO, E. F. D.; BERGAMASCO, R. VIEIRA, A. M. S., Evaluation of agro-industrial residue functionalized with iron oxide magnetic nanoparticles for chloroquine removal from contaminated water. **Materials Letters**, v. 326, p. 132915, 2022b.

VIDOVIX, T. B.; JANUÁRIO, E. F. D.; ARAÚJO, M. F.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Investigation of two new low-cost adsorbents functionalized with magnetic nanoparticles for the efficient removal of triclosan and a synthetic mixture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 31, p. 46813-46829, 2022c.

VIDOVIX, T. B.; JANUÁRIO, E. F. D.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S., Efficient removal of sertraline hydrochloride from wastewater using banana peels functionalized: Performance adsorption, mechanisms and applicability. **Environmental Technology**, v. 45, n. 11, p. 2119-2131, 2023.

VIOTTI, P. V.; MOREIRA, W. M.; SANTOS, O. A. A.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, A. M. S.; VIEIRA, M. F., Diclofenac removal from water by adsorption on *Moringa oleifera* pods and activated carbon: mechanism, kinetic and equilibrium study. **Journal of Cleaner Production**, [S.L.], v. 219, p. 809-817, 2019.

WARDATUN, S.; HARAHAP, Y.; MUN'IM, A.; SAPUTRI, F. C.; SUTANDYO, N., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit Seeds: A new potential source of sulfhydryl compounds. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 2, p. 298-302, 2020.

WEI, H.; TANG, M.; XU, X., Mechanism of uptake, accumulation, transport, metabolism and phytotoxic effects of pharmaceuticals and personal care products within plants: A review, **Science of the Total Environment**, v. 892, 164413, 2023.

XIONG, S.; WU, Z.; LI, Z. Facile fabrication of robust, versatile, and recyclable biochar-graphene oxide composite monoliths for efficient removal of different contaminants in water. **Chemosphere**, v. 287, 132418, p. 1-8, 2021.

YAASHIKAA, P. R.; KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; VO, D. V. N., Advances in biosorbents for removal of environmental pollutants: a review on pretreatment, removal mechanism and future outlook. **Journal of Hazardous Materials**, v. 420, p. 126596, 2021.

YADAY, D.; RANGABHASHIYAM, S.; VERMA, P.; SINGH, P.; DEVI, P.; KUMAR, P.; HUSSAIN, C. M.; GAURAV, G. K.; KUMAR, K. S., Environmental and health impacts of contaminants of emerging concerns: Recent treatment challenges and approaches. **Chemosphere**, v. 272, 129492, p. 1-19, 2021.

YAMAMGUCHI, N. U.; CUSIOLI, L. F.; QUESADA, H. B.; FERREIRA, M. E. C.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; VIEIRA, A. M. S.; GOMES, R. G.; VIEIRA, M. F.; BERGAMASCO, R., A review of *Moringa oleifera* seeds in water treatment: Trends and future challenges, **Process Sagety and Enviromental Protection**, v. 147, p. 405-420, 2021.

ZHANG, K.; YUAN, G.; WERDICH, A. A. ZHAO, Y., Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebra fish (*Danio rerio*) at low concentrations. **Environmental Pollution**, v. 258, 113613, p. 1-9, 2020.

4.4

Ana Luiza de Brito Portela Castro
Carlos Alexandre Fernandes
Diane Marques Magnoni
Michele Cristina Heck
Luciana Andréia Borin de Carvalho

ECOGENOTOXICIDADE EM PEIXES E PERSPECTIVAS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL

1. INTRODUÇÃO

Dentre todos os ecossistemas, os ambientes de água doce constituem um dos mais ameaçados do mundo, sendo impactados devido às atividades antropogênicas como contaminação a partir de efluentes domésticos, industriais, hospitalares ou provenientes de atividades agrícolas ou agropecuárias e, ainda outros fatores como construções de barragens e estradas, os quais provocam danos à biota aquática, resultando em perda da biodiversidade e consequentemente, prejuízos à saúde humana (Dudgeon *et al*., 2006; Bashir, 2020). São inúmeras as substâncias químicas que alcançam os ecossistemas aquáticos, seja marinho ou de água doce, incluindo elementos radioativos, solventes industriais, compostos orgânicos voláteis, agroquímicos como fertilizantes, pesticidas, produtos farmacêuticos prescritos ou não para a saúde humana, bem como de uso veterinário, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteroides, metais pesados, nanopartículas, microplásticos, dentre outros (Hampel, 2015).

No Brasil a situação não é diferente, pois estudos vêm demonstrando há décadas a poluição no ambiente aquático por diversos tipos de contaminantes. Uma revisão realizada por Montagner *et al*. (2017), no período de 1997 a 2016, demonstrou a ocorrência de diferentes compostos, designados como compostos de preocupação emergente, que incluem produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, drogas ilícitas, hormônios, adoçantes artificiais, pesticidas, microplásticos dentre outros, os quais foram detectados em matrizes de esgoto, águas superficiais, subterrâneas e potáveis, em concentrações que variam de ng L^{-1} a µg L^{-1}, dependendo da região e do complexo. Em outra análise, Montagner *et al*. (2019) publicaram dados de uma avaliação realizada no período de dez anos no estado de São Paulo, incluindo amostras de águas de esgoto bruto e tratado, águas superficiais, solo e água potável, e registraram 58 compostos

sendo, 9 tipos de hormônios, 14 produtos de cuidados pessoais e farmacêuticos, 8 compostos industriais, 17 tipos de pesticidas e 10 tipos de drogas ilícitas.

Um tema sensível aos pesquisadores quanto a contaminação no ambiente aquático é o potencial genotóxico dos diferentes tipos de contaminantes. A área da ciência que avalia os efeitos genotóxicos de poluentes é a toxicologia genética, a qual analisa os efeitos de agentes físicos ou químicos que causam danos ao DNA e suas consequências para a saúde do organismo. A ecotoxicologia genética (ou ecogenotoxicologia) consiste em uma abordagem em que se aplica os princípios e técnicas da toxicologia genética para avaliar os efeitos da poluição ambiental por agentes genotóxicos que afetam a saúde do ecossistema (Shugart; Theodorakis, 1998).

Os compostos genotóxicos podem ser mutagênicos, ou seja, aqueles que induzem alterações genéticas nos organismos e, portanto, são permanentes e herdáveis, enquanto o termo genotoxicidade (ou toxicidade genética), no sentido mais amplo, inclui mutagenicidade (processo de indução da mutação). Contudo, inclui também danos ao DNA que podem ser reversíveis pelos mecanismos de reparo ao DNA ou outros processos celulares que resultam em morte celular, porém não são herdáveis (WHO, 2020a).

Considerando a biota aquática, os peixes constituem excelentes modelos para avaliação de poluição nestes ambientes, sendo considerados importantes bioindicadores. As substâncias genotóxicas podem causar neoplasias em peixes, redução no crescimento, prejudicar a sobrevivência dos embriões, larvas e adultos e, por consequência, afetar a economia na produção dos peixes como fonte alimentar bem como, a saúde humana, considerando a cadeia alimentar (Bu, 2013).

Ecologicamente, os peixes ocupam uma posição no topo da cadeia alimentar no ambiente aquático, e devido ao fato de possuírem um tempo relativamente longo de ciclo de vida e mobilidade,

constituem bons indicadores dos efeitos a longo prazo e das condições gerais do habitat (Li *et al*., 2010). Os impactos de poluentes químicos sobre a saúde dos peixes têm sido bem documentados há várias décadas em publicações de artigos ou livros. Diferentes tipos de impactos da poluição sobre os peixes foram descritos no livro de Lawrence e Hemingway (2013), *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*; os autores descreveram os efeitos das principais classes de contaminantes (hidrocarbonetos halogenados e não halogenados, metais não-orgânicos e organometais) com abordagens sobre a contaminação em diferentes níveis hierárquicos de organização biológica, ou seja, desde o nível celular, subcelular (alterações em organelas celulares), bioquímicos, genéticos, fisiológicos, estrutura de população e também, quanto aos aspectos socioeconômicos.

Enfim, desde a revolução industrial há mais de 200 anos, a poluição nos ambientes aquáticos tem provocado efeitos letais e subletais em peixes, e em outros organismos aquáticos como invertebrados e até mesmo aves aquáticas, resultando em destruição dos seus habitats (Wells, 2009). A ocupação humana, nas indústrias e agricultura são as principais fontes de poluição da água (Bashir *et al*., 2020) e, portanto, neste capítulo iremos apresentar os principais estudos e metodologias realizados em diferentes espécies de peixes, na avaliação da genotoxicidade de compostos químicos como pesticidas, fármacos, microplásticos e efluentes, que em última análise afetam a saúde dos ecossistemas.

2. AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE EM PEIXES: ASPECTOS ÉTICOS E PRINCIPAIS METODOLOGIAS

O uso de animais (pertencentes ao filo Chordata – Vertebrata) em ensino e pesquisa científica em todo território nacional é regulamentado pela Lei Nº 11.794/2008, a partir da qual foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA (Brasil, 2023). Portanto, qualquer experimentação com animais vertebrados deve seguir os procedimentos regulamentados nesta lei e obedecendo os critérios estabelecidos pelo CONCEA. De acordo com artigo 13º 'qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA para uso de animais, desde que previamente crie o CEUA (*Comissão Ética no Uso de Animais*). Portanto, os projetos de ensino e pesquisa com animais devem ser submetidos previamente ao CEUA da Instituição, e mantidas em um biotério, registrado no CIUCA (C*adastro das Instituições de Uso Científico de Animais)* que possua todas as adequações estabelecidas pelo CONCEA e CEUA, sendo este último o responsável pela análise, emissão de parecer e certificado quanto a experimentação e as condições adequadas do biotério.

As metodologias utilizadas para experimentação, criação e manutenção de peixes devem ser também adequadas às condições laboratoriais conforme Normativas do CONCEA que para peixes, atualmente, é a Normativa Nº 61/2023. De acordo com essa Normativa considera-se peixes de laboratório no Brasil as espécies de lambari (*Astyanax* spp.), tilápia (*Tilapia* spp., *Sarotherodon* spp. e *Oreochromis* spp.) e zebrafish (*Danio rerio*). A seleção dos peixes para experimentação deve obedecer a alguns critérios como disponibilidade da espécie ao longo do ano, fácil manutenção, conveniência para testes, e considerando fatores relevantes como econômicos, biológicos ou ecológicos da espécie ou mais espécies em estudo (OECD, 2019).

No biomonitoramento dos ambientes aquáticos, os peixes estão entre os principais grupos-alvo e a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares ao entrar em contato com contaminantes permite ao pesquisador fornecer dados que subsidiem medidas de prevenção, redução ou mesmo extinção dos impactos da toxicidade sobre esses organismos (Bu, 2013; Meng *et al*., 2023).

A presença de eritrócitos nucleados em peixes teleósteos permite o uso destas células para avaliação de atividade genotóxica de poluentes no ambiente aquático. Os contaminantes presentes na água podem atingir os eritrócitos resultando em anormalidades na morfologia, alterações na membrana plasmática e morfologia do núcleo, cujas alterações são visualizadas em microscopia de luz/óptica ou eletrônica. Uma das alterações frequentemente presentes nos eritrócitos são os micronúcleos, que são avaliados de forma rápida e fácil em lâminas de esfregaço sanguíneo, sendo estas alterações consideradas genotóxicas por meio do Teste de Micronúcleos (MN) como descrito em Schmid (1975). Os micronúcleos são o resultado da perda de cromossomos inteiros (aneugênese) ou, apenas fragmentos desses que não migraram para o núcleo principal após a divisão mitótica, e portanto não são incluídos nos núcleos das células filhas originando assim a formação de um micronúcleo, sendo morfologicamente igual ao núcleo, porém, menores em tamanho que o núcleo principal. A análise do MN em peixes pode ser feita *in vivo* ou *in vitro* e vários tecidos podem ser avaliados como; células do rim cefálico, brânquias, fígado, nadadeira, células embrionárias e eritrócitos, sendo estas últimas células as mais frequentemente utilizadas (Phan *et al*., 2015). A metodologia do MN baseia-se na descrição de Hoffman e Raat (1982) a partir de sangue periférico de uma espécie de peixe, *Umbra pygmaea* e com adaptações, conforme descrito em Silva *et al*. (2023).

Devido a facilidade de aplicação da metodologia inúmeros trabalhos utilizando o Teste do MN aplicado a diferentes espécies de peixes foram publicados, e ainda é muito utilizado por vários

pesquisadores no mundo, incluindo o Brasil. Como exemplo, os efeitos adversos apresentados por diferentes espécies de peixes quando expostos a vários compostos genotóxicos incluindo pesticidas, esgoto doméstico, metais pesados e demais drogas diversas são relatadas em Dar *et al*. (2016). Além do teste do MN, análise dos eritrócitos de peixes fornece também dados sobre anomalias eritrocitárias devido a ocorrência de alterações na morfologia da célula e do núcleo que podem ser quantificadas e classificadas seguindo alguns critérios como descritos por Carrasco *et al*. (1990), complementando com diversas alterações descritas em outros estudos.

