

**Editora Dra. Gislaine Fongaro**

# **TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS SUSTENTÁVEIS PARA FINS DE SAÚDE ÚNICA**

**PROSPECÇÃO DE  
MOLÉCULAS BIOATIVAS**

**PATÓGENOS VIRAIS  
E PARASITÁRIOS**

**CULTIVO CELULAR  
*IN VITRO***

**CITOTOXICIDADE**

**INTELIGÊNCIA  
ARTIFICIAL**





# **Tendências Biotecnológicas Sustentáveis para Fins de Saúde Única**

**Volume 1**

Organizador/Editor

Gislaine Fongaro

**GS4**  
**EDITORA**  
EXPERTISE EM PUBLICAÇÃO

## ©Dos Organizadores, 2024

Editoração: GS4 Editora

Capa: MsC. Amanda Kelly Ferreira Sousa e Dra. Gislaine Fongaro.

Revisão: Os Autores.

Open access publication by GS4 Editora.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais

Esta obra é uma produção independente. A exatidão das informações, opiniões e conceitos emitidos, bem como da procedência das tabelas, quadros, mapas e fotografias é de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

**Nota:** Muito zelo e técnica foram empregados neste livro. No entanto, podem ocorrer erros de digitação ou dúvida conceitual. Em qualquer das hipóteses, solicitamos a comunicação ao nosso Serviço de Atendimento ao Cliente, para podermos esclarecer ou encaminhar a questão.

Serviço de Atendimento ao Cliente

(49) 98847-8760

editorial@gs4editora.com

**ISBN:** 978-65-998418-5-9

**DOI:** 10.56041/9786599841859

*Todos os direitos reservados.*

DADOS INTERNACIONAIS PARA CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

T291 Tendências biotecnológicas sustentáveis para fins de saúde única - volume 1 [livro eletrônico] / Organizador/Editor: Gislaine Fongaro. -- Concórdia, SC : GS4 Editora, 2024.  
1 livro digital (4936kb) : il. color. ; PDF.  
Requisitos do sistema: Adobe Acrobat Reader  
Acesso: World Wide Web  
ISBN 978-65-998418-5-9

1. Biotecnologia -- Setor de Saúde.  
2. Sustentabilidade. I. Fongaro, Gislaine.

CDD 660.6  
CDU 57.004:61

Elaborada por: Amanda Moura de Sousa CRB-7/5992

Índices para Catálogo Sistemático:

1. Biotecnologia 660.6  
2. Biotecnologia 57.004:61

## **ORGANIZADOR/EDITOR**

**Gislaine Fongaro:** É Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC campus Florianópolis onde lidera projetos de pesquisa e extensão em vigilância e controle sanitário e ambiental de patógenos humanos, animais e zoonóticos no âmbito de “Saúde Única”, com foco em virologia e ambiente. Se dedica a projetos, edições especiais e estudos que buscam o reaproveitamento seguro de resíduos agropecuários e humanos, vigilância microbiológica / viral, bem como controle biológico da bactérias usando bacteriófagos. Desde 2019 atua como docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, orientando em nível de mestrado e doutorado. É membro da Sociedade Brasileira de Virologia desde 2011, sendo coordenadora da área da Virologia Ambiental no biênio (2019-2020). Atualmente é Presidente do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-CCB-UFSC).

## **PREZADO(A) LEITOR(A),**

Você tem em mãos um livro que descreve algumas abordagens biotecnológicas que podem resolver certos problemas e, por conseguinte, melhorar nossa qualidade de vida humana, animal e ambiental. Trata-se de um pequeno retrato do está ocorrendo na área da Biotecnologia, um ramo da biologia que utiliza organismos vivos, células e moléculas para criar produtos e serviços úteis à sociedade. Embora o termo “biotecnologia” tenha sido utilizado pela primeira vez em 1919 pelo agrônomo húngaro Karl Ereky, há muito tempo os seres humanos têm empregado ferramentas biológicas para criar produtos úteis. Exemplos emblemáticos são a produção de alimentos fermentados, como pães, queijos e vinhos, que utilizam microrganismos para transformar ingredientes brutos em produtos comestíveis. Também na agricultura e pecuária se deu o melhoramento de diversas espécies, por meio do cruzamento de indivíduos que possuíam as características genéticas mais desejáveis. Dessa forma, o ser humano foi capaz de manipular alguns organismos vivos para obter resultados desejados, embora os processos biológicos envolvidos não fossem totalmente compreendidos na época. Somente após a descoberta da estrutura e entendimento de como o código genético, na forma de DNA, era transmitido entre as células é que os cientistas passaram a ter um entendimento mais profundo sobre o funcionamento e regulação de diversos sistemas biológicos e assim ter um acesso menos empírico da manipulação genética. É geralmente aceito que a biotecnologia moderna teve início na década de 1970, quando o cientista Paul Berg desenvolveu a primeira técnica para a criação de microrganismos recombinantes, combinando o DNA de organismos distintos em uma única célula. Essa técnica permitiu, por exemplo, a síntese de proteínas humanas por bactérias e leveduras, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos tratamentos médicos. É o caso da insulina humana, produzida por bactérias geneticamente modificadas e utilizada desde a década 1980. A partir de então, a biotecnologia tem evoluído rapidamente, abrangendo diversas áreas, como a medicina, agricultura, indústria alimentícia, meio ambiente e energia.

Um exemplo bastante recente de como a biotecnologia pode proporcionar soluções que ajudam os seres humanos foi o desenvolvimento de vacina por meio do uso da tecnologia do DNA recombinante. Chama a atenção ainda que as novas abordagens biotecnológicas para a produção de vacinas permitem a produção do imunizante em microrganismos não patogênicos, diferente de abordagens convencionais que requerem o cultivo e propagação *in vitro* do agente infeccioso em laboratórios, incorrendo em um problema de biossegurança. Ainda na área da saúde, por meio da identificação de melhores marcadores moleculares e combinando nanotecnologia e tecnologia da informação, tem sido possível desenvolver sistemas de diagnóstico e prognóstico rápidos, precisos, personalizados e baratos.

A biotecnologia também tem sido aplicada na agricultura, permitindo o desenvolvimento de culturas mais produtivas, resistentes a pragas e doenças, além de produzir alimentos com maior valor nutricional e mais sustentáveis. A biotecnologia não se limita a atuar somente sobre as plantas, mas também pode ser aplicada sobre o solo arável, de forma a restaurar sua

vitalidade e viabilidade por meio da reposição dos microrganismos existentes no solo, a chamada agricultura regenerativa. Isso pode ser feito utilizando processos denominados biorremediação, que aproveitam os processos bioquímicos naturais de plantas ou microrganismos para limpar o solo ou água contaminados. A biorremediação pode ainda ser utilizada para reduzir a poluição ambiental gerada pela indústria, incluindo derramamentos de óleos, drenagem ácida de minas e lixo radioativo.

Por fim, é grande a expectativa sobre o impacto das contribuições que a biotecnologia pode aportar no enfrentamento das mudanças climáticas. As inovações em biotecnologia podem mitigar o risco cada vez maior de níveis crescentes de CO<sub>2</sub> atmosférico. Pesquisas recentes neste campo têm explorado como os organismos vivos consomem e utilizam CO<sub>2</sub>. Ao aproveitar o poder dos sistemas biológicos naturais, os cientistas podem projetar diversas abordagens para reduzir a emissão de gases de efeito estufa. A meta sustentável de desperdício zero pode também se tornar uma realidade com a biotecnologia, uma vez que resíduos gerados em processos industriais podem ser processados em biorefinarias e transformados em fontes de energia renovável, como biocombustíveis e biogás. O número de aplicações em que a biotecnologia pode fazer a diferença no sentido da sustentabilidade é praticamente ilimitado.

Esperamos ter demonstrado nessas poucas linhas como a biotecnologia tem transformado de forma profunda a sociedade em que vivemos e certamente o continuará fazendo. Os desafios para o futuro da biotecnologia e da inovação biotecnológica residem na capacidade de analisar e integrar grandes volumes de dados biológicos de forma rápida e precisa, proporcionando uma aceleração no ritmo das descobertas e aplicações científicas. Para tanto, técnicas de aprendizagem automática e recursos de inteligência artificial devem ser utilizados. Entretanto, dentre tantas aplicações benéficas, a biotecnologia também pode levar a consequências gravíssimas quando utilizada para fins questionáveis, como a manipulação de embriões humanos saudáveis. Por isso é muito importante a contínua discussão pela sociedade de questões éticas levantadas por certos estudos da área da Biotecnologia, bem como o constante aperfeiçoamento da legislação pertinente.

Esse livro aborda temas relevantes para a saúde humana, animal e ambiental, no âmbito de “Saúde Única”. Em sete capítulos, há abordagem das tendências de estudos para entender e enfrentar patógenos e plantas indesejáveis, busca por moléculas bioativas, o uso de vírus como ferramentas tecnológicas, para além de estudos *in vitro* usando cultura celular animal e tendências da vacinologia reversa.

Uma boa leitura!

Conteúdo elaborado por: Dra. Patrícia H. Stoco e Dr. Aguinaldo R. Pinto  
Apresentado e Editado por: Dra. Gislaine Fongaro

## Sumário

Capítulo 01 .....	8
<b>Interação dos vírus entéricos com poluentes ambientais</b>	
Catielen P. Pavi, Mariana A. Elois, Beatriz P. Savi, Yasmin F. S. H. Jempierre, Giulia V. T. Pilati, Rafael D. Cadamuro, Lucas Zanchetta, Gislaine Fongaro	DOI: 10.56041/9786599841859-1
Capítulo 02.....	29
<b>Controle ambiental de parasitos entéricos: desafios e tendências</b>	
Laryssa Vanessa De Liz, Carolina Leite Martins, Amábilli De Souza Rosar, Ana Cláudia Oliveira De Freitas, Ana Paula Bastiani, Edmundo Carlos Grisard, Patricia Flavia Quaresma, Patricia Hermes Stoco	DOI: 10.56041/9786599841859-2
Capítulo 03.....	44
<b>Controle de plantas espontâneas mediado pelo uso de bioherbicidas</b>	
Aline F. Camargo, Simone Kubeneck, Júlia P. Nerling, Cauê B. Bieniek, Larissa C. Romani, Altemir J. Mossi, Gislaine Fongaro, Helen Treichel	DOI: 10.56041/9786599841859-3
Capítulo 04 .....	54
<b>Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento biotecnológico de produtos</b>	
Iara Zanella Guterres, Isabella Dai Prá, Yasmim Guterres Bauer, Giovana Sequinel Correa, Felipe Gomes Dallepiane, Maria Eduarda Sedrez, Luise Gauer Schulte, Mariane Beatriz Sordi, Ariadne Cristiane Cabral Cruz, Izabella Thaís Silva	DOI: 10.56041/9786599841859-4
Capítulo 05.....	66
<b>Bioprospecção de metabólitos de leveduras para fins biotecnológicos aplicados à saúde</b>	
Angela Alves Dos Santos, Viviani Tadioto, Anderson Giehl, Stéfany Kell Bressan, Larissa Werlang, Camila Girardi Oliveira, Mariana Da Costa Diniz, Triciane Tornai Pereira, Izabella Thaís Silva, Gislaine Fongaro, Sérgio Luiz Jr. Alves	DOI: 10.56041/9786599841859-5
Capítulo 06 .....	84
<b>Bioprospecção de bacteriófagos e suas interações no controle microbiano e nas resistências bacterianas</b>	
Giulia V. T. Pilati, Amanda. K. F. Sousa, Rafael. D. Cadamuro, Mariana A. Elois, Beatriz P. Savi, Catielen P. Pavi, Yasmin F. S. H. Jempierre, Estêvão B. Souza, Felipe G. Dallepiane, Theo D. Tell, Leonardo Pessi, Gislaine Fongaro	DOI: 10.56041/9786599841859-6
Capítulo 07.....	100
<b>Vacinologia reversa: um novo paradigma para o desenvolvimento de imunizantes destinados à saúde única</b>	
Miguel De Abreu De Oliveira, Gabriel Salles Beltrão, Aguinaldo Roberto Pinto, Douglas Bardini Silveira	DOI: 10.56041/9786599841859-7

## Interação dos vírus entéricos com poluentes ambientais

DOI: 10.56041/9786599841859-1

**PAVI, Catielen P.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0003-2986-6900>

**ELOIS, Mariana A.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0003-2986-6900>

**SAVI, Beatriz P.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-7948-6212>

**JEMPIERRE, Yasmin F. S. H.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-00025805-9510>

**PILATI, Giulia V. T.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0001-9689-0279>

**CADAMURO, Rafael D.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

**ZANCHETTA, Lucas**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

**FONGARO, Gislaine\***

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-000155963320>

\*Autor correspondente: gislainefongaro@gmail.com / gislaine.fongaro@ufsc.br

## RESUMO

Os vírus entéricos, que afetam o sistema gastrointestinal humano, podem ser transmitidos por meio da ingestão de água e alimentos contaminados, bem como pelo contato direto com superfícies e pessoas infectadas. Esses vírus interagem com diversos poluentes ambientais, que podem ser originados de fontes industriais, agrícolas ou domésticas, incluindo contaminantes químicos, metais pesados, microplásticos e resíduos orgânicos presentes no solo, ar e águas superficiais e subterrâneas. A presença desses poluentes pode alterar a sobrevivência, persistência, transporte e disseminação dos vírus entéricos, aumentando o risco de contaminação da água e dos alimentos. Além disso, os poluentes ambientais podem resultar na bioacumulação de vírus em plantas e animais aquáticos. Também é importante destacar que esses poluentes têm o potencial de comprometer os processos de tratamento de águas residuárias utilizados atualmente, contribuindo para a ocorrência de surtos de doenças gastrointestinais e afetando a saúde pública. Nesse contexto, a pesquisa sobre as interações entre vírus entéricos e poluentes ambientais desempenha um papel crucial na mitigação desses riscos. É essencial implementar o monitoramento rigoroso da qualidade da água e dos alimentos, bem como adotar medidas de redução da poluição ambiental e o uso de tratamentos adequados para água e esgoto.