Um outro método de genotoxicidade aplicável aos peixes é o Teste de Alterações Cromossômicas (AC). As AC podem ser induzidas por danos aos cromossomos e são evidenciadas como quebras nas cromátides, intervalos nas cromátides (*gaps*), fragmentos acêntricos, regiões extras ou irregulares do cromossomo, pontes cromatídicas ou de cromossomos resultantes de erros durante a divisão celular, após mitose ou meiose (Savage, 1975; Obe *et al*., 2002). Tanto as quebras como os *gaps* podem ocorrer apenas em uma cromátide sendo denominadas de quebras ou *gaps* cromatídicos, ou ainda afetar as duas cromátides sendo designada como quebras ou *gaps* cromossômicos (Savage, 1975).

A obtenção de cromossomos de espécies de peixes pode ser feita a partir de vários tecidos (rim, baço, brânquias, cultura de sangue), sendo o rim (a porção cefálica) um dos mais utilizados, pois contém predominantemente tecido hematopoiético e linfoide, sendo considerado mais vantajoso em termos de quantidade e qualidade de metáfases, conforme metodologia descrita em Bertollo *et al*. (2015). Este procedimento *in vivo* consiste no tratamento prévio dos peixes com uma solução de colchicina, que interrompe as células na fase de metáfase mitótica e após obtenção da suspensão celular, as células são fixadas em lâminas e coradas adequadamente para análise microscópica. Em espécies de peixes de grande porte é possível realizar cultura de linfócitos de forma similar

à cultura de linfócitos humanos, conforme adaptações realizadas por Fenocchio e Bertollo (1988).

Dentre os métodos citogenéticos de genotoxicidade, o teste de Troca de Cromátides Irmãs (SCEs- *Sister Chromatid Exchange*) pode ser também utilizado para detecção de trocas recíprocas de segmentos de DNA entre cromátides irmãs de cromossomos homólogos, a qual pode ser visualizada em metáfases. A detecção pode ser realizada após incorporação do 5-BrDU (bromodeoxiuridina), um análogo da desoxitimidina, em células em divisão e após dois ciclos de divisão celular resultarão em cromátides contendo somente BrdU em ambas as cadeias de DNA e a outra contendo apenas uma das cadeias com BrdU (Bagatini; Maluf, 2011). Como resultado, as metáfases apresentam cromossomos com uma coloração diferencial permitindo visualização de pontos de trocas. Resultados com esta metodologia podem ser visualizados em algumas espécies de peixes (Fenocchio *et al*., 1991; Ulupinar; Okomuş, 2002).

Danos ao DNA podem ser quantificados utilizando-se a metodologia conhecida como Ensaio do Cometa ou SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), desenvolvida por Singh *et al*. (1988) a partir de linfócitos humanos expostos a radiação (raios-X). Este teste tem sido amplamente utilizado na avaliação de genotoxicidade em células de eucariotos, incluindo peixes. Devido a sua praticidade é considerado um teste simples, de baixo custo e de alta sensibilidade na detecção de quebras e reparo no DNA nos diferentes tecidos (Glei *et al*., 2016).

A metodologia do Ensaio do Cometa tem como princípios básicos a eletroforese de células suspensas em uma lâmina para ser analisada em microscópio. As lâminas contendo as amostras (sangue, por exemplo) são cobertas com um fino gel de agarose de baixo ponto de fusão e, posteriormente, lisadas com uma solução detergente para formar nucleoides contendo alças superenroladas de DNA ligadas à matriz nuclear; as amostras são submetidas a

eletroforese (pH elevado) resultando em estruturas semelhantes a 'cauda de cometas', observadas por microscopia de fluorescência, cuja intensidade da cauda em relação à cabeça, reflete a quantidade de quebras no DNA (Collins, 2004). Na versão alcalina, a mais utilizada, quebras nas fitas de DNA e sítios álcalis-lábeis tornam-se aparentes e a migração do DNA indica a quantidade de danos ao DNA nas células (Speit; Hartmann, 1999).

Os danos podem ser visualizados com base no percentual de DNA na cauda (sistema de análise imagem) ou pela extensão da cauda do cometa, classificados de 0-4 sendo dano 0 nenhum dano visível (nucleoide intacto); dano 1 representado por uma cauda curta, menor que o diâmetro do nucleoide; dano 2 comprimento da cauda entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleoide; dano 3 comprimento da cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleoide, e dano 4 tamanho da cauda expressivamente maior que o diâmetro do nucleoide. Um total de 100 nucleoides por amostra são contados, obtendo-se o *score* de danos multiplicando o número de células em cada classe pelo valor do dano (Azqueta *et al*., 2009; Gagné, 2014). Este método tem sido realizado em diferentes espécies de peixes revelando diversos danos quando expostos aos contaminantes químicos no meio aquático (Jiang *et al*., 2023).

A avaliação da genotoxicidade em peixes pode ser complementada com outras análises que auxiliam na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares como respostas à contaminação. Contaminantes das classes pesticidas, fármacos e metais pesados podem atuar como disruptores endócrinos em diferentes espécies de peixes. Análise de expressão de genes como importantes hormônios da via endócrina podem sofrer alterações resultando em disrupção endócrina com alto grau de intersexo, como demonstrado em espécimes machos de *Pimephales promelas* expostos a diferentes concentrações de metformina (Niemuth; Klaper, 2018). Portanto, a avaliação da genotoxicidade no ambiente aquático é um mecanismo fundamental para traduzir em ação o princípio do

desenvolvimento sustentável. Os peixes, por sua vez, são os vertebrados que podem metabolizar, concentrar e armazenar as substâncias genotóxicas associadas, muitas vezes, à mutação genética (mutagênico) e à proliferação de tecidos devido ao seu potencial carcinogênico (Mir *et al*., 2014).

3. CONTAMINANTES EMERGENTES NO AMBIENTE AQUÁTICO E SEU POTENCIAL GENOTÓXICO OU MUTAGÊNICO NOS PEIXES

3.1 PESTICIDAS

Pesticidas, por definição, são compostos químicos utilizados para combater pragas, incluindo insetos, roedores, fungos e plantas indesejadas (ervas daninhas), sendo também utilizados na saúde pública contra vetores de doenças (mosquitos) e na agricultura para eliminar pragas que afetam a produção agrícola (WHO, 2020b). Dentre os pesticidas, destacam-se os agrotóxicos, que embora tenham como alvo eliminar pragas que danificam agricultura, possuem efeitos toxicológicos, com características carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas, as quais devem ser advertidas em suas formulações comerciais, como previstos em legislação brasileira (Villalobos; Fazolli, 2017). A periculosidade desses agentes tóxicos é analisada por três órgãos reguladores: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia os riscos à saúde; o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que analisa riscos ambientais; e o Ministério da Agricultura, que estuda a eficácia desse produto formulado para matar pragas e

doenças no campo, mesmo sendo considerado um produto perigoso na classificação imposta pelo IBAMA.

Dentre os pesticidas, os herbicidas são os mais utilizados no mundo, incluindo o Brasil, e a aplicação intensiva destes compostos em áreas agrícolas constituem uma preocupação ambiental devido ao seu potencial escoamento e lixiviação para o meio aquático contaminado águas superficiais e subterrâneas, resultando em efeitos, direta ou indiretamente nos organismos aquáticos. Os herbicidas inibem a primeira etapa bioquímica dentro das células-alvo. Esta inibição geralmente afeta a atividade de proteínas ou enzimas dentro das células, o que pode desencadear uma série de eventos que levam à morte de células e organismos (Vidal, 1997). Portanto, quando os herbicidas entram em ambientes aquáticos, podem afetar diretamente os organismos do ecossistema (Ribeiro *et al*., 2022).

Um dos herbicidas mais utilizados em todo mundo, principalmente no Brasil, é o glifosato (N-(fosfonometil)glicina) que possui amplo espectro para eliminar ervas daninhas com eficiência e representa cerca de 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (Cattani *et al*., 2017). De acordo com Giesy *et al*. (2000), o glifosato não se degrada rapidamente em água, apenas quando há presença de microflora, onde se decompõe em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e eventualmente se desintegra em dióxido de carbono (Rueppel *et al*., 1977). O glifosato e o AMPA possuem meia-vida na água que varia de 7 a 14 dias em ambientes aquáticos (Giesy *et al*., 2000).

No Brasil, de acordo com a Resolução Nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2023), 65 µg/L de glifosato é o valor máximo permitido para ambientes de água doce, classe I. Alguns autores encontraram valores superiores aos permitidos pelo CONAMA do glifosato em águas brasileiras próximas a locais com cultivos que utilizam o glifosato como herbicida, principalmente nos momentos de aplicação, onde além da água escoada para os rios

com as chuvas, há também dispersão pelo vento quando é feita a pulverização aérea (Mattos *et al*., 2002; Pires, 2015; Mendonça, 2018). Segundo Andrade *et al*. (2024), o herbicida a base de glifosato Templo® induziu anormalidades celulares, nucleares, cromossômicas e de DNA, representando efeitos citotóxicos e genotóxicos em *A. lacustris*, mesmo em concentrações de glifosato abaixo do permitido pela legislação brasileira para ambientes de água doce, classe I. Assim, considerando o uso intensivo de formulações de glifosato nas lavouras, o herbicida Templo® representa um risco potencial de genotoxicidade e citotoxicidade para organismos aquáticos. Estudos de genotoxicidade realizado com espécimes de *Corydoras paleatus* utilizando o herbicida glifosato (comercializado com o nome de Roundup®), na concentração de 6,67 μg/L, correspondente a 3,20 μg/L de glifosato, revelou alta taxa de danos ao DNA avaliados pelo Ensaio do Cometa em células sanguíneas e no fígado dos peixes (Ghisi; Cestari, 2013).

Em se tratando dos efeitos adversos do glifosato e/ou pesticidas em geral, seus danos à saúde humana são também alarmantes. Estudo realizado no Brasil, por meio de uma análise populacional estabeleceu uma associação entre exposição indireta a pesticidas agrícolas e câncer (Skidmore; Sims; Gibbs, 2023). Os autores, utilizando dados, ao nível municipal, de 15 anos de registros de saúde por faixas etárias, e outros fatores, no período de 2004-2019 encontraram um aumento significativo de mortalidade infantil por leucemia linfoide e, em crianças menores de 5 e 10 anos, uma alta frequência de mortes por leucemia linfoblástica aguda, associando estes casos a expansão da produção de soja e uso de pesticidas neste período, em biomas do Cerrado e Amazônia. Ainda, esses autores ressaltaram que com a aprovação dos organismos geneticamente modificados em 2004, houve um aumento no uso de agrotóxicos no Brasil, especialmente o glifosato (o agente ativo do Round-Up), que está ligado ao aumento de resultados adversos para a saúde. Outro estudo recente apontou presença do glifosato em níveis elevados

em mais de 55% das amostras de esperma humano, demonstrando evidências de impactos ao DNA e uma correlação entre os níveis de glifosato e o estresse oxidativo no plasma seminal, um dos fatores mais importantes da infertilidade masculina (Vasseur *et al*. 2024).

Um herbicida amplamente utilizado no Brasil e ainda é muito usado em vários outros países é o paraquat (bipiridil). O paraquat desvia elétrons do fotossistema I, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), o que provoca a morte celular no organismo alvo devido à destruição de ácidos graxos nos tilacóides e em outras membranas (Bromilow, 2004, Albrecht *et al*., 2022). Esse produto é caracterizado por uma ampla capacidade de dispersão, alta solubilidade em água, não seletivo e rápida ação, sendo considerado um pesticida extremamente tóxico. No Brasil seu uso foi proibido pela Anvisa em 2020, porém seus efeitos ainda podem ser observados, pois apresenta meia-vida de aproximadamente seis anos e baixa degradação por microrganismos (Albrecht *et al*., 2022). Pinha (2019), demonstrou que o paraquat induz alterações nucleares em eritrócitos de peixes da espécie *Moenkhausia forestii*, além de promover mudanças comportamentais que aumentam a susceptibilidade à predação por *Hoplias malabaricus*.

Ainda, dentre os pesticidas mais comercializados no mundo, destaca-se a atrazina (2-chloro-4ethylamino-6-isopropylamino-1,3,-5-triazine), um herbicida da classe das triazonas amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas. Pode ser empregado em pré e pós emergência e atua bloqueando a tranferência de elétrons no fotossistema II, levando a morte das plantas invasoras (Gammon *et al*., 2005; Svorc *et al*., 2013). Em razão de apresentar alta estabilidade e aparente mobilidade este herbicida é frequentemente encontrado em solos e águas superficiais especialmente próximo de áreas agricultáveis. De acordo com Almeida (2018), a atrazina provocou alterações em núcleos de eritrócitos de *Astyanax altiparanae* e alterações histopalógicas em brânquias, possivelmente decorrente do estresse oxidativo induzido pelo herbicida.

O herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, conhecido como 2,4-D, é um derivado dos compostos de ácido fenoxiacético classificados como reguladores de crescimento de plantas ou hormônios que funcionam como auxinas sintéticas (Kumari *et al*. 1989; Filkowski *et al*. 2003). As auxinas induzem a biossíntese de etileno e aumentam a síntese de proteínas para estimular a produção de ácido abscísico (ABA), que inibe a divisão celular e o crescimento de tecidos, levando à morte de plantas dicotiledôneas (mas não monocotiledôneas), incluindo formas terrestres e aquáticas (Grossmann, 2003). Como o 2,4-D afeta apenas dicotiledôneas, é amplamente utilizado no controle de ervas daninhas em plantações de trigo, soja, milho, arroz e cana-de-açúcar, bem como em pastagens. Segundo Zafra-Lemos *et al*. (2021a), o herbicida 2,4-D demonstrou efeitos genotóxicos e citotóxicos em *Astyanax lacustris* utilizando como biomarcadores, Teste de Micronúcleos, Alterações Nucleares e Ensaio do Cometa. Neste estudo, complementando as análises citogenotóxicas, como uma alternativa de biomonitoramento ambiental um filtro a base de carvão ativado associado a um biossorvente, a casca de coco verde, foram utilizados para descontaminação da água, demonstrando eficiência de 100% na remoção do 2,4-D, e redução dos efeitos adversos nos peixes.

Os reguladores de crescimento são uma classe de herbicidas utilizados para quebrar a dormência em frutas, e um desses compostos, Dormex®, é utilizado para estimular e padronizar a brotação e floração em espécies de clima temperado. O princípio ativo desse herbicida é a cianamida hidrogenada, um composto orgânico aplicado na agricultura (Soltys *et al*., 2011), que é um eficiente regulador de crescimento vegetal e tem sido utilizado na agricultura em diversas regiões do Brasil, onde é aplicado em doses variando de 0,6 a 7% (registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa, nº 001095), dependendo da cultura. Estudos realizados por Zafra-Lemos *et al*. (2021b) utilizando o herbicida Dormex® em espécimes de *A. lacustris* demonstrou efeitos genotóxicos como diferentes

tipos de alterações cromossômicas, incluindo quebras cromossômicas, fragmentos acêntricos, descondensação, redução do índice mitótico, e ainda alterações nas brânquias como hiperplasia, fusão lamelar e edema, confirmando seu potencial citotóxico nestes peixes.

A importância dos peixes como bioindicadores é destacada no cenário global de crescimento do comércio dessas substâncias, especialmente no aumento da utilização de culturas transgênicas resistentes a pragas. A espécie de peixe, sul-americana, *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), conhecido vulgarmente como lambari, é amplamente distribuída na bacia do alto rio Paraná (Dagosta *et al*., 2024). Esta espécie tem sido considerada um bom bioindicador devido a sua sensibilidade a diversos contaminantes químicos em águas poluídas sendo utilizado para monitorar a qualidade da água (Tincani *et al*., 2019) e avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade dos xenobióticos (Barbosa *et al*., 2010; Zafra-Lemos *et al*., 2021a, b; Silva *et al*. 2023). Em estudos ecogenotoxicológicos em peixes para monitoramento de ambientes aquáticos, as ferramentas que podem detectar e até mesmo quantificar os níveis de alterações no material genético incluem o Ensaio do Cometa, Teste do Micronúcleo (MN), Teste de Alterações Cromossômicas e Alterações Morfológicas Celulares (CMC) em eritrócitos, que indicam alterações fisiológicas.

Desta forma, diferentes tipos de pesticidas têm demonstrado induzir anormalidades celulares, nucleares, cromossômicas e de DNA, representando efeitos citotóxicos e genotóxicos em peixes. Assim, considerando o uso intensivo de diferentes formulações de herbicidas nas lavouras, eles representam um risco potencial de genotoxicidade e citotoxicidade para organismos aquáticos, mesmo em concentrações abaixo do permitido pela legislação brasileira para ambientes de água doce. Portanto, as agências de proteção ambiental devem rever as regulamentações para pesticidas, e especialmente herbicidas em ambientes de água doce.

3.2 FÁRMACOS

Os fármacos são compostos químicos desenvolvidos para exercer atividade biológica em doses extremamente baixas, com o objetivo de prevenir, tratar ou aliviar sintomas de doenças em humanos e animais. Estes compostos, muitas vezes considerados 'novos poluentes', representam preocupações ambientais devido à sua descarga nos ecossistemas, onde sofrem degradação em subprodutos potencialmente mais tóxicos (Ukic *et al*., 2019).

Os ambientes aquáticos são particularmente sujeitos à contaminação por fármacos devido à maneira como esses compostos entram e se acumulam nos ecossistemas. A eliminação inadequada de medicamentos, a excreção humana e animal e os efluentes das estações de tratamento de esgoto contribuem significativamente para a presença de resíduos farmacêuticos nas águas superficiais e subterrâneas (Khan; Barros, 2023). A natureza dinâmica dos ambientes aquáticos facilita a disseminação dos poluentes, ampliando seu impacto e tornando a mitigação um desafio constante. Além disso, eventos climáticos extremos e alterações nos padrões de precipitação, agravados pelas mudanças climáticas, podem aumentar a mobilidade e a concentração desses poluentes, exacerbando ainda mais os riscos para os ecossistemas aquáticos e a saúde pública (Hung *et al*., 2022; Zihan *et al*., 2022).

Os compostos farmacêuticos, que incluem antibióticos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), medicamentos psicoativos, estimulantes e betabloqueadores, são regularmente encontrados em corpos d'água ao redor do mundo. Um amplo estudo de monitoramento global, abrangendo todos os continentes, foi conduzido em 258 rios, analisando 61 compostos farmacêuticos. Entre eles, carbamazepina, metformina e cafeína foram os mais frequentes, e os contaminantes com as maiores concentrações foram paracetamol, cafeína, metformina, fexofenadina, sulfametoxazol, metronidazol

e gabapentina. Em cerca de um quarto dos locais monitorados (25,7%), as concentrações desses compostos ultrapassaram os limites seguros para organismos aquáticos, representando uma ameaça significativa para a saúde ambiental, humana e aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (ODS) (Wilkinson *et al*., 2022).

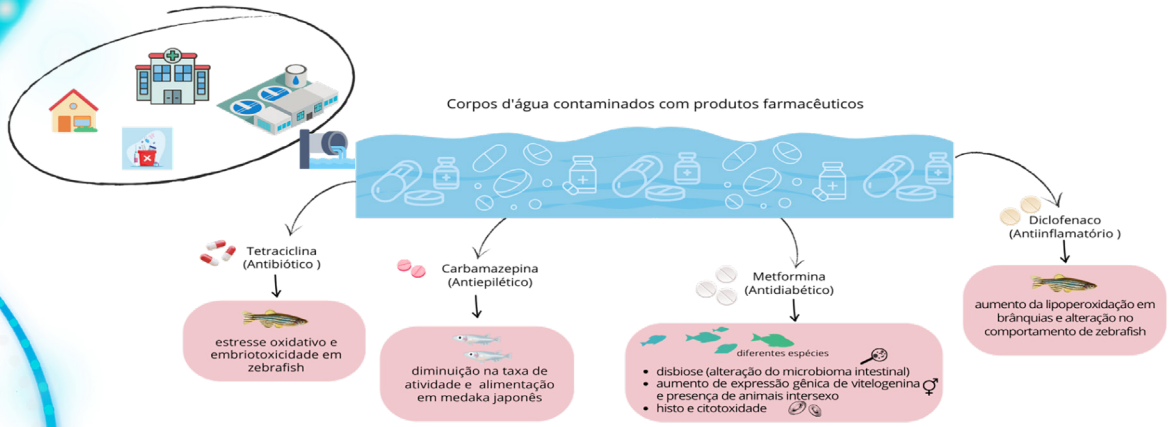
A presença de fármacos na água pode ter impactos significativos na biodiversidade dos ecossistemas aquáticos (Néstor; Mariana, 2017). Esses compostos, muitas vezes resistentes à degradação, podem persistir no ambiente por longos períodos. Os níveis e frequências crescentes em que os ingredientes farmacêuticos ativos estão sendo detectados no meio ambiente são motivo de preocupação significativa, especialmente considerando os potenciais efeitos adversos que podem ter em espécies não-alvo, como os peixes. Os peixes são particularmente vulneráveis à poluição aquática devido à exposição contínua a água contaminada, permeabilidade das brânquias e capacidade de bioacumulação (Muir *et al*., 2017; Biswas *et al*., 2021).

Diversos fatores, intrínsecos (ligados aos peixes) e extrínsecos (relacionados ao ambiente), afetam a resposta dos peixes aos fármacos. A susceptibilidade desses animais aos contaminantes varia conforme a espécie, estágio de vida, processos fisiológicos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além de condições ambientais como temperatura, pH, concentração e características moleculares dos compostos farmacêuticos (Matthee *et al*., 2023).

Existem inúmeros estudos que investigaram os efeitos dos fármacos em peixes em diferentes contextos e ambientes. Por exemplo, estudos têm mostrado que a presença de antidepressivos na água pode afetar o comportamento e a fisiologia de peixes, levando a alterações na atividade locomotora e no consumo de alimentos (Moreira *et al*., 2022). A poluição por metanfetamina, em concentrações ambientalmente relevantes, induz a dependência e

altera o comportamento em trutas marrons (Horký *et al*., 2021). O antidiabético metformina pode impactar vários aspectos da biologia dos peixes, incluindo comportamento, composição do microbioma intestinal, desenvolvimento embrionário, sobrevivência, crescimento, reprodução, histologia e integridade celular (Maclaren *et al*., 2018; Rogall *et al*., 2020; Ambrósio-Albuquerque *et al*., 2021; Barbieri *et al*., 2022; Barbieri *et al*., 2024). Outros estudos têm demonstrado que contaminantes farmacêuticos como carbamazepina, progesterona, fluoxetina, diclofenaco, sulfonamidas e tetraciclina podem perturbar vários processos bioquímicos em peixes, incluindo transporte de membrana, marcadores de estresse oxidativo e alterações endócrinas (Nassef *et al*., 2010). O resumo gráfico (Figura 01) representa os efeitos adversos de alguns fármacos em peixes.

Figura 01. Efeitos de alguns produtos farmacêuticos em peixes a partir da contaminação de corpos d'água



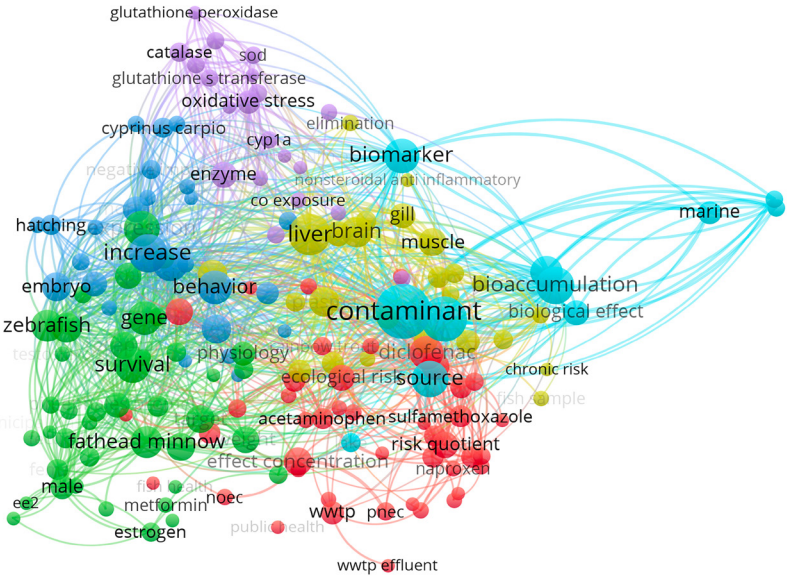
Fonte: Os autores.

Nos últimos anos, o interesse científico em pesquisas sobre os efeitos adversos de fármacos em peixes tem crescido substancialmente, refletindo a preocupação crescente com a saúde dos ecossistemas aquáticos e o papel fundamental dos peixes como bioindicadores da qualidade da água. Um levantamento realizado na base de dados Scopus entre 2004 e 2013 revelou que, ao utilizar

a 'string' de busca (TITLE-ABS-KEY (pharmaceuticals) AND TITLE-ABS-KEY (fish) AND ALL (adverse AND effects) OR ALL (negative AND impact)) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA, 'ENVI')) AND (LIMIT-TO (EXACT KEY WORD, 'Fish')), foram encontrados 55 artigos. Essa quantidade aumentou significativamente para 241 artigos na década seguinte, de 2014 a 2024. Notavelmente, entre 2020 e junho de 2024, o número de publicações superou o total da década anterior, atingindo 126 resultados, indicando um aumento na intensidade das pesquisas nessa área. Esse crescimento pode ser atribuído a diversos fatores, incluindo avanços nas técnicas de detecção, uma maior conscientização sobre os impactos ambientais dos fármacos e preocupações amplificadas pela pandemia de COVID-19.

Dados desse levantamento bibliográfico foram extraídos através do software VOS viewer, com método de contagem binária de ocorrência de palavras-chave (Figura 02) para representar visualmente as relações entre elas. O número mínimo de ocorrências de um termo foi definido como 5, assegurando que apenas termos significativamente frequentes fossem considerados. Após a remoção manual de palavras-chave irrelevantes, 168 foram usadas para análise de visualização de rede e sobreposição. A rede resultante formou 6 grandes *clusters*. A espessura das linhas entre as palavras indica a força do relacionamento, enquanto os *clusters* coloridos mostram a frequência com que as palavras-chave aparecem juntas nas mesmas publicações.

Figura 02. Uma representação visual das palavras-chave coocorrentes nos artigos examinados, realizada com o software VOS viewer



Fonte: Os autores.

A crescente produção científica destaca a urgência de abordar os efeitos dos fármacos no ambiente aquático, ressaltando a importância de políticas e estratégias eficazes para proteger os ecossistemas e a saúde pública. A análise dos efeitos adversos de diversos fármacos em peixes revela a diversidade e complexidade desses impactos, desde alterações reprodutivas até efeitos fisiológicos e genéticos. Isso enfatiza a necessidade de regulamentações mais rigorosas e estratégias de mitigação para preservar a saúde dos ecossistemas aquáticos.

3.3 MICROPLÁSTICO

O plástico é um material multifuncional, empregado em diversos setores, principalmente pelo seu baixo custo, versatilidade e ampla durabilidade (Geyer *et al*., 2017). Estima-se que somente em 2022 a produção global de materiais plásticos atingiu 400,3 milhões de toneladas (Plastics europe, 2023), corroborando a grande dependência da sociedade atual em relação a esses polímeros. Produzido a partir da polimerização e policondensação de longas cadeias de compostos como celulose, gás natural, sal, carvão e o petróleo, principalmente nafta, pode ser encontrado de várias formas como polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD), polipropileno (PP), policloreto de vinila (PVC), tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PUR), poliestireno (PS) e outros (Gesamp, 2015; Pompêo *et al*., 2022).

Contudo, a grande questão acerca dos plásticos é a falta ou mal gerenciamento dos resíduos gerados pela sua produção e consumo. Segundo a OECD (2022), somente 9% dos materiais plásticos são reciclados, 50% são encaminhados para aterros sanitários, 19% são incinerados, e 22% não possuem gerenciamento, sendo descartados em 'lixões a céu aberto', não controlados, alcançando diferentes ecossistemas, como o aquático.

Nos últimos anos, maior atenção vem sendo dada a ação dos intemperismos físicos, químicos e biológicos durante o processo de degradação, os quais transformam esses materiais em macroplásticos, partículas com tamanhos > 25 mm, mesoplásticos entre 5 e 25 mm e principalmente, em microplásticos < 5 mm e nanoplásticos < 100 nm (Pompêo *et al*., 2022). Essas partículas são consideradas de origem secundária, pois advém da fragmentação de plásticos maiores. Todavia existem os microplásticos (MPs) de origem primária, por exemplo, as microesferas, que são produzidas para produtos de higiene pessoal, como creme dental, sabonetes ou cremes

esfoliantes e cosméticos em geral (Hernandez *et al*., 2017). Estima-se que, em 2019, aproximadamente 22 milhões de toneladas de materiais plásticos escaparam para o ambiente e 12% deste total foram de MPs oriundos de fontes difusas, lavagens têxteis, abrasão de pneus e outros. Neste mesmo ano, presume-se que 6,1 milhões de toneladas de plásticos alcançaram rios, lagos e oceanos (OECD, 2022).

Os dados da poluição plástica são alarmantes, por esse motivo, em 2022 o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP), convocou um Comitê Intergovernamental de Negociação (INC) para elaborar um instrumento que abordasse todo o ciclo do plástico, inclusive o descarte. Recentemente, ocorreu o quarto encontro em Ottawa no Canadá para desenvolver o Tratado Global dos Plásticos. Há uma previsão de término em Busan na Coreia do Sul, onde acontecerá a última reunião para finalização deste tratado, no final de 2024. Entre as pautas do Tratado estão, reduzir as fugas de plásticos para o ambiente em 96%, diminuir a produção de plástico primário em 14%, restringir a produção de embalagens de curta duração em 21%, e aumentar a reutilização e reciclagem dos polímeros até 2040, se for aprovado (UNEP, 2024). Essa iniciativa do UNEP é muito importante para controlar a poluição plástica, pois esta questão é um problema mundial e necessita de alternativas sustentáveis para reduzir os impactos causados por este material.

Nesse cenário, atenção especial vem sendo dada aos MPs, considerados um poluente emergente (Lucio *et al*., 2019; Sun *et al*., 2021). PE e PP foram identificadas em amostras de sal de cozinha e açúcar comercial no Irã (Makhdoumi *et al*., 2023). PET, PA, PVC e PE foram encontradas em artérias coronárias, carótidas e aórticas humanas (Liu *et al*., 2024). Na República Tcheca, PE clorados com tamanho entre 10 e 50 µm e aditivos foram observados no líquido amniótico e placenta de gestantes (Halfar *et al*., 2023).

Todavia, os corpos hídricos são os mais impactados por esses poluentes, devido a forma como podem alcançar o ambiente aquático.

Queiroz *et al*. (2024), encontraram altas concentrações desse poluente no reservatório Billings, utilizado para abastecimento público da região metropolitana de São Paulo. Santana et al. (2016), observaram que 75% das amostras de mexilhões do estuário de Santos estavam contaminadas por esses materiais. Da mesma forma, Aguirre-Sanchez *et al*. (2024), encontraram partículas plásticas nos sedimentos e em animais comestíveis como caranguejos (*U. occidentalis*) e arcas negras (*A. tuberculosa*) no mangue peruano.

Nesta perspectiva, os peixes, animais de interesse econômico e ambiental estão entre os organismos mais susceptíveis a contaminação por MPs. Em um estudo realizado na região amazônica foram observadas partículas plásticas em 29 espécies de peixes dentro de uma reserva biológica, sendo as fibras sintéticas o tipo predominante (Costa *et al*., 2023). Tilápias (*Oreochromis niloticus*) coletadas no Rio Nilo em Cartum, no Sudão, apresentaram 100% de indivíduos contaminados com MPs (Saad e Alamin, 2024). Na Nigéria, o Rio Osun foi identificado com o nível mais alto de partículas plásticas em águas doce já reportadas no mundo. Esses materiais foram encontrados também nos sedimentos e em seis diferentes espécies de peixes utilizados para consumo (Idowu *et al*., 2024). Clere *et al*. (2022) realizaram a captura de 155 peixes nativos comerciais do Sul da Nova Zelândia, cerca de 75% dos animais continham PE, PP e viscose. Srisiri *et al*. (2024), analisaram peixes marinhos comestíveis no Golfo da Tailândia e observaram que 46,9% das amostras possuíam PE e poliéster no trato gastrointestinal, sendo que os peixes demersais apresentaram maior quantidade de MPs em relação aos pelágicos. No Lago Loktak, região indiana do Himalaia, foi observado que mais de 90% das oito espécies de peixes analisadas no estudo estavam contaminadas com fragmentos plásticos (Borah *et al*., 2024).

Esses estudos demonstram a dispersão de partículas plásticas por todo o globo e não existe mais ambiente em que esses xenobióticos não são encontrados. Contudo, em razão da dificuldade e recente interesse na investigação da ação desse tipo de poluente,

os estudos enfatizam, principalmente, a presença/disponibilidade de materiais plásticos nos organismos e pouco se conhece ainda, sobre os efeitos biológicos deste poluente. Além disso, os trabalhos que visam conhecer esses efeitos, por meio de parâmetros bioquímicos, histológicos, desenvolvimento e genéticos, são baseados especialmente em experimentos de exposição intencional em laboratório.

Estudos realizados por Zitouni *et al*. (2021), demonstraram que MPs causaram um aumento significativo nas atividades de GST (glutationa s-transferase), SOD (superóxido desmutase) e TBARS (ácido tiobarbitúrico) em brânquias e intestino de Robalo juvenil (*Dicentrarchus labrax*) exposto a mistura de MPs ambientais. Essas partículas plásticas se acumularam em brânquias, intestino e fígado com aumento de MPs nos tecidos de acordo com a ampliação do tempo de exposição. Em *Oryzias melastigma* (medaka) também foram observadas alterações bioquímicas e histológicas após exposição crônica a micropartículas PS, como, atraso na maturação das gônadas e redução da fecundidade das fêmeas a da atividade da SOD no ovário. Além disso, promoveram aumento dos níveis de MDA (malondialdeído) no intestino, fígado, brânquias e testículos de machos. Disrupção endócrina também foi observada, como diminuição de estradiol e testosterona em fêmeas e seu aumento em machos. Em nível tecidual foi observado abscisão, encurtamento e espessamento nas lamelas branquiais, além do relaxamento dos filamentos branquiais (Wang *et al*., 2019).

Ctenopharyngodon idella (carpas capim), expostas a MPs de 0,5μm e 15μm apresentaram uma diminuição considerável de crescimento, possivelmente pelas graves alterações intestinais, enquanto as partículas menores induziram a congestão hepática e estresse oxidativo. Além disso, a microbiota intestinal foi fortemente alterada após interação com as micropartículas. Após o período de depuração foi observada uma tendência de recuperação da atividade de enzimas como SOD e MDA no fígado, porém a proporção de bactérias patogênicas no intestino permaneceu alta (Hao *et al*., 2023). Ademais,

características comportamentais também podem ser utilizadas para a investigação do efeito de xenobióticos em peixes. Li *et al*. (2024), observaram que ciclídeos juvenis (*Chindongo demasoni*) com maior velocidade ou posição frontal de natação tiveram maior probabilidade de ingerir maiores quantidades de micropartículas plásticas.

As partículas plásticas podem absorver outros compostos químicos, como agroquímicos, resíduos de fármacos, efluentes, entre outros, a sua superfície, potencializando a toxicidade desse contaminante. Mancia *et al*. (2023), constaram que MPs sorvidos com poluentes ambientais presentes na água do mar promoveram modificações no microbioma intestinal, hiperinflamação das brânquias e alterações complexas no comportamento de peixes zebrafish (*Danio rerio*) maiores que as partículas de MPs isoladas.

Nesse sentido, normalmente os efeitos em nível de DNA são observados quando da associação de MPs com outros poluentes, já que isolados as partículas plásticas são considerados normalmente inertes. Para avaliar o efeito genotóxico, Araújo *et al*. (2022) avaliaram MPs-PE isoladas e associadas a um mix de poluentes, em zebrafish (*Danio rerio*) e verificaram aumento de aproximadamente 64% no índice de danos ao DNA, pelo Ensaio do Cometa. A mutagenicidade foi investigada pelo Teste do Micronúcleo, mas, não foram observados MN, no entanto, várias anormalidades nucleares eritrocitárias, como núcleo entalhado, em formato de rim, núcleo multilobulado, entre outros, foram identificados. Além disso, alterações metabólicas em diferentes tecidos, como cérebro, músculo, fígado e em brânquias foram verificadas. Dessa maneira, ressalta-se a importância da utilização de diferentes tecidos para compreender os mecanismos de ação de poluentes emergentes, como os MPs. Ainda, reitera-se a necessidade de estudos que investiguem os efeitos, sejam isolados ou associados de MPs, em organismos aquáticos como peixes, já que são organismos extremamente importantes, compondo diferentes níveis tróficos dentro dos ecossistemas aquáticos. Além disso, esses animais estão em contato permanente com os MPs, levando a acumulação no trato gastrointestinal, brânquias, fígado, cérebro, músculo e outros órgãos.

3.4 CONTAMINAÇÃO A PARTIR DE EFLUENTES

O crescimento da população mundial tem como consequência o aumento do consumo de energia, alimentos, produtos químicos, entre outros, o que desencadeia o processo de industrialização a novos patamares. Contudo, todo esse crescimento conduz a geração de grandes quantidades de águas residuais, proveniente do uso excessivo e por muitas vezes impróprio, das águas para fins industriais (Abdullahi *et al*., 2024). Setores da indústria petroquímica, têxtil, galvanoplastia, farmacêutica e alimentícia produzem milhões de toneladas de águas residuais todos os anos (Han *et al*., 2023) e em quantidades crescentes.

Os efluentes industriais apresentam qualidade e volume muito variáveis, de acordo com o tipo de indústria que os produz, com a região e com o nível de desenvolvimento do país em que são produzidos. Assim, os efluentes industriais podem ser altamente biodegradáveis ou não, apresentar compostos recalcitrantes ou não, conter metais pesados, substâncias orgânicas, sintéticas, as quais vêm aumentando em quantidade e variedade, entre outros (Zamora-Ledezma *et al*., 2021). Ainda que sejam estabelecidos padrões de gestão de lançamento de efluentes em corpos hídricos ou estações de tratamento (EPA, 2024), muitas vezes o tratamento não é efetivo ou não acontece corretamente, levando a mudanças nos parâmetros físico-químicos. Existem ainda situações em que não acontecem alterações nesses parâmetros, no entanto, os efeitos de ecotoxicidade de base biológica não são considerados, pois sequer existem, já que a maioria das legislações se preocupa exclusivamente com os padrões físico e químicos. Segundo Kumar e Han (2010), mesmo em concentrações abaixo dos limites regulamentares estabelecidos, os poluentes individuais podem ter efeitos interativos importantes, reforçando a necessidade dos ensaios de toxicidade aquática.