**Palavras-chave:** Rota feco-oral; Micropoluentes ambientais; Macropoluentes ambientais; Persistência viral; Mitigação de poluentes.

## INTRODUÇÃO AOS VÍRUS ENTÉRICOS E POLUENTES AMBIENTAIS

A gastroenterite aguda é um dos problemas de saúde mais comuns em todo o mundo. Grupos diversificados de patógenos virais, bacterianos e parasitas podem causar sintomas entéricos agudos, incluindo náuseas, vômitos, dor abdominal, febre e diarreia aguda (Stuempfig & Seroy, 2023).

Os patógenos virais responsáveis pelas gastroenterites virais permaneceram desconhecidos até a década de 1970. Entretanto, estudos utilizando microscopia eletrônica do conteúdo intestinal resultaram na descoberta de numerosos enteropatógenos virais, como os norovírus, rotavírus, astrovírus e adenovírus entéricos (Kirkwood, 2008).

O norovírus humano (HNoV) pertence à família *Calicivirus* e aos genogrupos I, II, IV, XVIII e XIX do gênero *Norovirus* (Chhabra et al., 2019). Eles são responsáveis pela causa mais significativa de gastroenterite aguda, causando cerca de 200.000 mortes em todo o mundo (Brunette & Nemhauser, 2019). O rotavírus, por sua vez, pertence à família *Sedoreoviridae* e é um vírus de RNA de fita dupla nomeado devido à aparência de roda de seu capsídeo viral (ICTV, 2022). Embora o rotavírus tenha sido postulado como a principal causa de doenças infantis ao redor do mundo, a introdução da vacina oral, em 2006, contribuiu para a queda drástica no número e na gravidade dos casos de gastroenterites registrados que já chegou a causar cerca de 440.000 mortes em crianças com menos de cinco anos de idade no mundo todo (Parashar et al., 2003). Os astrovírus foram identificados pela primeira vez em 1975 e

receberam este nome com base na aparência característica de 5 ou 6 pontas observada por microscopia eletrônica (Appleton et al., 1977; Madeley, 1975). Os astrovírus são vírus esféricos, sem envelope, com um genoma de RNA de fita simples e sentido positivo e classificados dentro sua própria família, *Astroviridae*, com oito sorotipos identificados (Meyer et al., 2021; Monroe et al., 1993). Os casos de gastroenterites associados ao astrovírus ocorrem tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento e são mais comuns entre crianças com menos de dois anos de idade (Krishnan, 2014; Olortegui et al., 2018).

Visto que os adenovírus são responsáveis, majoritariamente, por doenças do trato respiratório, a sua identificação em amostras fecais de crianças com diarreia levou a comunidade científica a alguns questionamentos. Ao contrário dos adenovírus respiratórios, os adenovírus entéricos eram fastidiosos e eventualmente foram classificados dentro de seu próprio grupo (Bishop & Kirkwood, 2008). Os adenovírus são membros da família *Adenoviridae* e do gênero *Mastadenovirus*. Os 90 genótipos sorotipos identificados são divididos em 9 subgrupos (A–I), sendo que sorotipos 40 e 41 são os únicos membros do subgrupo F e que agrupam os adenovírus entéricos associados à gastroenterite em humanos (De Jong et al., 1983; Gary et al., 1979), enquanto os demais subgrupos infectam o trato respiratório (Human Adenovirus Working Group, 2018; ICTV, 2018). Os adenovírus entéricos possuem genoma de DNA de fita dupla, não possuem envelope, são icosaédricos e possuem tamanho variando de 70 a 80 nm.

Os vírus apresentados acima são predominantemente transmitidos via fecal-oral, incluindo a contaminação de alimentos e água. Além disso, eles podem ser transmitidos por fômites, vômito e possivelmente através de aerossóis, especialmente no caso de vírus como o norovírus humano e o rotavírus (De Graaf et al., 2016; Kumthip et al., 2019; Roach & Langlois, 2021; Stuempfig & Seroy, 2023). Portanto, é fundamental compreender as diferentes interações estabelecidas entre os poluentes ambientais e os vírus entéricos, que podem afetar sua capacidade de sobrevivência, transmissão e infecciosidade.

A característica distintiva dos vírus entéricos é a falta de um envelope lipídico, o que lhes confere uma notável capacidade de sobrevivência no ambiente. No entanto, a presença de poluentes químicos pode ter impacto na persistência desses vírus, tornando-os potencialmente mais resistentes aos processos de desinfecção (Waldman et al., 2017). A presença de poluentes químicos em animais marinhos também pode aumentar o tempo de sobrevivência dos vírus entéricos nos órgãos desses animais (Fiorito et al., 2019). Dessa forma, se estes animais forem consumidos crus ou mal-cozidos, podem atuar como veículos para vírus entéricos, podendo levar a infecções humanas. Além dos poluentes químicos, superfícies plásticas presentes no solo, em água doce e em ambientes marinhos também podem contribuir na sobrevivência e persistência de patógenos virais humanos (Moresco et al., 2021; Moresco et al., 2022).

A interação entre vírus entéricos e poluentes ambientais tem implicações significativas para a saúde pública. Dessa forma, se torna imprescindível o monitoramento e controle da contaminação viral e da poluição ambiental a fim de prevenir surtos virais transmitidos pela água e pelos alimentos. Os estudos neste campo estão em desenvolvimento, à medida que os cientistas continuam a explorar as complexas interações entre vírus entéricos e poluentes

ambientais para o desenvolvimento de estratégias eficazes para mitigar os riscos associados às infecções virais transmitidas pela água e pelos alimentos.

Os vírus entéricos demonstram uma notável estabilidade em ambientes aquáticos, especialmente quando se ligam a partículas sólidas, como discutido por outros artigos (Bosch, 1998, Okoh et al., 2010; Seitz et al., 2011). A adsorção a essas partículas sólidas desempenha um papel crucial na dispersão dos vírus ao longo dos sistemas aquáticos e na subsequente sedimentação e acúmulo de partículas virais nos sedimentos, onde podem persistir por longos períodos (Goyal et al., 1984; Hassard et al., 2016).

Vale ressaltar que os vírus entéricos possuem doses infecciosas extremamente baixas, sendo assim, a dose infecciosa para o NoV é de apenas 18 partículas virais, enquanto para o RV, é necessária apenas 1 unidade formadora de placa (UFP) para infectar 25% dos adultos suscetíveis (Hall, 2012; Yezli & Otter, 2011). Devido a essas baixas doses infecciosas, o uso de água não tratada de fontes ambientais frequentemente resulta em surtos de doenças virais, mesmo em situações de contaminação mínima, como enfatizado por Sinclair e colaboradores em 2009. Além disso, o risco de transmissão de vírus entéricos não está restrito ao contato com água poluída. Também está associado ao consumo de moluscos bivalves, mexilhões, ostras e vieiras, que são cultivados e colhidos em águas contaminadas por vírus (Bellou et al., 2012; Lees, 2000).

## **PERSISTÊNCIA VIRAL EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS**

A contaminação de ambientes aquáticos acarreta uma ampla gama de problemas que afetam tanto os seres vivos quanto o meio ambiente. Um dos fenômenos de maior urgência nesse contexto é a persistência viral em ambientes aquáticos contaminados, uma preocupação crítica nos domínios da saúde pública e da saúde única. Vírus patogênicos e bacteriófagos têm a capacidade de permanecer ativos e infecciosos durante períodos prolongados em corpos d'água poluídos (Crank et al., 2019; Upfold et al., 2021). A presença e estabilidade dos vírus depende de fatores físico-químicos da água, como temperatura, teor de matéria orgânica e salinidade (Skraber et al., 2009).

Sabe-se que os vírus entéricos são transportados ao longo dos corpos d'água, e podem adsorver em matéria sólida ou se acumular nos sedimentos (Hassard et al., 2016). Em ambientes contaminados por esgoto, resíduos industriais e agroindustriais, a persistência viral pode ser ainda mais acentuada, aumentando os riscos para a saúde humana e de animais de criação, especialmente quando a água é utilizada para abastecimento e recreação (Chatziprodromidou et al., 2018).

No geral, os vírus entéricos, incluindo os norovírus e outros membros das famílias *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae* e *Adenoviridae*, são os principais grupos virais associados às infecções transmitidas pela água (Farkas et al., 2020). A principal via de transmissão dos vírus entéricos ocorre por meio de água e alimentos contaminados, através da rota fecal-oral, especialmente quando o esgoto não tratado é liberado no meio ambiente, resultando na poluição ambiental e, conseqüentemente, em uma maior prevalência desses

vírus (Upfold et al., 2021).

Sabe-se, por exemplo, que os vírus entéricos podem aderir às partículas de biofilme bacteriano presentes nos ambientes aquáticos. Esse fenômeno pode aumentar a persistência dos vírus no ambiente, uma vez que há indícios de que o biofilme pode desempenhar um papel na liberação dos vírus em momentos em que o patógeno não está mais presente na água (Skraber et al., 2009). Além disso, a poluição por microplásticos é uma ocorrência comum em diversos ambientes, incluindo os aquáticos, devido à ampla utilização de materiais plásticos em todo o mundo (Moresco et al., 2021).

Neste sentido, Moresco e colaboradores (2022) demonstraram que microplásticos contaminantes de águas superficiais podem ser colonizados por biofilme microbiano, formando comunidades de “plasticíferas” que podem persistir por mais tempo no meio ambiente. Vírus associados aos pellets microplásticos colonizados por biofilme eram mais estáveis em comparação com aqueles que permaneciam na água. Os vírus utilizados no estudo foram o rotavírus (RV) e o bacteriófago envelopado Phi6 e ambos apresentaram diferentes níveis de estabilidade quando associados a pellets microplásticos colonizados por biofilme. Embora as partículas infecciosas e as cópias do genoma do RV tenham permanecido estáveis durante um período de amostragem de 48 horas, a estabilidade do Phi6 foi altamente impactada, com uma redução variando de 2,18 a 3,94  $\log_{10}$ .

Além disso, a produção de biofilmes por bactérias pode desempenhar um papel crucial na proteção de vírus entéricos contra variações de temperatura e nos tratamentos comuns usados na desinfecção da água potável. O estudo desenvolvido por Waldman e colaboradores (2017) revelou que a adição de compostos bacterianos, como lipopolissacarídeo (LPS) ou peptidoglicano (PG) presentes na parede celular bacteriana, estabilizam o capsídeo viral a partir do fornecimento da proteção térmica. A proteção, no entanto, não foi tão eficiente quando os testes foram direcionados ao genoma dos vírus. Além disso, cada interação mostrou ser específica para o sorotipo viral, sugerindo que a sequência proteica do capsídeo viral desempenha um papel importante na determinação do nível de proteção conferido pelos compostos bacterianos. Dessa forma, o estudo fornece informações sobre os mecanismos potenciais pelos quais os vírus entéricos podem persistir nas fontes de água e causar surtos de doenças transmitidas pela água.

De modo similar, bacteriófagos causadores de gastroenterites também se incorporam em biofilmes, o que aumenta sua persistência. Em seus estudos, Storey e Ashbolt (2001) descobriram que havia uma subpopulação mais persistente de fagos adsorvidos no biofilme em teste, que pode ter persistido por um tempo considerável. A presença de vírions entéricos associados ao biofilme em sistemas de distribuição de água podem representar riscos potenciais à saúde se grupos de biofilme se separarem e chegarem aos consumidores por meio da ingestão ou inalação de água contaminada.