Por esse motivo, a avaliação da ecotoxicidade dos efluentes industriais sobre organismos aquáticos, como peixes, tem sido objeto de estudo, com o intuito de identificar com precisão a toxicidade das águas residuais e assim compreender os impactos desses contaminantes nos ecossistemas aquáticos. Claramente a sensibilidade dos peixes aos efluentes industriais varia de acordo com diversos fatores tais como espécie, idade, tamanho, estágio de desenvolvimento e condições ambientais. Além disso, a combinação de diferentes substâncias químicas presentes nas águas residuais pode resultar em efeitos sinérgicos ou aditivos, aumentando ainda mais a toxicidade.

Em 2013, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (236) adotou o teste de toxicidade embrionária de peixe (FET) usando zebrafish (*Danio rerio*) para investigar a toxicidade aguda de amostras ambientais como as águas residuais. Através desse ensaio, Hashiguchi *et al*. (2021), observaram que os efluentes de uma indústria de óleo de palma induziram a letalidade em embriões de zebras. Além disso, verificaram que após a adoção de novas metodologias de tratamento o efluente atendeu ao padrão de lançamento, no entanto, ainda assim, apresentou efeito tóxico sobre os embriões. Esses dados reforçam a necessidade da utilização conjunta de análises químicas convencionais e ensaios de ecotoxicidade como FET. Em outro estudo, De Arruda Leite *et al*. (2024), verificaram que corantes vermelhos usados pela indústria têxtil provocaram alterações comportamentais em embriões de zebrafish e modificações oculares, assim, a possibilidade de afetar os olhos no estágio inicial de desenvolvimento é de grande preocupação ambiental e do ponto de vista da saúde humana. Nesse sentido, a toxicidade evidenciada em peixes pode sugerir a possibilidade de que os poluentes tenham potencial toxicológico também para os seres humanos.

Zebrafish é um modelo biológico relevante para estudos de toxicologia, já que tem sua genética, fisiologia e o desenvolvimento bem conhecidos. Somado a isso, os avanços na genômica e genética dessa espécie fornecem ferramentas importantes para o estudo

de mecanismos moleculares de toxicidade que podem ser investigados através dos perfis de expressão gênica (Hajam *et al*., 2021). Okeke *et al*. (2023), demonstraram que éter bis (2-hidroxietil) TBBPA (TBBPA-DHEE) utilizado na fabricação de tereftalato de polibutileno, policarbonato, resinas epóxi, poliésteres termoplásticos, entre outros, promove alterações no perfil transcriptômico de *Danio rerio*, agindo como um desregulador neuroendócrino, resultando na perturbação do ciclo celular.

Organismos modelo, como zebrafish são muito empregados e recomendados pelas agências internacionais, mas é importante lembrar que espécies endêmicas são extremamente importantes na avaliação da ecotoxicidade de ambientes aquáticos, pois refletem com maior precisão a ação e o impacto de agentes potencialmente tóxicos em populações e comunidades presentes nesse ecossistema. Silva *et al*. (2023), ao constatarem que efluentes da indústria têxtil apresentaram atividade citotóxica e genotóxica antes e mesmo após tratamento por biorremediação, mostraram que *Astyanax lacustris* é um bom bioindicador e que micronúcleos (MN) e alterações morfológicas celulares são biomarcadores eficientes para a investigação do efeito de águas residuais. Através do Teste do Micronúcleo e histopatologia de brânquias, Magnoni *et al*. (2023), verificaram que efluentes provenientes de uma indústria de anodização de alumínio promoveram alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* e alterações histopatológicas em brânquias. Os autores também destacam a importância da utilização de espécies nativas para o monitoramento ambiental, já que apresentam relevância ecológica na dinâmica da cadeia trófica, ciclo de nutrientes e transferência de energia. Buzo (2018), utilizou as espécies neotropicais *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae* como bioindicadores para avaliar o efeito de AgNPs (nanopartículas de prata), as quais estão amplamente presentes em efluentes diversos. No estudo, as duas espécies apresentaram alterações nucleares eritrocitárias além de alterações morfohistológicas.

O uso de espécies nativas é amplamente discutido na literatura, as quais podem ser obtidas a partir de criadores autorizados ou ainda capturados *in situ.* Corredor-Santamaría *et al*. (2019), coletaram duas espécies de ocorrência no Rio Ocoa, na Colômbia, que recebe grandes descargas de efluentes e verificaram que existem diferenças em relação a sensibilidade frente aos poluentes presentes na água. De acordo com o estudo, *Aequidens metae* mostrou maior sensibilidade, aumento da peroxidação lipídica e alterações histopatológicas, quando comparado a *Astyanax gr. bimaculatus.* Contudo, essas diferenças podem estar relacionadas ao comportamento desses peixes, sendo o primeiro um bentônico e detritívoro e o segundo um omnívoro. Portanto, ao empregar espécies autóctones, é fundamental que se tenha conhecimento de suas preferências alimentares e de sua distribuição nos ecossistemas aquáticos, uma vez que a resposta à exposição a poluentes pode variar conforme tais atributos.

Estudos de longa duração não são frequentes na literatura, contudo, se mostram interessantes para conhecer os impactos de xenobióticos ao longo da vida. Liney *et al*. (2006), expuseram peixes da espécie *Rutilis rutilis* durante 300 dias a efluentes de estação de tratamento de águas residuais. Como resultado, foi observada a feminização de machos, alteração histológica das gônadas, no desenvolvimento renal, na função imune e genotoxicidade, indução de micronúcleos e lesões no DNA. A genotoxicidade e a imunotoxicidade foram verificadas em concentrações mais baixas do que àquelas que promoveram mudanças endócrinas, por essa razão, é possível que esses marcadores sejam mais sensíveis a determinados efluentes do que os marcadores endócrinos.

A investigação do potencial mutagênico de águas residuais em organismos aquáticos não é recente, Gauthier *et al*. (1993), demonstraram que sistemas de testes *in vivo*, como o Teste do Micronúcleo, foram mais relevantes para compreender os efeitos em eucariontes do que ensaios bacterianos, e são adequados para avaliar o impacto real das genotoxinas liberadas em corpos hídricos.

Uma abordagem diferente que também permite a investigação dos efeitos ecotoxicológicos em eucariotos em substituição ao uso de animais ou ainda em combinação, é a utilização de testes com culturas de células de peixes. As linhagens celulares têm sido aplicadas como uma ferramenta *in vitro* rápida e econômica para triagem de toxicidade de produtos químicos e amostras ambientais, como dos efluentes industriais. Cultivos celulares de peixes foram adotados como uma ferramenta *in vitro* para avaliação ecotoxicológica por muitas agências regulatórias internacionais, como REACH (Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos) Europa e a FDA (*Food and Drug Administration*) nos EUA (Goswami *et al*., 2022). Nos Estados Unidos, por exemplo, as instalações de águas residuais que descarregam efluentes tratados ou não tratados em águas superficiais, estão sujeitas a testes de toxicidade de efluentes totais (WET). WET são testes de biomonitoramento que utilizam amostras vivas de laboratório para medir os efeitos de potenciais tóxicos nas populações nativas da vida aquática (EPA, 2023). O teste WET agudo mede a mortalidade (CL 50%) de animais após 48 e 96 horas de exposição ao efluente. Scott *et al*. (2021), demonstraram que as células RTgill-W1 têm potencial como um modelo alternativo *in vitro* para prever a toxicidade aguda associada ao teste WET, pois foi observada semelhança entre os resultados de EC50 *in vitro* com LC50 *in vivo.*

Um estudo realizado com linhagem de células do fígado de zebrafish (ZF-L) demonstrou aumento na frequência de alterações cromossômicas e estresse oxidativo quando foram expostas a produtos da indústria petrolífera. De acordo com os autores, os resultados mostraram que a combinação de diferentes ensaios *in vitro* é importante para uma avaliação confiável da genotoxicidade, já que nessa situação os danos ao DNA não apresentaram correlação com o estresse oxidativo (Johann *et al*., 2020). Importante ressaltar que, ainda que diferentes ensaios *in vitro* sejam realizados, estes não substituem por completo a experimentação *in vivo*, dada a complexa resposta, molecular, celular e fisiológica que ocorre em um organismo vivo.

Em conformidade com o exposto é importante destacar que os peixes desempenham um papel fundamental como bioindicadores da qualidade ambiental, uma vez que são organismos amplamente distribuídos nos ecossistemas aquáticos e estão intimamente ligados aos processos de bioacumulação e biomagnificação de contaminantes. Portanto, estudos que visam avaliar a ecotoxicidade e a ecogenotoxicidade dos efluentes industriais sobre os peixes, não apenas fornecem informações essenciais para a gestão e monitoramento ambiental, mas também contribuem para o desenvolvimento de estratégias de mitigação e controle da poluição aquática.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

A contaminação do ambiente aquático por centenas de compostos químicos provenientes de atividades da indústria e domésticas, de compostos orgânicos, metais pesados, dentre outros, tem se mostrado muito prejudicial não somente para a biota aquática, mas, com implicações nocivas à saúde humana. Manter a qualidade da água para o consumo humano é uma preocupação constante dos cientistas, mas, importante ressaltar também, que a perda da biodiversidade nesses ambientes pode prejudicar o funcionamento dos ecossistemas interligados à manutenção da vida em nosso planeta. Assim, o conhecimento sobre as respostas biológicas frente a toxicidade em geral dos poluentes em organismos aquáticos como os peixes, é de extrema importância, considerando sua posição na cadeia alimentar como fonte de proteína para muitas populações no mundo.

As diferentes metodologias utilizadas na avaliação de genotoxicidade em peixes têm contribuído para um maior conhecimento sobre as respostas destes animais, cujos estudos incluem diferentes espécies, as quais podem ser validadas como bioindicadores. No Brasil, a utilização de espécies modelo como bioindicadores incluem

estudos não somente com o zebrafish (*Danio rerio*), mas com espécies nativas ou não da região neotropical como exemplos *Astyanax* spp., *Oreocrhomis niloticus*, *Geophagus brasiliensis*, *Rhamdia quellen*, *Prochilodus lineatus*, dentre outras. Neste sentido, algumas alternativas têm sido apresentadas para mitigar os impactos da poluição no meio aquático como a bioprospecção no monitoramento ambiental, utilizando microrganismos biorremediadores ou por meio do uso de materiais biossorventes como uma tecnologia de baixo custo na descontaminação da água, conforme descrito em outros capítulos neste livro.

Assim, o conhecimento adquirido sobre os efeitos adversos das diferentes classes de contaminantes no meio aquático, a detecção precoce, a avaliação de concentrações nocivas dos contaminantes em estudo e seu potencial genotóxico, mutagênico ou carcinogênico que podem afetar o sucesso reprodutivo das populações, constituem importantes estratégias no monitoramento ambiental. Ainda, os diferentes testes de genotoxicidade e suas aplicações no monitoramento serão úteis para a formulação de soluções a longo prazo e elaboração de legislações adequadas para níveis seguros quanto a presença de poluentes na água, não somente para consumo humano, mas na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas contribuindo para fomentar projetos visando a conservação da biodiversidade.

5. REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, S. S.; MOHAMMAD, R. E. A.; JAGABA, A. H.; MUSA, H.; BIRNIWA, A. H. Natural, synthetic, and composite materials for industrial effluents treatment: a mini review on current practices, cost-effectiveness, and sustainability. **Chemical and Environmental Engineering**, v. 9, p. 100570, 2024.

AGUIRRE-SANCHEZ, A.; PURCA, S.; COLE, M.; INDACOCHEA, A. G.; LINDEQUE, P. K. Prevalence of microplastics in Peruvian mangrove sediments and edible mangrove species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 200, p. 116075, 2024.

SUMÁRIO

ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; SILVA, A. F. M. Agronomic implications of paraquat ban in Brazil. **Advances in Weed Science**, v. 40, n. 1, p. e020220040, 2022.

ALMEIDA, A. C. C. de; **Efeitos da Exposição ao Herbicida Atrazina Degradado por Fotocatálise e dos seus Metabólitos: Análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

AMBROSIO-ALBUQUERQUE E. P.; CUSIOLI L. F.; BERGAMASCO R.; GIGLIOLLI A. A. S; LUPEPSA L.; BRENNDA R. P.; BARBIERI P. A.; BORIN-CARVALHO L. A.; PORTELA-CASTRO A. L. B. Metformin environmental exposure: a systematic review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.83, p. 103588, 2021.

ANDRADE, C. O.; SILVA, J. R. R.; BARBIERI, P. A.; BORIN-CARVALHO, L. A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; FERNANDES, C. A. The effect of acute exposure of yellowtail tetra fish *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) to the glyphosate-based herbicide Templo®. **Mutation Research – Genetic Toxicology. Environmental Mutagenesis**, v. 897, p. 503771, 2024.

ARAÚJO, A. P. C.; LUZ, T. M.; ROCHA, T. L.; AHMED, M. A. I.; SILVA, D. M.; RAHMAN, M. M.; MALAFAIA, G. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox unbalance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128691, 2022.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research**, v. 674, p. 1018, 2009.

BAGATINI, P. B.; MALUF, S. W. Troca entre cromátides-irmãs. *In*: MALUF, S. W; RIEGEL, M. e colaboradores. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 178-190.

BARBIERI, P. A.; MARI-RIBEIRO, I. P.; LUPEPSA, L.; GIGLIOLLI, A. A. S; PAUPITZ, B. R.; DE MELO, R. F.; DE SOUZA LEITE MELLO, E. V.; DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L.; BORIN-CARVALHO, L. A. Metformin-induced alterations in gills of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) detected by histological and scanning electron microscopy. **Ecotoxicology**, v.31, n. 8, p. 1205-1216, 2022.