Wasonga, Maingi e Omwoyo (2021) avaliaram a associação entre contaminantes químicos específicos das águas superficiais e contaminação por vírus entéricos, adenovírus (HAdV) e enterovírus. O metal Cd teve uma relação positiva fraca e significativa com a detecção de

HAdV, enquanto os metais Pb e o Fe tiveram uma relação positiva fraca e significativa com a detecção do genoma de enterovírus. Estes três metais estão envolvidos na manutenção da estrutura e funções do vírus, podendo, assim, influenciar a estabilidade e a sobrevivência das partículas virais (Chaturvedi & Shrivastava, 2005). Por outro lado, houve uma relação negativa entre a presença de íons fosfato e a detecção de HEV. Estes três metais pesados desempenham um papel significativo na preservação da estrutura e das funções do vírus, podendo, assim, influenciar a estabilidade e a sobrevivência do vírus. Os fosfatos desempenham um papel na interação entre proteínas e ácidos nucleicos, e, portanto, podem influenciar a estabilidade viral no ambiente (Auffinger et al., 2004).

## **POLUENTES DO SOLO E SUA INFLUÊNCIA NA TRANSMISSÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS**

Dentre os recursos naturais mais importantes para a humanidade, o solo desempenha um papel crucial na produção de alimentos e na preservação do ecossistema, fornecendo nutrientes essenciais para o crescimento das plantas e interagindo com microrganismos. Contudo, a crescente contaminação do solo por poluentes químicos da indústria e agricultura representa um desafio, já que os microrganismos presentes no solo podem interagir de forma direta ou indireta com os nutrientes e resíduos disponíveis, que podem ser favoráveis ao crescimento dos patógenos que geram infecções gastrointestinais. Essas infecções, causadas por vírus do solo, não apenas afetam a saúde global, mas também resultam em perdas na produção agrícola e geram custos significativos para a economia e saúde pública (Gauthier et al., 2023; Revilla-Chávez et al., 2021).

A quantificação da presença de vírus nos solos é desafiadora devido à diversidade dos solos, às limitações tecnológicas, escassez de informações em bancos de dados sobre genes virais do solo, abordagens bioinformáticas limitadas e a complexa heterogeneidade das matrizes encontradas. A metagenômica viral, conhecida como virômica, permite a análise do material genético viral, sendo uma ferramenta para compreender a diversidade e dinâmica viral em diferentes ambientes terrestres (Jansson & Wu, 2022; Roux & Emerson, 2022).

Os vírus possuem grande importância no controle de patógenos na forma de bacteriófagos, além de contribuir na liberação de carbono orgânico durante os ciclos de infecção e lise. Contudo, alguns vírus encontrados nos solos e cultivos podem apresentar patogenicidade para as plantas e seres humanos (Bora et al., 2022). O uso de lodo ou águas para irrigação contaminados podem ser fontes de transmissão de vírus entéricos para o ambiente, levando a transmissão pela ingestão de alimentos não higienizados adequadamente ou na ineficiência da inativação viral durante o processamento. Os norovírus, adenovírus e o vírus da hepatite A têm sua transmissão normalmente associada ao consumo de folhas verdes e frutas frescas provenientes das lavouras propensas a contaminações ambientais. Outros vírus podem estar relacionados com doenças provenientes da produção agrícola como enterovírus, sapovírus, rotavírus, astrovírus, adenovírus e vírus da hepatite E (Bosch et al., 2018).

Dentre as problemáticas relacionadas à contaminação dos solos, a suinocultura

possui um papel na disseminação de vírus entéricos. Os dejetos dos suínos possuem diversos microrganismos zoonóticos presentes como bactérias patogênicas e vírus, principalmente o vírus da hepatite E e rotavírus do grupo A. Estes patógenos podem penetrar no solo dos locais de produção, infiltrando e chegando a camadas mais profundas, sendo possível alcançarem águas de drenagem e subterrâneas. Além disso, o uso do esterco contaminado em lavouras pode apresentar um potencial infeccioso a partir dos alimentos cultivados. Portanto, águas e alimentos contaminados com esses agentes zoonóticos podem apresentar um potencial risco para a saúde pública e propagação de doenças (Krog et al., 2017).

Os estudos sobre vírus em ambientes terrestres são notavelmente escassos em comparação com os ambientes aquáticos. Vários fatores influenciam a diversidade viral nesses ecossistemas, incluindo o pH e a umidade do solo. Perturbações causadas por mudanças climáticas, poluição química e desflorestação podem exercer pressões seletivas e desequilibrar a microdiversidade viral. O setor agrícola, em particular, está sob grande estresse devido às atividades humanas, como o uso de fertilizantes, herbicidas e alterações constantes na vegetação (Liao et al., 2022).

Ainda, o descarte de águas residuais, uso de fertilizantes e fundição de minerais pela indústria também provocam prejuízos significativos na dinâmica e funções microbianas. A presença de plásticos ou microplásticos poluentes pode também ser uma via secundária na transmissão, facilitando a sobrevivência e persistência do vírus no ambiente, como já discutido neste capítulo (Moresco et al., 2021). Além disso, diferentes níveis de metais pesados podem reduzir a abundância de vírus que simbioticamente interagem com a vegetação, acelerar a disseminação de genes de resistência a antibióticos, alterar o equilíbrio entre bactérias e vírus e disseminar genes de resistência e patogenicidade viral (Wu et al., 2023).

A principal fonte de poluição do solo com vírus entéricos é o esgoto, e pequenas quantidades podem contaminar vastas extensões de água, representando um risco de infecções em humanos, devido à sua baixa dose infecciosa (Gholipour et al., 2022). Esse desafio é especialmente agravado em países com baixa cobertura de tratamento de esgoto, como o Brasil, onde aproximadamente 54% das áreas urbanas carecem de tratamento adequado (Governo Federal, 2020). Nesses casos, a contaminação direta de rios e solo pelo esgoto amplifica significativamente a poluição em áreas extensas.

A associação de partículas orgânicas com vírus entéricos desempenha um papel crucial na redução significativa do seu decaimento, proporcionando uma camada protetora adicional ao capsídeo viral. Essa ligação ocorre devido a interações eletroquímicas, resultando na estabilização da estrutura viral e na diminuição da interação com outros estressores ambientais (Guo et al., 2022, Yang et al., 2022). Uma análise de adenovírus humano (HAdV) em esgoto revelou que esses vírus podem persistir no ambiente por períodos prolongados, especialmente em locais de pouca exposição à luz ultravioleta (Schwarz et al., 2019). Além disso, alguns vírus entéricos podem se agrupar em vesículas encapsuladas, tornando-os mais resistentes aos desafios ambientais e à desinfecção por UV 254 (Zhang et al., 2021). Outra via de contaminação do solo por vírus entéricos ocorre devido ao descarte inadequado de carcaças

e vísceras de animais, tanto por abatedouros industriais quanto familiares, representando uma fonte de contaminação não apenas para seres humanos, por meio de vírus zoonóticos, mas também para outros animais (Franke-Whittle & Insam, 2012).

A composição química varia consideravelmente entre diferentes tipos de solo, e esse fator exerce influência significativa na afinidade dos vírus por partículas do solo (Zhuang & Jin, 2003). Portanto, dependendo do solo em questão e da cepa viral envolvida, esses patógenos podem potencialmente atingir e contaminar as águas subterrâneas destinadas ao consumo humano (Pang et al., 2021). É fundamental adotar precauções ao descartar componentes que contenham vírus entéricos, devido ao risco de contaminação ambiental e humana. Os estudos nesta área são limitados, tornando essencial uma melhor compreensão do comportamento dos vírus entéricos no solo e de sua estabilidade em diversas condições, como tipo de solo, precipitação e temperatura. Essa compreensão mais profunda possibilitará o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para esses poluentes e práticas de descarte mais seguras.

## **PERSISTÊNCIA E TRANSMISSÃO AÉREA DE VÍRUS ENTÉRICOS**

Devido ao tropismo gastrointestinal, os vírus entéricos são excretados em grandes concentrações nas fezes de indivíduos infectados (10<sup>5</sup> - 10<sup>11</sup>), o que resulta em sua expressiva presença em efluentes domésticos (Prez et al., 2015). A tecnologia empregada nas estações de tratamento esgoto (ETE) convencionais é ineficaz na completa remoção das partículas virais, tornando as águas residuais tratadas uma potencial fonte de partículas virais viáveis, como apresentado neste capítulo (Clarke et al., 2017; Moazeni et al., 2017). Uma vez no ambiente, os vírus entéricos podem ser transportados via água, solo e cultivos, mas, ainda hoje, são poucos os estudos que objetivam avaliar a persistência de vírus entéricos na atmosfera (Barker et al., 2013; Santamaria & Toranzos, 2003).

Muitos vírus são propagados via aerossol, que são gerados a partir de pequenas gotículas de água (Molle et al., 2016). Estes estudos que avaliam a presença e viabilidade de vírus entéricos em meios líquidos são úteis para predições sobre o destino dos vírus entéricos quando aerossolizados na atmosfera (Courault et al., 2017). A expressiva concentração de vírus entéricos em ETE, aliado ao fato de que não são completamente removidos, torna a aerossolização emitida através da aeração mecânica e difusa um potencial risco para a saúde dos trabalhadores e residentes do entorno da ETE (Clarke et al., 2017; Moazeni et al., 2017; Pasalari et al., 2019; Uhrbrand et al., 2017).

A infecção por norovírus, também conhecida como “doença do vômito do inverno”, tem na aerossolização do vômito uma das principais fontes de transmissão, enquanto a limpeza direta de evacuações líquidas não aumenta o risco do desenvolvimento de gastroenterite (Nordgren & Svensson, 2019; Sánchez & Bosch, 2016). Os vírus entéricos propagados por gotículas respiratórias de indivíduos infectados podem permanecer viáveis por meses no ambiente aquático, e tornar-se novamente presentes no ar dependendo das condições meteorológicas como temperatura, radiação solar, umidade e vento (Carducci et al., 2011; Gerba & Smith, 2005; Wan et al., 2012).

Entre os principais fatores que afetam a estabilidade das partículas virais em aerossóis estão a temperatura, pH, umidade relativa e absoluta do ar, tamanho da partícula de aerossol, composição da suspensão, exposição à luz solar, qualidade do ar e o tipo viral (Sánchez & Bosch, 2016). Sabe-se que a exposição à radiação ultravioleta, assim como a altas concentrações de ozônio, pode danificar a estrutura viral (Lazarova et al., 2013; Nuanualsuwan et al., 2008). A temperatura também representa um fator importante, pois, enquanto altas temperaturas são eficazes na inativação viral, os vírus entéricos são fortemente resistentes à temperaturas ambientais mais baixas (Bertrand et al., 2012; Pintó et al., 2010).

O mecanismo de inativação viral em partículas em suspensão no ar ainda é pouco elucidado, mas sabe-se que a umidade relativa da atmosfera parece possuir um papel significativo na persistência viral. Altas taxas de umidade relativa do ar conferem um efeito protetor aos vírions em partículas aerossolizadas (Yeargin et al., 2016). A baixa umidade relativa degrada a partícula viral ao passo em que remove moléculas de água necessárias para a integridade de componentes estruturais (Sánchez & Bosch, 2016). O RNA infeccioso de Picornavirus pode ser detectado em todos os níveis de umidade, sugerindo que a inativação viral é causada justamente pelo dano no capsídeo (Sanchez & Bosch, 2016).

Dentre os vírus entéricos, o vírus da Hepatite A e o rotavírus são mais resistentes à inativação por desidratação do que adenovírus, astrovírus e poliovírus (Roos, 2020). Sanchez e Bosch (2016) determinaram que o Poliovírus é mais estável em partículas aerossolizadas em atmosferas com uma alta umidade relativa do que com taxas mais baixas, em uma mesma temperatura de 22°C. Quanto ao norovírus, estudos como o de Colas de la Noue e colaboradores (2014) demonstraram que o modelo de estudo viral substituto (Norovírus Murino) possui maior capacidade infecciosa, ou seja, as partículas virais realizam ligação forte com moléculas presentes nas células epiteliais do trato gastrointestinal quando estão sob umidades relativas extremas (10% e 100%). Em valores de umidade relativa média entre 25% e 85% a infectividade do modelo viral murino é prejudicada.

No caso dos vírus envelopados, a bicamada lipídica fornece proteção através do potencial hidrofílico das glicoproteínas de membrana, retendo moléculas de água que são essenciais para manter a estrutura da bicamada. Ao mesmo tempo, devido à necessidade de hidratação da partícula viral envelopada, a baixa umidade relativa da atmosfera é um fator inativante para vírus como o da influenza (Weber & Stilianakis, 2008). As glicoproteínas, frequentemente encontradas no envelope, fornecem capacidade de ligação de hidrogênio, aumentando a retenção de moléculas de água e fornecendo proteção contra a perda de atividade das partículas virais (Roos, 2020).