BARBIERI, P. A; LUPEPSA, L.; PAUPITZ, B. R.; ANDRADE, C. O.; GIGLIOLLI, A. A. S; PORTELA-CASTRO, A. L.B.; RIBEIRO, R. P.; FERNANDES, C. A.; BORIN-CARVALHO, L. A. Erythrocyte alterations in specimens of *Danio rerio* caused by exposure to metformin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 106, p. 104373, 2024.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F. BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320-325, 2010.

BASHIR I.; LONE F. A.; BHAT R. A.; MIR A. S.; DAR Z. A., DAR S. A. Concerns and threats of contamination on aquatic ecosystems. **Bioremediation and Biotechnology**, p. 1-26, 2020.

BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. *In*: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L. F. (org.) **Fish Cytogenetic Techniques, Ray-Fin Fishes and Chondrichthyan**. CRC Press, 2015. p. 21-26.

BISWAS, C.; MAITY, S.; ADHIKARI, M.; CHATTERJEE, A.; GUCHHAIT, R.; PRAMANICK, K. Pharmaceuticals in the aquatic environment and their endocrine disruptive effects in fish. *In* **Proceedings of the Zoological Society.** India: Springer, 2021. p. 1-16.

BORAH, P.; KSHIAR, N.; REANG, D.; NATH, A. J.; BARUAH, K. K. Incidence of microplastic contamination in fishes of the Ramsar wetland, Loktak – the world's only floating lake from the Indian Himalayan region. **Journal of Environmental Management**, v. 358, p. 120928, 2024.

BROMILOW, R. H. Paraquat and sustainable agriculture. **Pest Management Science**, v. 60, n. 4, p. 340-349, 2004.

BU, A. Ecogenotoxicology: an emerging science, an emerging tool for environmental monitoring and risk assessment. **Journal of Environmental Analytical Toxicology**, v. 3, n. 165, 2013.

BUZO, M. G. **Alterações Genéticas e Histológicas em Peixes Neotropicais Expostos a Nanopartículas de Prata**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as na in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CATTANI, D.; CESCONETTO, P. A.; TAVARES, M. K.; PARISOTTO, E. B.; DE OLIVEIRA, P. A.; RIEG, C. E. H.; LEITE, M. C.; PREDIGER, R. D. S.; WENDT, N. C.; RAZZERA, G.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

CLERE, I. K.; AHMMED, F.; REMOTO, P. J. G.; FRASER-MILLER, S. J.; GORDON, K. C.; KOMYAKOVA, V.; ALLAN, B. J. M. Quantification and characterization of microplastics in commercial fish from southern New Zealand. **Marine Pollution Bulletin**. v. 184, p. 114121, 2022.

COLLINS A. R. The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, 2004.

CONAMA, C. N. do M. A., 2023. **Resolução n. 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d´água e as diretrizes ambientais para sua classificação, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Disponível em: http://www.siam.mg.gpv.br/sla. Acesso em: 05 nov. 2023.

CORREDOR-SANTAMARÍA, W.; TORRES-TABARES, A.; VELASCO-SANTAMARIA, Y. Biochemical and histological alterations in *Aequidens metae* (Pisces, Cichlidae) and *Astyanax* gr. *bimaculatus* (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. **Science of The Total Environment**, v. 692, p. 1234-1241, 2019.

COSTA, I. D.; COSTA, L. L.; OLIVEIRA, A. S.; CARVALHO, C. E. V.; ZALMON. I. R.; Microplastics in fishes in amazon riverine beaches: influence of feeding mode and distance to urban settlements. **Science of the Total Environment**, v. 863, p. 160934, 2023.

DAGOSTA, F. C. P.; MONÇÃO, M. S.; NAGAMATSU, B. A.; PAVANELLI, C. S.; CARVALHO, F. R.; LIMA, F. C. T.; LANGEANI, F.; DUTRA, G. M.; OTA, R. R.; SEREN, T. J.; TAGLIACOLLO, V.; MENEZES, N. A., BRITSKI, H. A., PINNA, M. Fishes of the upper rio Paraná basin: diversity, biogeography and conservation. **Neotropical Ichthyology**, v. 22, n. 1, p. e230066, 2024.

DAR, S. A.; YOUSUF, A. R.; BALKHI, M. H. An introduction about genotoxicology methods as tools for monitoring aquatic ecosystem: present status and future perspectives. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

DE ARRUDA LEITE, B.; MEIRELES, G.; ABE, F. R.; GRAVATO, C.; DORTA, D. J.; DE OLIVEIRA, D. P. Do zebrafish become blind or is it too much red dye in water? Distinguishing the embryo-larval development and physiology effects of DR 60, 73, and 78. **Science of The Total Environment**, v. 908, p. 168062, 2024.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z-I., KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A-H.; SOUTO D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Review**, v. 81, p. 163-182, 2006.

EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Industrial Effluent Guidelines**. 2024. Disponível em: https://www.epa.gov/eg/industrial-effluent-guidelines. Acesso em: 30 mai. 2024.

EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Whole Effluent Toxicity Methods**. 2023. Disponível em: https://www.epa.gov/cwa-methods/whole-effluent-toxicity-methods. Acesso em: 29 mai. 2024.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Simple method for fresh-weter fish lymphocyte culture. **Revista Brasileira de Genética,** v.11, n. 4, p. 847-52, 1988.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**. v. 44, n. 2, p. 161-166, 1991.

FILKOWSKI, J.; BESPLUG, J.; BURKE, P.; KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK O. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers, **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 542, n. 1-2, p. 23-32, 2003.

GAGNÉ, F. Genotoxicity. *In*: GAGNÉ, F. **Biochemical Ecotoxicology**, Academic Press, 2014, p. 171-196.

GAMMON, D. W.; ALDOUS, C. N.; CARR JR., W. C.; SANBORN, J. R.; PFEIFER, K. F. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. **Pest Management Science**, v. 61, n. 4, p. 331-355, 2005.

GAUTHIER, L.; GAAG, M. V. D.; L'HARIDON, J.; FERRIER, V.; FERNÁNDEZ, M. In vivo detection of wastewater and industrial effluent genotoxicity: use of the newt micronucleus test (Jaylet test). **Science of The Total Environment**, v. 138, n. 1-3, p. 249-269, 1993.

GESAMP. "**Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: A global assessment**" (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP. p. 90, 96, 2015.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

GHISI, N. DE C.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.185, p. 3201–3207, 2013.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® Herbicide, *In*: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. pp.** New York: Springer, 2000. p. 35-120.

GLEI, M.; SHNEIDER, M. G.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicolology**, v. 90, n. 10, p. 2315-36, 2016.

GOSWAMI, M.; YASHWANTH, B. S.; TRUDEAU, V.; LAKRA, WS. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 2393-2411, 2022.

GROSSMANN, K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, p. 109-122, 2003.

HAJAM, Y. A.; RANI, R.; SHARMA, P.; KUMAR, R.; VERMA, S. K. Zebrafish (*Dani rerio*): A versatile model for reproductive biology. *In*: SUNDARAY, J. K.; Rather, M. A.; Kumar, S.; Agarwal, D. (org) **Recent Updates in Molecular Endocrinology and Reproductive Physiology of Fish**. Singapore: Springer, 2021. p. 105-120.

HALFAR, J.; ČABANOVÁ, K.; VÁVRA, K.; DELONGOVÁ, P.; MOTYKA, O.; ŠPAČEK, R.; KUKUTSCHOVÁ, J.; ŠIMETKA, O.; HEVIÁNKOVÁ, S. Microplastics and additives in patients with preterm birth: the first evidence of their presence in both human amniotic fluid and placenta. **Chemosphere**, v. 343, p. 140301, 2023.

HAMPEL, M.; BLASCO, J.; SEGNER, H. Molecular and cellular effects of contamination in aquatic ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research,** v. 22, p. 17261-17266, 2015.

HAN, J-C.; AHMAD, M.; YOUSAF, M.; RAHMAN, S. U.; SHARIF, H. M. A.; ZHOU, Y.; YANG, B.; YUEFEI, H. Strategic analysis on development of simultaneous adsorption and catalytic biodegradation over advanced bio-carriers for zero-liquid discharge of industrial wastewater. **Chemosphere**, v. 323, p. 138871, 2023.

HAO, Y.; SUN, Y.; LI, M.; FANG, X.; WANG, Z.; ZUO, J.; ZHANG, C. Adverse effects of polystyrene microplastics in the freshwater comercial fish, grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): emphasis on physiological response and intestinal microbiome. **Science of the Total Environment**, v. 856, p. 159270, 2023.

HASHIGUCHI, Y.; ZAKARIA, M. R.; TOSHINARI, M.; YUSOFF, M. Z. M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Ecotoxicological assessment of palm oil mill effluent final discharge by zebrafish (*Danio rerio*) embryonic assay. **Environmental Pollution**, v. 277, p. 116780, 2021.

HERNANDEZ, L. M.; YOUSEFI, N.; TUFENKJI, N. Are there nanoplastics in your personal care products? **Environmental Science e Technology Letters**, v. 7, p. 280-285, 2017.

HOOFTMAN R. N.; DE RAAT W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, **Mutation and Resesearch Letters**, v. 104, n. 1-3, p. 147-52, 1982.

HORKÝ, P.; GRABIC, R.; GRABICOVA, K.; BROOKS, B. W.; DOUDA, K.; HUBENA, P.; SANTOS, E. M. S. Methamphetamine pollution elicits addiction in wild fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 224, n. 13, p. jeb242145, 2021.

HUNG, H.; HALSALL, C.; BALL, H.; BIDLEMAN, T.; DACHS, J.; DE SILVA, A.; HERMANSON, M.; KALLENBORN, R.; MUIR, D.; SÜHRING, R.; WANG, X.; WILSON, S. Climate change influence on the levels and trends of persistent organic pollutants (POPs) and chemicals of emerging Arctic concern (CEACs) in the Arctic physical environment - a review. **Environmental Science: Processes e Impacts**, v. 24, n. 10, p. 1577-1615, 2022.

IDOWU, G. A.; ORIJI, A. Y.; OLORUNFEMI, K. O.; SUNDAY, O. M.; SOGBANMU, T. O.; BODUNWA, O. K.; SHOKUNBI, O. S.; AIYESANMI, A. F. Why Nigeria should ban single-use plastics: excessive microplastic pollution of the water, sediments and fish species in Osun river, Nigeria. **Journal of Hazardous Materials Advances**, v. 13, 2024.

JIANG, N.; NAZ, S.; M. A., Y.; ULLAH, Q.; KHAN, M. Z.; WANG, J.; LU, X.; LUOSANG, D-Z.; TABASSUM, S.; CHATHA, A. M. M.; BASANG, W-D. An Overview of comet assay application for detecting DNA damage in aquatic animals. **Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 623, 2023.

JOHANN, S.; GOBEN, M., BEHNISCH, P. A.; HOLLERT, H.; SEILER, T-B. Combining different in vitro bioassays to evaluate genotoxicity of water-accommodated fractions from petroleum products. **Toxics**, v. 8, n. 2, p. 45, 2020.

KHAN, A. H. A.; BARROS, R. Pharmaceuticals in water: risks to aquatic life and remediation strategies. **Hydrobiology**, v. 2, n. 2, p.395-409, 2023.

KUMAR, K. S.; HAN, T. Physiological response of *Lemna* species to herbicides and its probable use in toxicity testing. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 2, p. 39-49, 2010.

KUMARI, T. S., VAIDYANATH, K. Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. **Mutation Research. Letters**, v. 226, n.4, p. 235-238, 1989.

SUMÁRIO

LAWRENCE A.; HEMINGWAY K. **Effects of Pollution on Fish: Molecular effects and population responses**. Blackwell Science, p. 337, 2003.

LI, B.; LIANG, W.; FU, S.; FU, C.; CAI, Z.; MUNSON, A.; SHI, H. Swimming behavior affects ingestion of microplastics by fish. **Aquatic Toxicology**, v. 266, p. 106798, 2024.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510-1524, 2010.

LINEY, K. E.; HAGGER, J. A.; TYLER, C. R.; DEPLEDGE, M. H.; GALLOWAY, T. S.; JOBLING, S. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 81-89, 2006.

LIU, S.; WANG, C.; YANG, Y.; DU, Z.; LI, L.; ZHANG, M.; NI, S.; YUE, Z.; YANG, K.; WANG, Y.; LI, X.; YANG, Y.; QIN, Y.; LI, J.; YANG, Y.; ZHANG, M. Microplastics in three types of human arteries detected by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS). **Journal of Hazardous Materials**, v. 469, p. 133855, 2024.

LUCIO, F. T.; MAGNONI, D. M.; VICENTINI, V. E. P.; CONTE, H. Disponibilidade e influência dos microplásticos nos seres vivos e ambiente: uma revisão. **Conexão Ciência**, v. 14, n 1, p. 47-55, 2019.

MACLAREN, R. D.; WISNIEWSKI, K.; MACLAREN, C. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the siamese fighting fish, betta splendens. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197259, 2018.