A atmosfera contém diversos materiais particulados, tanto orgânicos, como a aerossolização advinda de ETE, de evacuações líquidas intensas ou de gotículas respiratórias, quanto inorgânicos, como poeira de solo, partículas minerais e sais inorgânicos (Ghio et al., 2012). Os vírus entéricos tendem a percorrer maiores distâncias, e a permanecerem viáveis por longos períodos, quando estão aderidos a partículas suspensas na atmosfera (Rzeżutka & Cook, 2004). Seu tamanho reduzido e a tendência a aderir-se a partículas mais finas garantem sua

persistência contra fatores de inativação presentes no ambiente (Tseng & Li, 2005). O estudo de Gonzalez-Martin e colaboradores (2018) em um conjunto de ilhas próximas ao continente africano detectou a presença de enterovírus e rotavírus em 15,4% e 36,9% das amostras de ar coletadas. Apesar da detecção de vírus entéricos como adenovírus, enterovírus e rotavírus em partículas inorgânicas na atmosfera, até o momento não há estudos que comprovem a existência de casos ou surtos de gastroenterites que apontam a atmosfera como rota de transmissão (Dennehy et al., 1998; Gonzalez-Martin et al., 2018; Lin et al., 2002).

Uma das principais dificuldades em avaliar a persistência de vírus entéricos na atmosfera é realizar a coleta de amostras de partículas consideravelmente ínfimas (30 nm até 1 µm no caso de agregados) (Verreault et al., 2008). Métodos para realizar a avaliação da contaminação viral em matrizes aquáticas ou sólidas, como plantas ou solo, são bem difundidos e apresentam resultados satisfatórios de recuperação viral (Bosch et al., 2008; Bosch et al., 2010). A captura e caracterização de vírus no ar já é mais complexa. Dentre os métodos mais aplicados estão a precipitação eletrostática e a impactação em meio líquido e meio sólido (Zhao et al., 2011).

A precipitação eletrostática é uma metodologia de amostragem empregada para capturar partículas em suspensão no ar, como poluentes atmosféricos, poeira fina, partículas orgânicas e inorgânicas e microrganismos (Nunes, 2005). Este método se baseia na utilização de um campo elétrico gerado por meio de eletrodos (Wen et al., 2015). As partículas suspensas, sob influência do campo elétrico, são atraídas em direção aos eletrodos, depositando-se onde podem ser posteriormente coletadas. Este método, apesar de apresentar eficácia, varia dependendo da carga das partículas e da intensidade das condições meteorológicas locais (EPA, 2016; Zukeran et al., 2018).

A metodologia de coleta por meio de impactação em meio líquido se baseia no bombeamento do ar amostrado para o interior de um frasco, passando através de um líquido no qual as partículas ficam suspensas. Este líquido pode ser então utilizado para avaliação de microrganismos (Nunes, 2005). Tanto a colisão em meio líquido quanto a precipitação eletrostática possuem alguns inconvenientes, como a possível degradação das partículas virais, o que leva a problemas de análise, e a grande variação na eficiência de captura de partículas (Verreault et al., 2008; West & Kimber, 2015).

## **ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E MITIGAÇÃO**

A preocupação em relação aos poluentes emergentes, como microplásticos, poluentes químicos e metais pesados, juntamente com a presença de agentes virais em diversos ambientes, está crescendo devido à possível associação entre esses fatores e o aumento da estabilidade, infectividade e sobrevivência de vírus. Esse cenário levanta sérias preocupações, já que a liberação desses vírus pode impactar negativamente o ambiente natural e comprometer os recursos de água potável, por exemplo. Dessa forma, estratégias de mitigação e prevenção de micro e macropoluentes devem ser adotadas a fim de evitar a persistência viral no ambiente.

Algumas pesquisas já evidenciaram a mitigação de micropoluentes utilizando processos descentralizados de tratamento de águas residuais, como zonas úmidas construídas para a

remoção de antibióticos (Ávila et al., 2021) e produtos farmacêuticos (Sochacki et al., 2018), processos biológicos para a remoção de propilparabeno (Song et al., 2017), biorreatores de membrana (MBRs) para a remoção de produtos farmacêuticos (Beier et al., 2011) e sorção (nanotubo magnético de carbono) para remoção de polietileno, tereftalato de polietileno, poliamida (Tang et al., 2021). Além de evidências de métodos de biorremediação, como bioestimulação, atenuação natural e bioaumento eficientes na eliminação de pesticidas no solo (Karimi et al., 2021).

Um estudo que buscou apresentar o papel mecanicista dos contaminantes associados à poeira da estrada na propagação de vírus e outros microrganismos patogênicos, como elementos potencialmente tóxicos (metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), microplásticos, emissões de escape, e emissões de não escape, classificou, em medidas tecnológicas e não tecnológicas, estratégias para prevenir e mitigar poluentes da poeira da estrada. Dentre as estratégias de prevenção de metais pesados não tecnológicas, podem ser citadas a educação pública e gerenciamento e proibição do amianto nas pastilhas de freio e como medida de mitigação, a supressão de poeira. Dentre as estratégias de prevenção de metais pesados tecnológicas, estão escavação (remoção física) e o uso de plantas (biorremediação) e como medida de mitigação, o uso de biosensores, coagulação e floculação (Alex et al., 2023; Piscitello et al., 2021).

Diante das indagações realizadas ao longo deste texto, consuma-se que a implementação de estratégias para mitigar e prevenir a presença de contaminantes ambientais é crucial para promover a harmonia e equilíbrio nos ecossistemas. Além disso, compreender como micro e macropoluentes influenciam a sobrevivência e disseminação de patógenos virais relevantes pode impulsionar a criação de novas abordagens para mitigar e prevenir essas questões.

## REFERÊNCIAS

Alex, F. J., Tan, G., Kyei, S. K., Ansah, P. O., Agyeman, P. K., Fayzullayevich, J. V., & Olayode, I. O. (2023). Transmission of viruses and other pathogenic microorganisms via road dust: Emissions, characterization, health risks, and mitigation measures. *Atmospheric Pollution Research*, 14(1), 101642. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2022.101642>

Appleton, H., Buckley, M., Thom, B. T., Cotton, J. L., & Henderson, S. (1977). Virus-Like Particles In Winter Vomiting Disease. *The Lancet*, 309(8008), 409–411. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)92614-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)92614-9)

Auffinger, P., Bielecki, L., & Westhof, E. (2004). Anion binding to nucleic acids. *Structure*, 12(3), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.015>

Ávila, C., García-Galán, M. J., Borrego, C. M., Rodríguez-Mozaz, S., García, J., & Barceló, D. (2021). New insights on the combined removal of antibiotics and ARGs in urban wastewater through the use of two configurations of vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 755, 142554. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142554>

Barker, S. F. (2013). Risk of norovirus gastroenteritis from consumption of vegetables irrigated with highly treated municipal wastewater—evaluation of methods to estimate sewage

quality. *Risk Analysis*, 34(5), 803–817. <https://doi.org/10.1111/risa.12138>

Beier, S., Cramer, C., Köster, S., Mauer, C., Palmowski, L., Schröder, H. Fr., & Pinnekamp, J. (2011). Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. *Water Science and Technology*, 63(1), 66–71. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.010>

Bellou, M., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2012). Shellfish-Borne viral outbreaks: A systematic review. *Food and Environmental Virology*, 5(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9097-6>

Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A. M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N., & Gantzer, C. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1059–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x>

Bishop, R. F., & Kirkwood, C. D. (2008). Enteric viruses. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 116–123). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00386-1>

Bora, S. S., Naorem, R. S., Hazarika, D. J., Dasgupta, A., Churaman, A., Gogoi, M., & Barooah, M. (2022). Agricultural land use influences bacteriophage community diversity, richness, and heterogeneity. *Current Microbiology*, 80(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03129-4>

Bosch, A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*, 1(3), 191–196.

Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., & Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>

Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Pintó, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>

Bosch, A., Sánchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., Le Guyader, F. S., Netshikweta, R., Pintó, R. M., van der Poel, W. H. M., Rutjes, S., Sano, D., Taylor, M. B., van Zyl, W. B., Rodríguez-Lázaro, D., Kovač, K., & Sellwood, J. (2010). Analytical methods for virus detection in water and food. *Food Analytical Methods*, 4(1), 4–12. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-91615>

Brunette, G. W., & Nemhauser, J. B. (2019). Travel-Related Infectious Diseases . CDC. Gov. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/norovirus>

Carducci, A., Verani, M., Lombardi, R., Casini, B., & Privitera, G. (2011). Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *Journal of Hospital Infection*, 77(3), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.10.010>

Chaturvedi, U. C., & Shrivastava, R. (2005). Interaction of viral proteins with metal ions: Role in maintaining the structure and functions of viruses. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 43(2), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.11.004>

Chatziprodromidou, I. P., Bellou, M., Vantarakis, G., & Vantarakis, A. (2018). Viral outbreaks linked to fresh produce consumption: A systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 124(4), 932–942. <https://doi.org/10.1111/jam.13747>

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, 100(10), 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>

Clarke, R., Peyton, D., Healy, M. G., Fenton, O., & Cummins, E. (2017). A quantitative microbial risk assessment model for total coliforms and *E. coli* in surface runoff following application of biosolids to grassland. *Environmental Pollution*, 224, 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.025>

Colas de la Noue, A., Estienney, M., Aho, S., Perrier-Cornet, J.-M., de Rougemont, A., Pothier, P., Gervais, P., & Belliot, G. (2014). Absolute humidity influences the seasonal persistence and infectivity of human norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7196–7205. <https://doi.org/10.1128/aem.01871-14>

Courault, D., Albert, I., Perelle, S., Fraisse, A., Renault, P., Salemhour, A., & Amato, P. (2017). Assessment and risk modeling of airborne enteric viruses emitted from wastewater reused for irrigation. *Science of The Total Environment*, 592, 512–526. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.105>

Crank, K., Petersen, S., & Bibby, K. (2019). Quantitative microbial risk assessment of swimming in sewage impacted waters using crassphage and pepper mild mottle virus in a customizable model. *Environmental Science & Technology Letters*, 6(10), 571–577. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00468>

de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.201648>

De Jong, J. C., Kapsenberg, J. G., Muzerie, C. J., Wermenbol, A. G., Kidd, A. H., Wadell, G., Firtzlaff, R. -g., & Wigand, R. (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41: Fastidious adenoviruses from human infant stool. *Journal of Medical Virology*, 11(3), 215–231. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890110305>

Dennehy, P. H., Nelson, S. M., Crowley, B. A., & Saracen, C. L. (1998). Detection of rotavirus RNA in hospital air samples by polymerase chain reaction (PCR) • 828. *Pediatric Research*, 43(4), 143–143. <https://doi.org/10.1203/00006450-199804001-00849>

Environmental Protection Agency (EPA). (2016). Monitoring by control technique - Electrostatic precipitators. US EPA. <https://www.epa.gov/air-emissions-monitoring-knowledge-base/monitoring-control-technique-electrostatic-precipitators>

Farkas, K., Walker, D. I., Adriaenssens, E. M., McDonald, J. E., Hillary, L. S., Malham, S.

- K., & Jones, D. L. (2020). Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 181, 115926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115926>
- Fiorito, F., Amoroso, M. G., Lambiase, S., Serpe, F. P., Bruno, T., Scaramuzza, A., Maglio, P., Fusco, G., & Esposito, M. (2019). A relationship between environmental pollutants and enteric viruses in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental Research*, 169, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.001>
- Franke-Whittle, I. H., & Insam, H. (2012). Treatment alternatives of slaughterhouse wastes, and their effect on the inactivation of different pathogens: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 139–151. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2012.694410>
- Gary, G. W., Jr., Hierholzer, J. C., & Black, R. E. (1979). Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: A new subgroup of human adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(1), 96–103. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.1.96-103.1979>
- Gauthier, K., Pankovic, D., Nikolic, M., Hobert, M., Germeier, C. U., Ordon, F., Perovic, D., & Niehl, A. (2023). Nutrients and soil structure influence furovirus infection of wheat. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1200674>
- Gerba, C. P., & Smith, J. E. (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *Journal of Environmental Quality*, 34(1), 42–48. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0042a>
- Ghio, A. J., Carraway, M. S., & Madden, M. C. (2012). Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632359>
- Gholipour, S., Ghalhari, M. R., Nikaeen, M., Rabbani, D., Pakzad, P., & Miranzadeh, M. B. (2022). Occurrence of viruses in sewage sludge: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 824, 153886. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153886>
- Gonzalez-Martin, C., Coronado-Alvarez, N. M., Teigell-Perez, N., Diaz-Solano, R., Exposito, F. J., Diaz, J. P., Griffin, D. W., & Valladares, B. (2018). Analysis of the impact of African dust storms on the presence of enteric viruses in the atmosphere in Tenerife, Spain. *Aerosol and Air Quality Research*, 18(7), 1863–1873. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2017.11.0463>
- Governo Federal. (2020). Cobertura de água e esgoto cresce no Brasil. Portal Governo Federal. <https://www.google.com/url?q=https://www.gov.br/pt-br/noticias/assistencia-social/2020/12/cobertura-de-agua-e-esgoto-cresce-no-brasil&sa=D&source=docs&ust=1698843526645589&usg=AOvVawI49wk8G3HKB5nRjOI-IIng>
- Goyal, S. M., Adams, W. N., O'Malley, M. L., & Lear, D. W. (1984). Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the Middle Atlantic region. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 758–763. <https://doi.org/10.1128/aem484758-763.1984>
- Guo, Y., Sivakumar, M., & Jiang, G. (2022). Decay of four enteric pathogens and implications to wastewater-based epidemiology: Effects of temperature and wastewater dilutions. *Science of The Total Environment*, 819, 152000. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152000>
- Hall, A. J. (2012). Noroviruses: The perfect human pathogens? *Journal of Infectious*