MAGNONI, D. M.; Heck, M. C.; Gigliolli, A. A. S.; Buzo, M. G.; Molke, A. S.; De Syllos, R. S.; LIMA, O. C. M.; Vicentini, V. E. P. Nuclear and morpho-histopathological alterations in *Astyanax altiparanae* exposed to effluent from the process of anodizing aluminum. **Aquatic Toxicology**, v. 262, p. 106637, 2023.

MAKHDOUMI, P.; PIRSAHEB, M.; AMIN, A. A.; KIANPOUR, S.; HOSSINI, H. Microplastic pollution in table salt and sugar: occurrence, qualification and quantification and risk assessment. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 119, p. 105261, 2023.

MANCIA, A.; ABELLI, L.; PALLADINO, G.; CANDELA, M.; LUCON-XICCATO, T.; BERTOLUCCI, C.; FOSSI, M. C.; BAINI, M.; PANTI, C. Sorbed environmental contaminants increase the harmful effects of microplastics in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v. 259, p. 106544, 2023.

MATTHEE, C.; BROWN, A. R; LANGE, A.; TYLER, C. R. Factors determining the susceptibility of fish to effects of human pharmaceuticals. **Environmental Science e Technology**, v. 57, n. 24, p. 8845-8862, 2023.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido Aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas**, v.12, p. 145-154, 2002.

MENDONÇA, C. F. R. **Determinação de Glifosato e AMPA nas Águas Superficiais da Bacia do Paraná 3**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2018.

MENG, H.; LIN, Y.; ZHONG, W.; ZHAO, Z; SHEN, L.; LING, Z., ZHAO, K.; XU, S. Fish biomonitoring and ecological assessment in the Dianchi Lake Basin based on environmental DNA. **Water**, v. 15, n. 399, 2023.

MIR, M. I.; KHAN, S.; BHAT, S. A.; RESHI, A. A.; SHAH, F. A.; BALKI, M. H.; MANZOOR, R. Scenario of genotoxicity in fishes and its impact on fish industry. **Journal of Environmental Science**, **Toxicology and Food Technology,** v. 8, n. 6, p. 2319-2402, 2014.

MONTAGNER C. C.; SODRÉ F. F.; ACAYABA R. D.; VIDAL C.; CAMPESTRINI I.; LOCATELLI, M. A.; PESCARA I. C.; ALBUQUERQUE A. F.; UMBUZEIRO G. A.; JARDIMA W. F. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo state, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n.3, p. 614-632, 2019.

MONTAGNER, C. C.; VIDALA C.; ACAYABAB, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil, cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

MOREIRA, D. G.; AIRES, A.; PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, M. Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology e Pharmacology**, v. 256, p. 109322, 2022.

MUIR, D.; SIMMONS, D.; WANG, X.; PEART, T.; VILLELLA, M.; MILLER, J.; SHERRY, J. Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland. **Scientific Reports,** v. 7, n. 1, p.16999, 2017.

NASSEF, M.; MATSUMOTO, S.; SEKI, M.; KHALIL, F.; KANG, I.J.; SHIMASAKI, Y.; OSHIMA, Y.; HONJO, T. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish *(Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1095-1100, 2010.

NÉSTOR, M. C., MARIANA, C. Impact of pharmaceutical waste on biodiversity. *In*: GÓMEZ-OLIVÁN, L. (eds) Ecopharmacovigilance. **The Handbook of Environmental Chemistry,** v. 66, Springer, Cham, 2017.

NIEMUTH, N. J.; KLAPER, R. D. Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 33-40, 2018.

OBE, G.; SAVAGE, J. R. K; PFEIFFER, P.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 17-36, 2002.

OECD - **Guideline for Testing of Chemicals, Fish, Acute Toxicity Test** - 2019. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicitytest_9789264069961-en. Acesso em 27 jun. 2024.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013.

OECD, **Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options**, OECD Publishing, Paris. Disponível em: https://doi.org/10.1787/de747aef-en. Acesso em 30 abr. 2022.

OKEKE, E. S.; FENG, W.; CHANG, C.; MAO, G.; CHEN, Y.; XU, H.; QIAN, X.; LUO, M. WU, X.; YANG, L. Q. Transcriptomic profiling reveals the neuroendocrine-disrupting effect and toxicity mechanism of TBBPA-DHEE exposure in zebrafish (*Danio rerio*) during sexual development. **Science of The Total Environment**, v. 858, p. 160089, 2023.

PHAN, V. N.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; DA SILVA, A. J. ROCHAD. In vivo micronucleus test for detecting response of teleost fish to environmental genotoxic exposure. *In:* Ozouf-Costaz C., Pisano E., Foresti F., Almeida Toledo L. F., **Fish Cytogenetic Techiniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyan**, CRC Press, 2015.

PINHA, L. **Investigação do Potencial Genotóxico e de Alterações Comportamentais em *Moenkhausia forestii* Expostos ao Herbicida Paraquat**. 2019. Monografia - Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

PIRES, N. L., 2015. **Expansão da Fronteira Agrícola e Presença de Glifosato e AMPA em Amostras de Água da Região de Santarém (PA): Desafios analíticos para o monitoramento ambiental**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PLASTICS, Europe **"Plastics-The fast facts 2023"**. Disponível em: http://www.plasticseurope.org. Acesso em: 30 abr de 2024.

POMPÊO, M.; RANI-BORGES, B.; PAIVA, T. C. B. **Microplásticos nos Ecossistemas: Impactos e soluções**, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, p. 216, 2022.

QUEIROZ, L. G.; POMPÊO, M.; MORAES, B. R.; ANDO, R. A.; RANI-BORGES, B. Implications of damming and morphological diversity of microplastics in the sediment from a tropical freshwater reservoir. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 12, n. 2, p. 112234, 2024.

RIBEIRO, Y. M.; MOREIRA, D. P.; WEBER, A. A.; SALES, C. F.; MELO, R. M. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; PASCHOALINI, A. L. Adverse effects of herbicides in freshwater neotropical fish: a review. **Aquatic Toxicology**, v. 252, p. 106293, 2022.

ROGALL, E. T.; JACOB, S.; TRIEBSKORN, R.; SCHWARTZ, T. The impact of the anti-diabetic drug metformin on the intestinal microbiome of larval brown trout (*Salmo trutta f. fario*). **Environmental Sciences Europe**, v. 32, p. 1-14, 2020.

RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J. T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 517–528, 1977.

SAAD, D.; ALAMIN, H. The first evidence of microplastic presence in the river Nile in Khartoum, Sudan: using Nile Tilapia fish as a bio-indicator. **Heliyon**, v. 1, 2024.

SANTANA, M. F. M.; ASCER, L. G.; CUSTÓDIO, M. R.; MOREIRA, F. T.; TURRA, A. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p.183-189, 2016.

SAVAGE, J. R. K. On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. **Cytogenetic and Genome Research**, v.104, n. 1-4, p. 46-55, 2004.

SCHMID W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCOTT, J.; BELDEN, J. B.; MINGHETTI, M. Applications of the RTgill-W1 cell line for acute whole-effluent toxicity testing: in vitro-in vivo correlation and optimization of exposure conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 1050-1060, 2021.

SHUGART L.; THEODORAKIS C. New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. **Biotherapy**, v. 11, n. 2, p. 119-127, 1998.

SILVA, J. R. R.; GREGÓRIO, A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; FERNANDES, C. A. Genotoxicity and cytotoxicity of textile production effluents, before and after *Bacillus subitilis* bioremediation, in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae). **Mutatation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 886, p. 503-588, 2023.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p.184-191, 1988.

SKIDMORE, M. E., SIMS, K. M., GIBBS, H. K. Agricultural intensification and childhood cancer in Brazil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 45, p. e2306003120, 2023.

SOLTYS, D.; RUDZINSKA-LANGWALD A.; KUREK, W.; GNIAZDOWSKA, A.; SLIWINSKA, E.; BOGATEK, R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. **Planta**, v. 234, n. 3, p. 609-621, 2011.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 113, p. 203- 212, 1999.

SRISIRI, T. S.; HAETRAKUL, T.; DUNBAR, S. G.; CHANSUE, N. Microplastic contamination in edible marine fishes from the upper Gulf of. **Marine Pollution Bulletin**, v. 198, p. 115785, 2024.

SUN, T.; ZHAN, J.; LI, F.; JI, C. WU, H. Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations. **Science of the Total Environment**, v.783, p. 147076, 2021.

ŠVORC, L.; M, RIEVAJ.; D, BUSTIN. Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode, **Sensors Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 294–300, 2013.

TINCANI F.H.; SANTOS G.S.; AZEVEDO A. C. B.; MARQUES A.E.M.L.; PEREIRA L.S.; CASTELLANO G.C.; DA SILVA T.A.; GALVAN G.L; CHIMENTÃO F.G.; SILVA C.P.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A.; SILVA DE ASSIS H.C.; CAMPOS S.X.; RAMSDORF W.A.; CESTARI M.M. Climbing the taxonomic ladder: could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*. **Ecological Indicators**, v.106, p. 105474, 2019.

UKIĆ, Š.; SIGURNJAK, M.; CVETNIĆ, M.; MARKIĆ, M.; NOVAK STANKOV, M; ROGOŠIĆ, M.; RASULEV, B.; LONČARIĆ BOŽIĆ, A.; KUŠIĆ, H.; BOLANČA, T. Toxicity of pharmaceuticals in binary mixtures: assessment by additive and non-additive toxicity models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 185, p. 109696 2019.

ULUPINAR M.; OKUMUŞ I. Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish. **Turkish Journal of Zoology,** v. 26, n. 1, p. 141-148, 2002.

UNEP, UN Environment Programme: Intergovernmental Negotiating Committee on Plastic Pollution. Disponível em: https://www.unep.org/inc-plastic-pollution. Acesso em 30 abr. 2024.

VASSEUR, C.; SERRA, L.; EL BALKHI, S.; LEFORT, G.; RAMÉ, C.; FROMENT, P.; DUPONT, J. Glyphosate presence in human sperm: first report and positive correlation with oxidative stress in an infertile French population. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 278, p. 116410, 2024.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: Mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre, 1997.

VILLALOBOS, J. U. G.; FAZOLLI, S. A. **Agrotóxicos: Um enfoque multidisciplinar**. Maringá: Eduem, p. 214, 2017.

WANG, J.; LI, Y.; LU, L.; ZHENG, M.; ZHANG, X.; TIAN, H.; WANG, W.; RU, S. Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Environmental Pollution**, v. 254, p. 113024, 2019.

WELLS, P. G. Aquatic toxicology: concepts, practice, new directions. **General, Applied and Systems Toxicology**, 2009.

WILKINSON, J. L.; BOXALL, A. B. A; KOLPIN, D. W; LEUNG, K. M. Y; LAI, R. W. S; GALBÁN-MALAGÓN, C; ADELL, A. D.; MONDON, J.; METIAN, M.; MARCHANT, R. A.; BOUZAS-MONROY, A.; CUNI-SANCHEZ, A.; COORS, A.; CARRIQUIRIBORDE, P.; ROJO, M.; GORDON, C.; CARA, M.; MOERMOND, M.; LUARTE, T.; PETROSYAN, V.; PERIKHANYAN, Y.; MAHON, C. S.; MCGURK, C. J.; HOFMANN, T.; KORMOKER, T.; INIGUEZ, V; GUZMAN-OTAZO, J; TAVARES, J. L.; DE FIGUEIREDO, F G.; RAZZOLINI, M. T. P.; DOUGNON, V.; GBAGUIDI, G.; TRAORÉ, O.; BLAIS, J. M.; KIMPE, L. E.; WONG, M.; WONG, D.; NTCHANTCHO, R.; PIZARRO, J.; YING, G. G.; CHEN, C. E.; PÁEZ, M.; MARTÍNEZ-LARA, J.; OTAMONGA, J. P.; POTÉ, J.; IFO, S. A.; WILSON, P; ECHEVERRÍA-SÁENZ, S.; UDIKOVIC-KOLIC, N.; MILAKOVIC, M.; FATTA-KASSINOS, D.; IOANNOU-TTOFA, L.; BELUŠOVÁ, V.; VYMAZAL, J.; CÁRDENAS-BUSTAMANTE, M.; KASSA, B. A.; GARRIC, J.; CHAUMOT, A.; GIBBA, P.; KUNCHULIA, I.; SEIDENSTICHER, S; LYBERATOS, G.; HALLDÓRSSON, H. P.; MELLING, M.; SHASHIDHAR, T.; LAMBA, M.; NASTITI, A.; SUPRIATIN, A.; POURANG, N.; ABEDINI, A.; ABDULLAH, O.; GHARBIA, S. S.; PILLA, F.; CHEFETZ, B.; TOPAZ, T.; YAO, K. M.; AUBAKIROVA, B.; BEISENOVA, R.; OLAKA, L.; MULU, J. K.; CHATANGA, P.; NTULI, V; BLAMA, N. T.; SHERIF, S.; ARIS, A. Z.; LOOI, L. J.; NIANG, M.; TRAORE, S. T.; OLDENKAMP, R.; OGUNBANWO, O.; ASHFAQ, M.; IQBAL, M.; ABDEEN, Z.; O'DEA, A.; MORALES-SALDAÑA, J. M.; CUSTODIO, M.; DE LA CRUZ, H.; NAVARRETE, I.; CARVALHO, F.; GOGRA, A. B.; KOROMA, B. M.; CERKVENIK-FLAJS, V.; GOMBAČ, M.; THWALA, M.; CHOI, K.; KANG, H.; LADU, J. L. C.; RICO, A.; AMERASINGHE, P.; SOBEK, A.; HORLITZ, G.; ZENKER, A. K.; KING, A. C.; JIANG, J. J.; KARIUKI, R.; TUMBO, M.; TEZEL, U.; ONAY, T. T.; LEJJU, J. B.; VYSTAVNA, Y.; VERGELES, Y.; HEINZEN, H.; PÉREZ-PARADA, A.; SIMS, D.VB.; FIGY, M.; GOOD, D.; TETA, C. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 119, n. 8, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chemical safety: Pesticides –october 2020 b. Disponível em: https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides. Acesso em: 01 jul**.** 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **(**WHO**).** Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies, of Environmental Health Criteria 240 (EHC 240). 2020a, section 4.5- Genotoxicity.