Diseases, 205(11), 1622–1624. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis251>

Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D. L., McDonald, J. E., & Malham, S. K. (2016). Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments—a review. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>

Human Adenovirus Working Group. (2018). HAdV Working Group. <http://hadv.wg.gmu.edu/>

ICTV. (2018). Current ICTV taxonomy release. ICTV. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

ICTV. (2022). Order:Reovirales. ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/reovirales/reovirales>

Jansson, J. K., & Wu, R. (2022). Soil viral diversity, ecology and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 296–311. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00811-z>

Karimi, H., Mahdavi, S., Asgari Lajayer, B., Moghiseh, E., Rajput, V. D., Minkina, T., & Astatkie, T. (2021). Insights on the bioremediation technologies for pesticide-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 44(4), 1329–1354. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01081-z>

Krishnan, T. (2014). Novel human astroviruses: Challenges for developing countries. *Virus Disease*, 25(2), 208–214. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-02023>

Krog, J. S., Forslund, A., Larsen, L. E., Dalsgaard, A., Kjaer, J., Olsen, P., & Schultz, A. C. (2017). Leaching of viruses and other microorganisms naturally occurring in pig slurry to tile drains on a well-structured loamy field in Denmark. *Hydrogeology Journal*, 25(4), 1045–1062. <https://doi.org/10.1007/s10040-016-1530-8>

Kumthip, K., Khamrin, P., Ushijima, H., & Maneekarn, N. (2019). Enteric and non-enteric adenoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand, 2011 to 2017. *PLOS ONE*, 14(8), e0220263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220263>

Lazarova, V., Liechti, P.-A., Savoye, P., & Hausler, R. (2013). Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. *Water Reuse*, 3(4), 337–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wrd.2013.007>

Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 81–116. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00248-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00248-8)

Liao, H., Li, H., Duan, C.-S., Zhou, X.-Y., Luo, Q.-P., An, X.-L., Zhu, Y.-G., & Su, J.-Q. (2022). Response of soil viral communities to land use changes. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-02233771-2>

Lin, T.-Y., Chang, L.-Y., Hsia, S.-H., Huang, Y.-C., Chiu, C.-H., Hsueh, C., Shih, S.-R., Liu, C.-C., & Wu, M.-H. (2002). The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: Pathogenesis and management. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement\_2), S52–S57. <https://doi.org/10.1086/338819>

Madeley, C. R., & Cosgrove, B. P. (1975). Viruses In Infantile Gastroenteritis. *The Lancet*, 306(7925), 124. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)900203](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)900203)

Meyer, L., Delgado-Cunningham, K., Lorig-Roach, N., Ford, J., & DuBois, R. M. (2021). Human astrovirus 1–8 seroprevalence evaluation in a United States adult population. *Viruses*, 13(6), 979. <https://doi.org/10.3390/v13060979>

Moazeni, M., Nikaeen, M., Hadi, M., Moghim, S., Mouhebat, L., Hatamzadeh, M., & Hassanzadeh, A. (2017). Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. *Water Research*, 125, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.028>

Molle, B., Tomas, S., Huet, L., Audouard, M., Olivier, Y., & Granier, J. (2016). Experimental approach to assessing aerosol dispersion of treated wastewater distributed via sprinkler irrigation. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 142(9). [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ir.1943-4774.0001039](https://doi.org/10.1061/(asce)ir.1943-4774.0001039)

Monroe, S. S., Jiang, B., Stine, S. E., Koopmans, M., & Glass, R. I. (1993). Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *Journal of Virology*, 67(6), 3611–3614. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3611-3614.1993>

Moresco, V., Charatzidou, A., Oliver, D. M., Weidmann, M., Matallana-Surget, S., & Quilliam, R. S. (2022). Binding, recovery, and infectiousness of enveloped and non-enveloped viruses associated with plastic pollution in surface water. *Environmental Pollution*, 308, 119594. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119594>

Moresco, V., Oliver, D. M., Weidmann, M., Matallana-Surget, S., & Quilliam, R. S. (2021). Survival of human enteric and respiratory viruses on plastics in soil, freshwater, and marine environments. *Environmental Research*, 199, 111367. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111367>

Nordgren, J., & Svensson, L. (2019). Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. *Viruses*, 11(3), 226. <https://doi.org/10.3390/v11030226>

Nuanualsuwan, S., Thongtha, P., Kamolsiripichaiorn, S., & Subharat, S. (2008). UV inactivation and model of UV inactivation of foot-and-mouth disease viruses in suspension. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.014>

Nunes, Z. das G. (2005). Nunes, Z.D. (2005). Estudo da qualidade microbiológica do ar de ambientes internos climatizados. <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8254/2/148.pdf>

Okoh, A. I., Sibanda, T., & Gusha, S. S. (2010). Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(6), 2620–2637. <https://doi.org/10.3390/ijerph7062620>

Olortegui, M. P., Rouhani, S., Yori, P. P., Salas, M. S., Trigoso, D. R., Mondal, D., Bodhidatta, L., Platts-Mills, J., Samie, A., Kabir, F., Lima, A., Babji, S., Shrestha, S. K., Mason, C. J., Kalam, A., Bessong, P., Ahmed, T., Mduma, E., Bhutta, Z. A., ... Kosek, M. N. (2018). Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries. *Pediatrics*, 141(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1326>

Pang, X., Gao, T., Qiu, Y., Caffrey, N., Popadynetz, J., Younger, J., Lee, B. E., Neumann, N., & Checkley, S. (2021). The prevalence and levels of enteric viruses in groundwater of

private wells in rural Alberta, Canada. *Water Research*, 202, 117425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117425>

Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., & Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 9(5), 565–572. <https://doi.org/10.3201/eid0905.020562>

Pasalari, H., Ataei-Pirkooh, A., Aminikhah, M., Jafari, A. J., & Farzadkia, M. (2019). Assessment of airborne enteric viruses emitted from wastewater treatment plant: Atmospheric dispersion model, quantitative microbial risk assessment, disease burden. *Environmental Pollution*, 253, 464–473. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.010>

Pintó, R. M., Costafreda, M. I., Pérez-Rodríguez, F. J., D'Andrea, L., & Bosch, A. (2010). Hepatitis A virus: State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2(3), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s12560-010-90443>

Piscitello, A., Bianco, C., Casasso, A., & Sethi, R. (2021). Non-exhaust traffic emissions: Sources, characterization, and mitigation measures. *Science of The Total Environment*, 766, 144440. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144440>

Prez, V. E., Gil, P. I., Temprana, C. F., Cuadrado, P. R., Martínez, L. C., Giordano, M. O., Masachessi, G., Isa, M. B., Ré, V. E., Paván, J. V., Nates, S. V., & Barril, P. A. (2015). Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Science of The Total Environment*, 538, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.041>

Revilla-Chávez, J. M., Abanto-Rodríguez, C., Guerra Arévalo, W. F., García Soria, D., Guerra Arévalo, H., Domínguez Torrejón, G., & da Silva Carmo, I. L. G. (2021). Allometric models to estimate the volume of Guazuma crinitain forest plantations. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 25–31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.003>

Roach, S. N., & Langlois, R. A. (2021). Intra- and cross-species transmission of astroviruses. *Viruses*, 13(6), 1127. <https://doi.org/10.3390/v13061127>

Roos, Y. H. (2020). Water and pathogenic viruses inactivation—food engineering perspectives. *Food Engineering Reviews*, 12(3), 251–267. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09234-z>

Roux, S., & Emerson, J. B. (2022). Diversity in the soil virosphere: To infinity and beyond? *Trends in Microbiology*, 30(11), 1025–1035. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.05.003>

Rzeżutka, A., & Cook, N. (2004). Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.02.001>

Sánchez, G., & Bosch, A. (2016). Survival of enteric viruses in the environment and food. In *Viruses in Foods* (pp. 367–392). Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978331930723-7\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978331930723-7_13)

Santamaría, J., & Toranzos, G. A. (2003). Enteric pathogens and soil: A short review. *International Microbiology*, 6(1), 5–9. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0096-1>

Schwarz, K. R., Sidhu, J. P. S., Toze, S., Li, Y., Lee, E., Gruchlik, Y., & Pritchard, D. L. (2019). Decay rates of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., F-specific bacteriophage MS2, somatic coliphage and human adenovirus in facultative pond sludge. *Water Research*, 154,

62–71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.027>

Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M. L., Lindesmith, L. C., Baric, R. S., & Moe, C. L. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6884–6888. <https://doi.org/10.1128/aem.05806-11>

Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>

Skraber, S., Ogorzaly, L., Helmi, K., Maul, A., Hoffmann, L., Cauchie, H.-M., & Gantzer, C. (2009). Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research*, 43(19), 4780–4789. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.020>

Sochacki, A., Felis, E., Bajkacz, S., Nowrotek, M., & Miksch, K. (2018). Removal and transformations of diclofenac and sulfamethoxazole in a two-stage constructed wetland system. *Ecological Engineering*, 122, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.07.039>

Song, H., Alfiya, Y., Dubowski, Y., & Friedler, E. (2017). Sorption and biodegradation of propylparaben in greywater by aerobic attached-growth biomass. *Science of The Total Environment*, 598, 925–930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.032>

Storey, M. V., & Ashbolt, N. J. (2001). Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. *Water Science and Technology*, 43(12), 133–138. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0724>

Stuempfig, N. D., & Seroy, J. (2023). Viral gastroenteritis. NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518995/>

Tang, Y., Zhang, S., Su, Y., Wu, D., Zhao, Y., & Xie, B. (2021). Removal of microplastics from aqueous solutions by magnetic carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 406, 126804. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126804>

Tseng, C.-C., & Li, C.-S. (2005). Inactivation of virus-containing aerosols by ultraviolet germicidal irradiation. *Aerosol Science and Technology*, 39(12), 1136–1142. <https://doi.org/10.1080/02786820500428575>

Uhrbrand, K., Schultz, A. C., Koivisto, A. J., Nielsen, U., & Madsen, A. M. (2017). Assessment of airborne bacteria and noroviruses in air emission from a new highly-advanced hospital wastewater treatment plant. *Water Research*, 112, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.046>

Upfold, N. S., Luke, G. A., & Knox, C. (2021). Occurrence of human enteric viruses in water sources and shellfish: A focus on africa. *Food and Environmental Virology*, 13(1), 1–31. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09456-8>

Verreault, D., Moineau, S., & Duchaine, C. (2008). Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 413–444. <https://doi.org/10.1128/mubr.00002-08>

Waldman, P., Meseguer, A., Lucas, F., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2017). Interaction

of human enteric viruses with microbial compounds: Implication for virus persistence and disinfection treatments. *Environmental Science & Technology*, 51(23), 13633–13640. <https://doi.org/10.1021/acs.est7b03875>

Wan, G.-H., Huang, C.-G., Huang, Y.-C., Huang, J.-P., Yang, S.-L., Lin, T.-Y., & Tsao, K.-C. (2012). Surveillance of Airborne Adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae* in a Hospital Pediatric Department. *PLoS ONE*, 7(3), e33974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033974>

Wasonga, M. O., Maingi, J., & Omwoyo, O. (2021). Effects of contamination of freshwater habitat with common heavy metals and anions on the prevalence of human adenoviruses and enteroviruses. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.603217>

Weber, T. P., & Stilianakis, N. I. (2008). Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: A critical review. *Journal of Infection*, 57(5), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.08.013>

Wen, T.-Y., Wang, H.-C., Krichtafovitch, I., & Mamishev, A. V. (2015). Novel electrodes of an electrostatic precipitator for air filtration. *Journal of Electrostatics*, 73, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2014.11.002>

West, J. S., & Kimber, R. B. E. (2015). Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/aab.12191>

Wu, Z., Cai, P., Liang, E., Chen, Q., Sun, W., & Wang, J. (2023). Distinct adaptive strategies and microbial interactions of soil viruses under different metal(loid) contaminations. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132347. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132347>

Yang, W., Cai, C., & Dai, X. (2022). Interactions between virus surrogates and sewage sludge vary by viral analyte: Recovery, persistence, and sorption. *Water Research*, 210, 117995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117995>

Yeargin, T., Buckley, D., Fraser, A., & Jiang, X. (2016). The survival and inactivation of enteric viruses on soft surfaces: A systematic review of the literature. *American Journal of Infection Control*, 44(11), 1365–1373. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.018>

Yezli, S., & Otter, J. A. (2011). Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. *Food and Environmental Virology*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7>

Zhang, M., Ghosh, S., Kumar, M., Santiana, M., Bleck, C. K. E., Chaimongkol, N., Altan-Bonnet, N., & Shuai, D. (2021). Emerging Pathogenic Unit of Vesicle-Cloaked Murine Norovirus Clusters is Resistant to Environmental Stresses and UV254 Disinfection. *Environmental Science & Technology*, 55(9), 6197–6205. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01763>

Zhao, Y., Aarnink, A. J. A., Doornenbal, P., Huynh, T. T. T., Koerkamp, P. W. G. G., Landman, W. J. M., & de Jong, M. C. M. (2011). Investigation of the efficiencies of bioaerosol samplers for collecting aerosolized bacteria using a fluorescent tracer. II: Sampling efficiency and half-life time. *Aerosol Science and Technology*, 45(3), 432–442. <https://doi.org/10.1080/02786826.2010.543197>

Zhuang, J., & Jin, Y. (2003). Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. *Journal of Environmental Quality*, 32(3), 816–823. <https://doi.org/10.1021/1021/acs.est7b03875>

org/10.2134/jeq2003.8160

Zukeran, A., Sawano, H., Ito, K., Oi, R., Kobayashi, I., Wada, R., & Sawai, J. (2018). Investigation of inactivation process for microorganism collected in an electrostatic precipitator. *Journal of Electrostatics*, 93, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2018.04.002>

## Controle ambiental de parasitos entéricos: desafios e tendências

DOI: 10.56041/9786599841859-2

### **DE LIZ, Laryssa Vanessa**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0003-4748-2855>

### **MARTINS, Carolina Leite**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0003-1310-9390>

### **ROSAR, Amábilli De Souza**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-00033177-8467>

### **DE FREITAS, Ana Cláudia Oliveira**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-27015750>

### **BASTIANI, Ana Paula**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0009-0007-9205-1057>

### **GRISARD, Edmundo Carlos**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0001-8916-8296>

**QUARESMA, Patricia Flavia**

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-8274-4166>

**STOCO, Patricia Hermes\***

Laboratório de Protozoologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;  
Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0003-0879-6173>

\*Autor correspondente: patricia.stoco@ufsc.br

## RESUMO

Diversas espécies de helmintos e protozoários estão ligadas a parasitoses intestinais que impactam milhões de pessoas. No Brasil, destacam-se os parasitos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *ancilostomídeos*, *Taenia* sp., *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp.. No cenário de saúde única várias dessas espécies assumem papel diferenciado devido à sua natureza zoonótica, aumentando a complexidade e os desafios para o controle. O controle ambiental dessas parasitoses envolve um conjunto de ações e estratégias direcionadas à redução de infecções. As formas infectantes destes parasitos são encontradas em ambiente variados como, água, solo, esgoto e resíduos animais. Este capítulo aborda questões cruciais relacionadas ao controle ambiental dessas espécies, destacando estratégias empregadas no Brasil e internacionalmente, incluindo iniciativas de saneamento básico, educação em saúde, controle de reservatórios e distribuição de medicamentos. Além disso, a conscientização crescente sobre medidas preventivas, como higiene pessoal e consumo de água potável, desempenha papel fundamental na mitigação dessas doenças. Contudo, os desafios enfrentados no controle de parasitos refletem a influência de fatores como mudanças climáticas, rápida urbanização e as migrações, moldando a distribuição geográfica e prevalência das parasitoses entéricas. Isso destaca a necessidade constante de adaptação das estratégias de controle e a promoção de uma saúde única.

**Palavras-chave:** Enteroparasitoses; helmintos; protozoários; populações vulneráveis; diagnóstico; saúde única.

## INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais são doenças causadas por diversas espécies de helmintos e protozoários que afetam cerca de 1,5 bilhões de pessoas no mundo (Khurana; Singh; Mewara, 2021). São consideradas doenças tropicais negligenciadas, sendo mais frequentes em áreas rurais e comunidades com vulnerabilidade social, as quais vivem em condições sanitárias inadequadas. Apesar de baixas taxas de letalidade, as infecções por parasitos entéricos impactam negativamente o sistema de saúde e a vida das pessoas infectadas. Sintomas como desnutrição, diarreia, anemia e prejuízo no desenvolvimento físico e cognitivo são comuns, embora muitos indivíduos infectados sejam assintomáticos. O impacto de cada doença no indivíduo depende de diversos fatores, entre eles: a espécie do parasito, a carga parasitária, a presença de coinfeções, o estado nutricional e imunológico e os fatores socioeconômicos (Khurana; Singh; Mewara, 2021).

Destacam-se no Brasil os enteroparasitos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Taenia* spp., *Schistosoma mansoni*, *ancilostomídeos*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp (Quadro 1). Uma vez que no Brasil não é exigida a notificação destas parasitoses, exceto na ocorrência de surtos, o número de casos é certamente subestimado. No período de 2010 a 2015, um inquérito nacional estimou a prevalência de algumas helmintoses em crianças de 7 a 17 anos utilizando exame parasitológico de fezes (EPF). As prevalências

observadas foram de 6% para infecção por *A. lumbricoides*, 541% para *T. trichiura*, 0,99% para *S. mansoni* e 273% para ancilostomídeos (Katz, 2018). Esses números diferem significativamente entre cidades e estados brasileiros. No Amazonas, por exemplo, 21,79% e 19,14% das crianças foram positivas para *T. trichiura* e *A. lumbricoides*, respectivamente. Além disso, os números também diferem entre diferentes populações. Ao analisar as fezes de 430 indígenas na Amazônia foi constatado 100% de infecção por protozoários intestinais e 39,33% por helmintos (Vasconcelos et al., 2023). Isto evidencia a necessidade de considerar aspectos regionais para definir estratégias de controle dessas parasitoses (Katz, 2018).

As espécies de parasitos intestinais possuem particularidades em seus ciclos de vida e formas de transmissão. Humanos se infectam pela ingestão de ovos, cistos ou oocistos ou ainda por penetração ativa de larvas que estão presentes no solo, água, esgoto ou resíduo animal (Quadro 1). Uma vez estabelecida a infecção, seja em seres humanos ou outros animais, cada espécie passa por etapas de desenvolvimento no organismo até ocorrer a liberação das formas parasitárias transmissíveis, contaminando o ambiente. Nesse sentido, o manejo ambiental é parte crucial para o controle e prevenção dessas doenças e envolve um conjunto de ações direcionadas à redução da exposição aos parasitos presentes no ambiente, incluindo as seguintes medidas: a) diretas: saneamento básico, tratamento da água, tratamento de infectados e controle de vetores; b) indiretas: educação em saúde, promoção da higiene pessoal, assistência médica e melhoria nas condições de vida.

**Quadro 1 - As parasitoses intestinais humanas são causadas por diversas espécies de helmintos e protozoários.** Classificação dos diferentes enteroparasitos, incluindo informações referentes a doença relacionada, forma infectante para humanos, fonte e forma de transmissão para humanos e a fonte de contaminação ambiental.

Classificação	Agente etiológico	Doença	Forma Infectante	Fonte de infecção	Forma de transmissão	Fonte de contaminação ambiental	
Helmintos	Nematel- mintos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascaridíase	Ovo	Solo, água, alimento, esgoto, resíduo animal	Fecal-oral	Fezes humanas
		<i>Trichuris trichiura</i>	Tricuríase	Ovo		Fecal-oral	Fezes humanas
		<i>Enterobius vermicularis</i>	Enterobiíase	Ovo	Solo, água, alimento, esgoto	Penetração na pele	Fezes humanas
		<i>Necator americanus</i>	Ancilostomíase	Larva		Penetração na pele	Fezes humanas
		<i>Ancylostoma duodenale</i>	Estrongiloidíase	Larva	Solo	Penetração na pele	Fezes humanas e de cães
		<i>Ancylostoma ceylanicum</i>		Larva		Penetração na pele	
		<i>Strongyloides stercoralis</i>		Larva		Penetração na pele	
	Platelmintos	<i>Taenia spp. *</i>	Teníase	Cisticerco	Carne bovina e suína	Ingestão de carne	Fezes humanas
		<i>Taenia solium</i>	Cisticercose	Ovo	Água e alimento	Fecal-oral	Fezes humanas
		<i>Diphyllobothrium latum</i>	Difilobotríase	Larva	Carne de peixe	Fecal-oral	Fezes humanas e roedores
		<i>Hymenolepis spp.</i>	Himenolopíase	Ovos ou larva	Água e alimento (ovos) ou artrópodes (larva)	Fecal-oral	Fezes humanas e caramujos
		<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistossomose	Cercária	Água	Penetração na pele	
	Protozoários	<i>Cryptosporidium spp.</i>	Criptosporidíase	Oocisto		Fecal-oral	Fezes humanas e de outros mamíferos
		<i>Giardia duodenalis</i>	Giardíase	Cisto	Água e alimento	Fecal-oral	Fezes humanas e de outros mamíferos
<i>Entamoeba histolytica</i>		Amebíase	Cisto		Fecal-oral	Fezes humanas	
<i>Balantidium coli</i>		Balantidiose	Cisto		Fecal-oral	Fezes humanas	
<i>Cyclospora cayentensis</i>		Ciclosporíase	Oocisto		Ingestão de carne com cistos	Fezes humanas e de suínos	
<i>Cystoisospora belli</i>		Cistoisosporiíase	Oocisto	Carne bovina	Ingestão de carne com cistos	Fezes humanas	
<i>Sarcocystis hominis</i>		Sarcocistose	Cisto	Carne suína	Ingestão de carne com cistos	Fezes humanas	
<i>Sarcocystis suis hominis</i>			Oocisto/	Água e alimento	Fecal-oral	Fezes humanas	
<i>Toxoplasma gondii</i>		Toxoplasmose	Cisto tecidual	Carne de aves e mamíferos	Ingestão de carne com cistos	Fezes de felídeos	

## ÁGUA

A contaminação da água por microrganismos patogênicos é ligada à higiene e ao saneamento. Países em desenvolvimento possuem condições sanitárias precárias e o acesso a água potável não abrange toda a população. Várias espécies de parasitos podem ser veiculadas pela água, no entanto *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são os mais encontrados tanto na água tratada quanto não tratada, devido a ampla distribuição e alta capacidade de sobrevivência (Efstratiou et al., 2017).

Na água, a detecção dos parasitos é, frequentemente, feita a partir da concentração

dos microrganismos seguida de imunofluorescência ou métodos moleculares. Países como os Estados Unidos, o Japão, o Reino Unido e a Austrália realizam monitoramento de parasitos na água e diversas medidas de saneamento ambiental, ao contrário de países da América Latina, da África e da Ásia, onde além da infraestrutura sanitária precária e não há o monitoramento de parasitos na água (Baldursson & Karanis, 2011).

No Brasil, a portaria emitida pelo Ministério da Saúde que dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água tratada, prevê a avaliação da presença desses parasitos apenas quando a média geométrica anual de *Escherichia coli* for maior ou igual a 1.000/100 mL. Quando a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos postos de captação da água for maior ou igual a três oocistos por litro, recomenda-se realizar filtração rápida. Entretanto, avaliar a qualidade geral da água apenas considerando a presença de coliformes, não implica na ausência de protozoários e de outros patógenos (Basualdo et al., 2000). Nos Estados Unidos a lei da água potável (LT2ESWTR- 2006) prevê que a concentração de *Cryptosporidium* spp. seja menor que 0,075 oocisto por litro, visando atingir a concentração de zero oocisto por litro (EPA, 2023).

O tratamento da água envolve diferentes etapas como floculação, decantação, filtração, desinfecção (por cloro) e fluoretação. Essa sequência de tratamento é eficiente para eliminação dos patógenos mais comuns, como vírus e bactérias, mas não é eficiente contra protozoários formadores de cistos. Isso se deve ao fato dos cistos de *Giardia* spp. (~8 µm) e dos oocistos *Cryptosporidium* spp. (~4 µm) serem estruturas pequenas capazes de passar pelo sistema de filtração convencional, além de possuírem uma parede cística espessa que os mantém viáveis e tolerantes à desinfecção por cloro e outros desinfetantes (Omarova et al., 2018).

Para superar esses desafios, novas metodologias vêm sendo propostas visando inativar e/ou eliminar esses parasitos da água, sendo o custo o maior limitante para a implementação. Por exemplo, a utilização do dióxido de cloro, um desinfetante alternativo mais eficaz que o cloro, é capaz de inativar cistos e oocistos. Tratamentos com ozônio e radiação UV são de alta eficiência para a inativação dos parasitos, gerando danos aos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e morte celular. Métodos de filtração usando granulações menores ou membranas (micro, ultra e nanofiltração) também são estratégias eficazes (Omarova et al., 2018). Na Inglaterra, a filtração de água para abastecimento público utilizando membranas reduziu os casos de criptosporidiose em torno de 79% (Goh et al., 2005).

A implementação de novas tecnologias para o tratamento de água em países como o Brasil se faz urgente. Além disso, deve-se investir esforços no monitoramento constante de corpos hídricos destinados ao abastecimento humano e animal, a fim de reduzir possíveis impactos à saúde.