ZAFRA-LEMOS, L.; CUSIOLI, L. F.; BERGAMASCO, R.; BORIN-CARVALHO, L. A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 865, p. 503335, 2021a.

ZAFRA-LEMOS, L.; LOPES, V. L.; RAMPAZZO, A. P. DE S.; NATALI, M. R. M., BORIN-CARVALHO, L. A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B. Evidence of cytogenetic and histological damage in specimens of *Astyanax lacustris* (Pisces, characidae) exposed to the hydrogen cyanide-based herbicide dormex®. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 43, n. 1, 2021b.

ZAMORA-LEDEZMA, C.; NEGRETE-BOLAGAY, D.; FIGUEROA, F.; ZAMORA-LEDEZMA, E.; NI, M.; ALEXIS, F.; GUERRERO, V. H. Heavy metal water pollution: a fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. **Environmental Technology e Innovation**, v. 22, p. 101504, 2021.

ZIHAN, G.; HAOYUAN, L. The impact of climate change on the bioavailability of environmental toxins and their toxicological effects. **Highlights in Science, Engineering and Technology,** v. 6, p. 33-44, 2022.

ZITOUNI, N.; BOUSSERRHINE, N.; MISSAWI, O.; BOUGHATTAS, I.; CHÈVRE, N.; SANTOS, R.; BELBEKHOUCHE, S.; ALPHONSE, V.; TISSERAND, F.; BALMASSIERE, L.; SANTOS, S. P.; MOKNI, M.; GUERBEJ, H.; BANNI, M. Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 124055, 2021.

APRESENTAÇÃO DOS AUTORES DO LIVRO – DOCENTES DO PBA

Profa. Dra. Alessandra Valéria de Oliveira

Professora Associado A/ Coordenadora Adjunto Graduação Biotecnologia

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/7863504955794040

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1342-4545

E-mail: avoliveira@uem.br

Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro

Professora Associado C/ Coordenadora Adjunto do PBA

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/6136505250582192

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0881-0345

E-mail: albpcastro@uem.br

Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira

Professor Associado C

Depto. de Farmácia/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/6144698925624538

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8737-0546

E-mail: ajboliveira@uem.br

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Professor Adjunto B/ Coordenador Graduação Ciências Biológicas-EaD

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/0833446985836546

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9905-1507

E-mail: cafernandes@uem.br

Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolim

Professora Associado A/ Coordenadora Adjunto do PGB

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/6483114881983756

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1653-3106

E-mail: camangolin@uem.br

Prof. Dr. Eduardo Cesar Meurer

Professor Adjunto C - nível 6-04

Universidade Federal do Paraná - Jandaia do Sul

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4135904892954096

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4835-7773

E-mail: eduardo.meurer@ufpr.br

Prof. Dr. Helio Conte

Professor Associado C/ Pesquisador Sênior

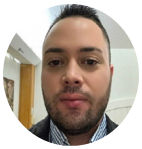
Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/7805899028515988

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2090-0554

E-mail: hconte@uem.br

SUMÁRIO



Prof. Dr. Igor Vivian de Almeida

Professor Adjunto

Universidade Federal Rural da Amazônia - Capitão Poço

Lattes: http://lattes.cnpq.br/1706404060988942

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3200-2126

E-mail: igor.almeida@ufra.edu.br

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Professor Titular/ Pesquisador Sênior

Universidade de São Paulo – Piracicaba

Lattes: http://lattes.cnpq.br/2302429651674634

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0503-3525

E-mail: jlazevedo@usp.br

Prof. Dr. Julio Cesar Polonio

Professor Adjunto A

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/5347768667567528

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5451-4320

E-mail: jcpolonio2@uem.br

Profa. Dra. Luciana Andréia Borin de Carvalho

Professora Associado A/ Coordenadora Graduação Biotecnologia

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/2696131074597952

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1990-4803

E-mail: labcarvalho@uem.br

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica

Professor Adjunto D

Depto. de Física/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/0807675554407664

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2634-447X

E-mail: lfcotica@yahoo.com.br

Profa. Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki

Professora Associado C

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/2318400558555562

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2028-9281

E-mail: mccrtakasusuki@uem.br

Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado

Professora Titular/ Chefe do DBC

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4904738150188587

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7815-4606

E-mail: mfpsmachado@uem.br

Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes

Professora Adjunto B

Depto. de Engenharia de Alimentos/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/3085709303757001

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2420-5134

E-mail: rgutti02@gmail.com

Profa. Dra. Rosane Marina Peralta

Professora Titular

Depto. de Bioquímica/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/7046351448775946

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5749-0723

E-mail: rmperalta@uem.br

Profa. Dra. Rosângela Bergamasco

Professora Associado C

Depto. de Engenharia Química/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/2031806059477046

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2934-6641

E-mail: rbergamasco@uem.br

Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Professor Titular

Depto. de Zootecnia/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/5591060043298330

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1814-9703

E-mail: vaatoledo@uem.br

Profa. Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Professora Titular/ Coordenadora do PBA

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: https://lattes.cnpq.br/5917283612908520

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1385-0058

E-mail: vepvicentini@uem.br

Prof. Dr. João Alencar Pamphile

Professor Associado C - *In memoriam*

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/ Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/0419573494358567

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6139-5937

APRESENTAÇÃO DOS DEMAIS AUTORES DO LIVRO

Profa. Dra. Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli

Professora Adjunto DBC

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4911390091489064

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2752-642X

E-mail: aasgigliolli2@uem.br

Dra. Adrieli Rodrigues da Costa Nunes

Egresso do Curso de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/5977355662325113

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4036-7603

E-mail: pg53982@uem.br

Profa. Dra. Andressa Domingos Polli

Professora Adjunto DBC

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/9755293485443998

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9458-7388

E-mail: adpolli2@uem.br

MSc. Anna Carla Ribeiro

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4460909960005208

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3202-0332

E-mail: pg54930@uem.br

Dr. Bruno Vinícius Daquila

Pós-Doutorando PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/7317834230980773

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3540-3187

E-mail: bv.ds@hotmail.com

Profa. Dra. Daiani Rodrigues Moreira

Pós-Doutoranda PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/3862526110467326

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5279-6624

E-mail: drmoreira@uem.br

MSc. Débora Elisa Antunes de Mendonça

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/8669704214159792

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5733-996X

E-mail: deeboraelisa@gmail.com

MSc. Diane Marques Magnoni

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/9950107836657640

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9527-2428

E-mail: dianemagnoni@hotmail.com

Profa. Dra. Eliane Papa Ambrosio Albuquerque

Professora Adjunto DBC

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4107523828121981

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8874-6047

E-mail: epambrosio2@uem.br

MSc. Elisa Parcero Hernandes

Egresso do Curso de Mestrado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4886582059466704

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0768-2812

E-mail: ra68048@uem.br

MSc. Esperança Edna Alexandre Chibite

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/4588966105284473

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8512-3362

E-mail: edchibite@gmail.com

Dr. João Arthur dos Santos Oliveira

Egresso do Curso de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/3010508643799841

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6864-1523

E-mail: joaoarthur_oliveira@hotmail.com

MSc. Jesieli Beraldo

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/5022659591209605

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7628-3057

E-mail: jesieliberaldo@gmail.com

MSc. Josiane Rodrigues Rocha da Silva

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/7167715618230413

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9611-590X

E-mail: pg403632@uem.br

Dr. Layon Zafra Lemos

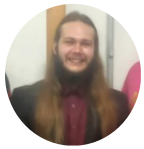
Egresso do Curso de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/3323317457593344

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0428-8016

E-mail: layonzafra@hotmail.com



MSc. Luis Felipe Oliva dos Santos

Pós-graduando de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/9101596566047791

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8169-198X

E-mail: luisfelipe.oliva11@gmail.com

Dra. Mariane Aparecida Franco de Godoy

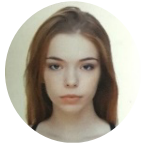
Pós-Doutoranda PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/5155294895960776

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4186-5855

E-mail: mariane_afg@hotmail.com



MSc. Mariana Fernandes Rocha

Pós-graduanda de Doutorado PBA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/6484543163166010

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0547-8962

E-mail: pg55048@uem.br

Profa. Dra. Michele Cristina Heck

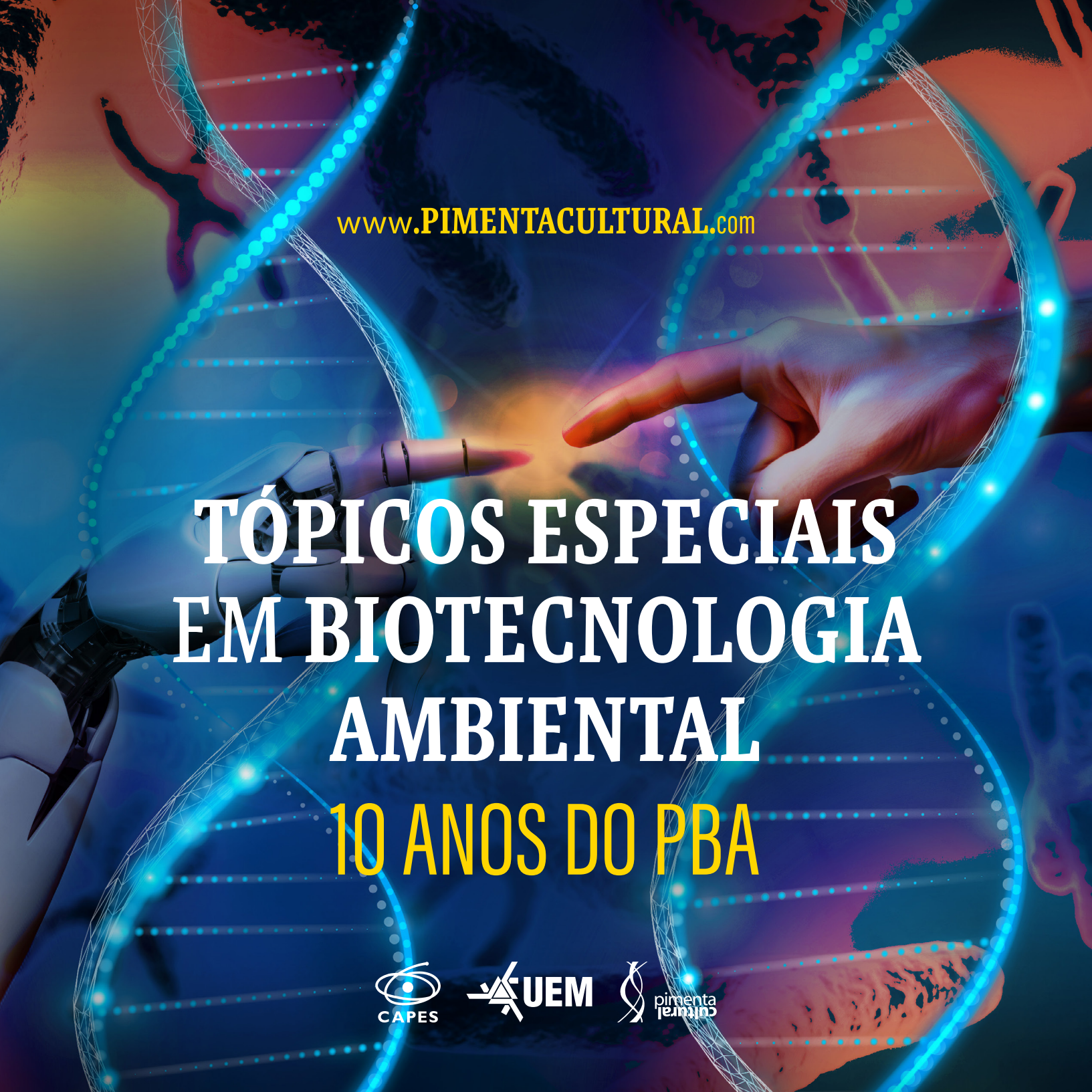
Professora Adjunto DBC

Depto. de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Universidade Estadual de Maringá

Lattes: http://lattes.cnpq.br/6636191753520370

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5869-5007

E-mail: mcheck2@uem.br


www.PIMENTACULTURAL.com
TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL
10 ANOS DO PBA
CAPES
UEM
pimenta cultural