## ESGOTO

O tratamento de esgoto é um processo fundamental para preservar a saúde pública e o meio ambiente. Este processo engloba a eliminação de impurezas presentes nas águas residuais e lodo de esgoto, originados de resíduos domésticos e industriais, com o propósito

de produzir um efluente passível de ser reintegrado ao ciclo hídrico. O contato direto com esgoto não tratado implica na possibilidade de infecção por enteroparasitos, particularmente, devido às doses infectantes mínimas extremamente baixas, normalmente da ordem de algumas unidades ou dezenas de unidades (DuPont et al., 1995).

As águas residuais, quando tratadas adequadamente, podem ser aplicadas, eficientemente, em diversas operações urbanas (descarga sanitária, irrigação e lavagem de veículos), agrícolas (irrigação de culturas), uso doméstico (produção de água potável) e uso industrial (resfriamento e reposição de caldeiras) (Jasim et al., 2016). A reutilização do lodo de esgoto também tem grande potencial na agricultura, possibilitando a reciclagem de matéria orgânica e inorgânica, reduzindo a necessidade de fertilizantes. Apesar das vantagens apresentadas, um dos desafios reside na falta de um padrão eficaz de tratamento e na ausência de uma metodologia de detecção de parasitos nessas amostras (Singh & Agrawal, 2008). Essa carência de informações impede o desenvolvimento de modelos para estimar os riscos associados à exposição a parasitos durante os processos de reutilização ou descarte de lodos. Outro grande desafio é a falta de uma legislação única e eficaz. A legislação brasileira para o tratamento de esgoto é composta por várias normas e leis, além de legislações estaduais e municipais específicas. No entanto, não existem normativas específicas relacionadas à concentração de parasitos em sistemas de tratamento de esgoto. A norma ABNT NBR 12209 estabelece indicadores biológicos que devem ser monitorados em efluentes tratados, e inclui apenas os coliformes fecais. O tratamento de esgoto compreende uma série de etapas, incluindo peneiramento, decantação, biodegradação e desinfecção. Essa última etapa tem o intuito de eliminar patógenos, sendo realizada mediante a aplicação de cloro, com possibilidade de uso de ozônio ou UV (Jin et al., 2014).

A maioria dos métodos de tratamento de águas residuais concentra-se na remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos, enquanto a parcela de saneamento básico é negligenciada. A implementação de processos adicionais para o controle de parasitos eleva o custo tornando-se inviável, especialmente para países subdesenvolvidos. Dentre os métodos mais eficazes para a inativação de parasitos na água residual e no lodo de esgoto incluídos na fase terciária de tratamento, estão: tratamento térmico a 108 °C, pasteurização a 70 °C ou tratamento químico por meio da adição de ácido sulfúrico, clorídrico, propiônico, acético ou peracético (Keller et al., 2004).

A pesquisa por métodos eficazes para a remoção de parasitos de águas residuais e lodo de esgoto é um campo de estudo importante. Estudos utilizando algas em um sistema de lagoa facultativa e filtração demonstraram eliminação de 100% dos ovos de helmintos, mas incapacidade de remover *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. (Abd-Elmaksoud et al., 2021). A secagem solar do lodo de esgoto conseguiu eliminar uma quantidade significativa de ovos de helmintos, incluindo redução de cerca de 90% de ovos de *Ascaris* spp. e a remoção completa de ovos de *Schistosoma* spp., *Capillaria* spp., *Trichuris* spp., *Toxocara* spp. e *Taenia* spp. (An-Nori et al., 2021). Além disso, técnicas de compostagem acopladas a métodos de desidratação demonstraram uma redução superior a 90% de ovos dos gêneros *Ancylostoma*, *Trichuris*,

*Capillaria* e *Schistosoma* (El Hayany et al., 2018).

A pesquisa de parasitos em sistemas de esgoto suscita interesse, não apenas devido ao seu potencial patogênico, mas também em virtude da notável resiliência demonstrada por helmintos e protozoários na maioria dos procedimentos de saneamento aplicados em estações de tratamento. Dessa forma, esses microrganismos se tornam indicadores de extrema relevância na avaliação da eficácia dos processos de tratamento. É importante ressaltar a necessidade de se estabelecer limites legais para a presença de cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos em efluentes e lodos de esgoto, especialmente se o reuso após o tratamento já estiver delineado.

## RESÍDUOS ANIMAIS

Patógenos zoonóticos podem estar presentes em resíduos e dejetos animais e representam uma preocupação à saúde pública. Entre os parasitos zoonóticos que apresentam riscos à saúde humana, devido à sua frequência e persistência em resíduos animais, destacam-se: *Ascaris suum*, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Cystoisospora belli*, *G. duodenalis* e *Toxoplasma gondii* (Sobsey et al., 2006).

Diversos surtos de doenças transmitidas pela água devido a contaminação fecal de origem animal estão documentados. Um exemplo clássico ocorreu em Milwaukee, EUA em 1993. Nessa ocasião, o departamento de saúde recebeu vários relatos de indivíduos com sintomas gastrointestinais e, posteriormente, estimou-se que cerca de 403 mil pessoas foram infectadas por *Cryptosporidium* spp. (Mac Kenzie et al., 1994).

A gestão de resíduos animais engloba uma variedade de processos visando a sua eliminação ou reuso, como na agricultura. Para tratamento dos resíduos destacam-se métodos térmicos, como a incineração, processos químicos, como a hidrólise, e abordagens biológicas, como a digestão anaeróbica (Samoraj et al., 2022). A biodigestão anaeróbia constitui uma alternativa para utilização de dejetos da suinocultura como biofertilizantes e produção de biocombustíveis (Rogovski et al., 2022). No entanto, pouco é abordado em relação à qualidade sanitária do digestato, havendo estudos com aditivos que melhoram a eliminação viral e bacteriana, mas que não foram capazes de eliminar ovos de *A. lumbricoides*, por exemplo (Fongaro et al., 2016).

O processamento por biodigestores anaeróbios termofílicos é, atualmente, a melhor alternativa para o tratamento de resíduo animal, embora não seja eficiente para a completa inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. As elevadas temperaturas potencializam a redução dos oocistos, e o armazenamento e tratamento do resíduo em lotes, ao invés de ser constantemente adicionado ao biodigestor, tende melhorar a inativação (Vermeulen et al., 2017). Além disso, a utilização de sistemas de compostagem de biosecagem, o qual associa elevadas temperaturas e desidratação do composto, mostrou-se eficaz na inativação de ovos de *A. suum* (Collick et al., 2017).

## SOLO

De todos os ambientes potencialmente contaminados, o solo é o mais negligenciado, não havendo qualquer normativa que considere a detecção ou controle de patógenos no solo. A detecção de ovos e larvas de geo-helminthos no solo é realizada em pesquisas epidemiológicas eventuais em parques e praças públicas (Santos et al., 2006) e não de forma periódica como fazem as companhias de tratamento de água e esgoto. Os poucos métodos descritos para controle nesse ambiente baseiam-se no fato de que a maturação de ovos (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*) e a sobrevivência de larvas (*Ancylostoma* sp. e *Strongyloides stercoralis*) necessitam de fatores químicos, biológicos e físicos específicos. Nesse sentido, utilizar abordagens que atuam diretamente nestes fatores, como altas temperaturas, poderia ser uma forma de controle de parasitos no ambiente.

Os ovos de *A. lumbricoides* apresentam alta resistência aos estresses ambientais, mas são inativados quando submetidos ao tratamento por microondas por curtos períodos (Mun et al., 2009). Larvas de *Ancylostoma* sp. podem ser eliminadas revolvendo o solo e permitindo a exposição a maior incidência solar e menor umidade. Outra alternativa é a técnica de compostagem que, durante o seu processamento oxidativo biológico, atinge altas temperaturas e produz metabólitos tóxicos, como a amônia e o sulfureto, que alteram o pH do meio e contribuem para a inativação dos patógenos. Ela já tem sido usada no tratamento de resíduos agrícolas, industriais e urbanos, e, pode ser aprimorada e adaptada para a eliminação dos ovos e larvas presentes no solo sensíveis a altas temperaturas.

## ALTERAÇÕES ANTRÓPICAS, CLIMÁTICAS E O IMPACTO NAS PARASITÓSES INTESTINAIS

As ações humanas impactam as parasitoses intestinais de diferentes formas. A urbanização e a miséria fazem com que inúmeras pessoas vivam em áreas sem condições sanitárias adequadas, com alto risco de infecção (Pozio, 2020). Mudanças em ambientes aquáticos, como acidentes e inundação de barragens, já foram associados à disseminação de doenças pois provocam dispersão de parasitos pela água, elevando o risco de parasitoses intestinais. Devido ao peso e tamanho dos oocistos e cistos de protozoários, a ocorrência de enchentes possibilita que estes sejam carregados pela água e que contaminem fontes de água utilizadas para o consumo (Poglayen et al., 2023). Este fenômeno não é restrito a países com problemas de infraestrutura sanitária, e epidemias de criptosporidíase associadas a enchentes têm sido registradas na Europa e nos Estados Unidos.

Além de enchentes, outros desequilíbrios são causados pelo aquecimento global, incluindo altas temperaturas, períodos de estiagem e secas, ventos extremos, entre outros. O aumento da temperatura pode levar a uma aceleração no desenvolvimento dos parasitos em seus hospedeiros e no ambiente, contribuindo para um aumento das parasitoses intestinais. Entretanto, embora temperaturas altas favoreçam o desenvolvimento das larvas de helmintos, este é reduzido em temperaturas superiores a 37 °C (Okulewicz, 2017). O aumento da umidade

do solo é associado a um aumento nos casos de ancilostomíase. Por outro lado, a seca pode fazer com que humanos e outros animais se sujeitem a ingestão de água contaminada. Ao passo que, queimadas tendem a diminuir a propagação de oocistos, larvas e vetores intermediários (Poglayen et al., 2023).

Os efeitos do aquecimento global impactam, de forma direta e indireta, na ocorrência, abundância e distribuição geográfica dos parasitos e, conseqüentemente, o risco de infecção. Portanto, é urgente a necessidade de esforços para controlar o rápido aumento das temperaturas no planeta.

## **CONTRIBUIÇÕES BIOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DAS ENTEROPARASIToses**

Estudos biotecnológicos são essenciais para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico humano e ambiental, desenvolvimento de vacinas e medicamentos e o emprego de práticas sustentáveis, como o controle biológico de parasitos.

As técnicas usuais de diagnóstico, baseadas em microscopia, são eficazes na detecção de infecções humanas para a maioria dos enteroparasitos. No entanto, a necessidade de recurso humano capacitado e as limitações em diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária, suscitam a busca por métodos mais sensíveis. Técnicas com alta sensibilidade, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido descritas, e no geral demandam tempo e possuem custo elevado para serem aplicadas globalmente (Khurana; Singh; Mewara, 2021). Dito isto, o desenvolvimento de métodos de rápida execução, alta sensibilidade e baixo custo são de grande necessidade. Um exemplo é o desenvolvimento da técnica de LAMP (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification*), altamente específica e sensível sem a necessidade de equipamentos de alto custo. O método consiste na amplificação de regiões alvo do DNA do parasito acoplado a um método de detecção colorimétrico. Baseado neste princípio, foi desenvolvido o teste SmartAmp2, capaz de diagnosticar infecções por *N. americanus*, *T. trichiura* e *A. lumbricoides* (Rashwan et al., 2017).

A detecção de parasitos entéricos no ambiente, por sua vez, tem como principais desafios a baixa concentração, a presença de outros organismos e de contaminantes que podem interferir na especificidade e sensibilidade do método utilizado (Hassan et al., 2021). Dentre as recentes inovações, destacam-se o uso de aptâmeros e inteligência artificial para a detecção dos parasitos (Waindok et al., 2022). Os aptâmeros são sondas moleculares formadas por moléculas fita-simples de DNA ou RNA, que formam uma estrutura tridimensional altamente específica para o reconhecimento do patógeno de interesse. Possuem diversas vantagens quanto ao custo de produção e estabilidade durante o armazenamento, tornando-se um método promissor para a detecção de parasitos entéricos em escala global (Hassan et al., 2021). Por outro lado, com o objetivo de diminuir o esforço humano de observação de parasitos por microscopia, diferentes algoritmos vêm sendo desenvolvidos para a detecção automática de parasitos na microscopia, já existindo algoritmos capazes de diferenciar sete espécies de helmintos presentes em diferentes amostras (Waindok et al., 2022).

Diversos esforços têm sido realizados visando o desenvolvimento de vacinas para enteroparasitoses, porém, ainda não há uma formulação com os critérios necessários para produção em larga escala e administração em humanos. Dentre as buscas recentes de alternativas vacinais, destaca-se a abordagem realizada por Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2021). O grupo utilizou dados de proteoma de 17 espécies de helmintos para selecionar epítomos imunogênicos compartilhados entre elas. Os resultados dos testes em camundongos desafiados com *A. suum* foram promissores, e novos testes serão necessários para avaliar seu potencial uso como uma vacina eficaz contra diversas espécies de helmintos.

No contexto de medicamentos, os disponíveis para o tratamento de doenças parasitárias têm sido os mesmos por décadas, resultando na seleção de parasitos resistentes. Os recursos para o desenvolvimento de fármacos para tratar doenças negligenciadas são limitados. Nesse âmbito, o reposicionamento de fármacos já disponíveis tem sido uma estratégia com economia significativa de tempo e custo (Andrews et al., 2014). As análises *in silico* podem auxiliar no direcionamento de novos fármacos e no reposicionamento por meio de bibliotecas de potenciais compostos bioativos e banco de dados. Os bancos de dados como o *Drugbank* e *PubChem* são muito úteis, e o *TDR Targets*, além de integrar informações dos dois últimos e apresentar informações genômicas, foi desenvolvido especialmente para doenças negligenciadas (Andrews et al., 2014). O *TDR Targets*, ao integrar os dados funcionais dos genes com a bioatividade química, por similaridade, identifica alvos de medicamentos com genes de patógenos. A disponibilidade de dados genômicos e proteômicos, juntamente com os bancos de dados, possibilitam a construção de bibliotecas de triagens mais robustas, direcionadas e baratas para as análises *in vitro* (Sateriale et al., 2014).

O uso de organismos vivos para o controle biológico de parasitos tem emergido como uma prática mais sustentável e de longa duração. Isso é possível com o uso de organismos predadores, competidores ou microrganismos que infectam o parasito ou seu hospedeiro intermediário, como no caso da esquistossomose. Dentre as espécies utilizadas, estão peixes, moluscos, crustáceos, lesmas, helmintos, fungos, bactérias e vírus. Os fungos apresentam um grande potencial pois, além de serem eficazes na redução de parasitos e do hospedeiro invertebrado da esquistossomose, também produzem metabólitos secundários que podem posteriormente ser explorados pela indústria química (Fonseca et al., 2023).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As parasitoses intestinais são um problema de saúde que afeta mais de 18% da população mundial, especialmente, populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica. Iniciativas biotecnológicas são potenciais fontes de inovação para o controle destas doenças, o qual envolve a associação de diversas medidas. A escolha das abordagens deve levar em conta aspectos ecológicos e sociais específicos de cada região. O incentivo por parte de organizações e programas globais é crucial para o desenvolvimento de insumos, métodos e recursos humanos mais eficientes para fomentar ações voltadas para a redução da morbidade em regiões endêmicas.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e FAPESC pelas bolsas de pesquisa de mestrado e doutorado das autoras de Liz, L. V., Martins, C., Rosar, A. S. e Bastiani, A. P.

## REFERÊNCIAS

Abd-Elmaksoud, S., Abdo, S. M., Gad, M., Hu, A., El-Liethy, M. A., Rizk, N., ... & Doma, H. S. (2021). Pathogens removal in a sustainable and economic high-rate algal pond wastewater treatment system. *Sustainability*, 13(23), 13232. doi: 10.3390/su132313232

An-Nori, A., El Fels, L., Ezzariai, A., El Hayani, B., El Mejahed, K., El Gharous, M., & Hafidi, M. (2021). Effectiveness of helminth egg reduction by solar drying and liming of sewage sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(11), 14080-14091. doi: 10.1007/s11356-020-11619-w

Andrews, K. T., Fisher, G., & Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 95–111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002

Baldursson, S., & Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, 45(20), 6603–6614. doi: 10.1016/j.watres.2011.10.013

Basualdo, J., Pezzani, B., De Luca, M., Córdoba, A., & Apezteguía, M. (2000). Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *International journal of hygiene and environmental health*, 203(2), 177-182. doi: 10.1078/s1438-4639(04)700255

Collick, A. S., Inglis, S., Wright, P., Steenhuis, T. S., & Bowman, D. D. (2007). Inactivation of *Ascaris suum* in a biodrying compost system. *Journal of environmental quality*, 36(5), 1528-1533. doi: 10.2134/jeq2006.0523

DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 855-859. doi: 10.1056/NEJM199503303321304

Efstratiou, A., Ongerth, J. E. & Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2011-2016. *Water Research*, 114, 14-22. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.036

El Hayany, B., El Glaoui, G. E. M., Rihanni, M., Ezzariai, A., El Faiz, A., El Gharous, M., ... & El Fels, L. (2018). Effect of dewatering and composting on helminth eggs removal from lagooning sludge under semi-arid climate. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10988-10996. doi: 10.1007/s11356-017-1066-z

EPA. Safe Drinking Water Act (SDWA). 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/>

sdwa. Acesso em: 15 out. 2023.

Fongaro, G., Kunz, A., Magri, M. E., Schissi, C. D., Viancelli, A., Philippi, L. S., & Barardi, C. R. M. (2016). Settling and survival profile of enteric pathogens in the swine effluent for water reuse purpose. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(8), 883-889. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.07.004

Fonseca, J. dos S., Altoé, L. S. C., de Carvalho, L. M., de Freitas Soares, F. E., Braga, F. R., & de Araújo, J. V. (2023). Nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* to control parasitic diseases in animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(12), 1-10. doi: 10.1007/s00253-023-12525-0

Gazzinelli-Guimarães, A. C., Nogueira, D. S., Amorim, C. C. O., Oliveira, F. M. S., Coqueiro-Dos-Santos, A., Carvalho, S. A. P., ... & Fujiwara, R. T. (2021). ASCVac-1, a multi-peptide chimeric vaccine, protects mice against *Ascaris suum* infection. *Frontiers in Immunology*, 12, 788185. doi: 10.3389/fimmu.2021.788185

Goh, S., Reacher, M., Casemore, D. P., Verlander, N. Q., Charlett, A., Chalmers, R. M., Knowles, M., Pennington, A., Williams, J., Osborn, K., & Richards, S. (2005). Sporadic cryptosporidiosis decline after membrane filtration of public water supplies, England, 1996–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2), 251–259. doi: 10.3201/eid1102.040274

Hassan, E. M., Örmeci, B., DeRosa, M. C., Dixon, B. R., Sattar, S. A., & Iqbal, A. (2021). A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. *Water Science and Technology*, 83(1), 1-25. doi: 10.2166/wst.2020.515

Jasim, S. Y., Saththasivam, J., Loganathan, K., Ogunbiyi, O. O., & Sarp, S. (2016). Reuse of treated sewage effluent (TSE) in Qatar. *Journal of Water Process Engineering*, 11, 174-182. doi: 10.1016/j.jwpe.2016.05.003

Jin, L., Zhang, G., & Tian, H. (2014). Current state of sewage treatment in China. *Water research*, 66, 85-98. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.014

Katz, N. (2018). Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR): Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Keller, R., Passamani-Franca, R. F., Cassini, S. T., & Goncalves, F. R. (2004). Disinfection of sludge using lime stabilisation and pasteurisation in a small wastewater treatment plant. *Water science and technology*, 50(1), 13-17. doi: 10.2166/wst.2004.0005

Khurana, S., Singh, S., & Mewara, A. (2021). Diagnostic techniques for soil-transmitted helminths – Recent advances. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 12, 181-196. doi: 10.2147/RRTM.S278140

Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., & Rose, J. B. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167. doi: 10.1056/NEJM199407213310304

Mun, S., Cho, S.-H., Kim, T.-S., Oh, B.-T. & Yoon, J. (2009). Inactivation of *Ascaris* eggs in soil by microwave treatment compared to UV and ozone treatment. *Chemosphere*, 77(2), 285-290. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.030

Okulewicz, A. (2017). The impact of global climate change on the spread of parasitic nematodes. *Annals of parasitology*, 63(1), 15-20. doi: 10.17420/ap630179

Omarova, A., Tussupova, K., Berndtsson, R., Kalishev, M., & Sharapatova, K. (2018). Protozoan parasites in drinking water: A system approach for improved water, sanitation and hygiene in developing countries. *International journal of environmental research and public health*, 15(3), 495. doi: 10.3390/ijerph15030495

Poglayen, G., Gelati, A., Scala, A., Naitana, S., Musella, V., Nocerino, M., ... & Habluetzel, A. (2023). Do natural catastrophic events and extreme climatic conditions also affect parasites?. *Parasitology*, 15, 137. doi: 10.1017/S0031182023000471

Pozio, E. (2020). How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Experimental Parasitology*, 208, 107807. doi: 10.1016/j.exppara.2019.107807

Rashwan, N., Diawara, A., Scott, M. E., & Prichard, R. K. (2017). Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-12. doi: 10.1186/s13071-017-2420-1

Rogovski, P., Cadamuro, R. D., Souza, D. S. M., Savi, B. P., Razzolini, M. T. P., de Souza Lauretto, M., ... & Fongaro, G. (2022). Animal residues use and application for sustainable agriculture on one health approach. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 131-158). Elsevier.

Samoraj, M., Mironiuk, M., Izydorczyk, G., Witek-Krowiak, A., Szopa, D., Moustakas, K., & Chojnacka, K. (2022). The challenges and perspectives for anaerobic digestion of animal waste and fertilizer application of the digestate. *Chemosphere*, 295, 133799. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133799

Santos, N. M., Silva, V. M. G da, Thé, T. S., Santos, A. B. dos & Souza, T. P. de. (2006) Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte alta da cidade de Salvador-BA. *Revista das Ciências Médicas e Biológicas*, 5(1), 40-47.

Sateriale, A., Bessoff, K., Sarkar, I. N., & Huston, C. D. (2014). Drug repurposing: mining protozoan proteomes for targets of known bioactive compounds. *Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA*, 21(2), 238–244. doi: 10.1136/amiajnl-2013-001700

Singh, R. P., & Agrawal, M. (2008). Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste management*, 28(2), 347358. doi: 10.1016/j.wasman.2006.12.010

Sobsey, M. D., Khatib, L. A., Hill, V. R., Alocilja, E., & Pillai, S. (2006). Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate (pp. 609-666). doi:10.13031/2013.20268

Vasconcelos, M. P. A., Sánchez-Arcila, J. C., Peres, L., de Sousa, P. S. F., dos Santos Alvarenga, M. A., Castro-Alves, J., ... & Oliveira-Ferreira, J. (2023). Malarial and intestinal parasitic co-infections in indigenous populations of the Brazilian Amazon rainforest. *Journal of Infection and Public Health*, 16(4), 603-610. doi: 10.1016/j.jiph.2023.02.012

Vermeulen, L. C., Benders, J., Medema, G., & Hofstra, N. (2017). Global *Cryptosporidium* loads from livestock manure. *Environmental science & technology*, 51(15), 8663-8671. doi: 10.1021/acs.est.7b00452

Waindok, P., Raulf, M. K., & Strube, C. (2022). Potentials and challenges in the isolation and detection of ascarid eggs in complex environmental matrices. *Food and Waterborne Parasitology*, 28, e00174. doi: 10.1016/j.fawpar.2022.e00174

# Controle de plantas espontâneas mediado pelo uso de bioherbicidas

DOI: 10.56041/9786599841859-3

### **CAMARGO, Aline F.**

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.  
Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0003-4760-6221>

### **KUBENECK, Simone**

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.  
Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-00025787-2825>

### **NERLING, Júlia P.**

Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0009-0000-15625802>

### **BIENIEK, Cauê B.**

Laboratório de Agroecologia.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0009-0004-9610-6703>

### **ROMANI, Larissa C.**

Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0009-0001-0228-812X>

**MOSSI, Altemir J.**

Laboratório de Agroecologia.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-7917-450X>

**FONGARO, Gislaine**

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-000155963320>

**TREICHEL, Helen\***

Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-000238103000>

## RESUMO

O estabelecimento de metas globais que visam o uso de sistemas de cultivo sustentáveis juntamente com objetivo de proporcionar o bem-estar do meio ambiente, tornou os insumos de base biológica uma alternativa atrativa e bastante procurada nos últimos anos. As plantas espontâneas, também chamadas de plantas daninhas, são consideradas um problema nos sistemas de cultivo, devido à competição com a cultura por nutrientes. Sua presença acarreta elevadas perdas na colheita, além de causar impactos negativos no ecossistema, por serem usados os herbicidas sintéticos em seu controle. Diante disso, os herbicidas de base biológica possibilitam o controle destas plantas, sem que haja consequências negativas ao meio ambiente. O uso de microrganismos, como fungos e bactérias, bem como as enzimas produzidas pelos mesmos, possibilita interações na parede celular das plantas espontâneas controlando-as nos sistemas de cultivo, sem causar impactos negativos aos recursos naturais e à saúde humana. Nesse sentido, este capítulo visa realizar uma revisão abrangente sobre o uso de bioherbicidas, discutindo métodos de obtenção e interação entre bioherbicidas e as plantas alvo, bem como a análise de como esses bioprodutos estão atrelados ao contexto de saúde única.

**Palavras-chave:** Microrganismos; Cultivo sustentável; Meio Ambiente; Controle Biológico.

## USO DE BIOHERBICIDAS NO CONTROLE DE PLANTAS ESPONTANÊAS

As plantas espontâneas possuem grande interferência no desenvolvimento das culturas, ocasionando uma redução drástica na produtividade, devido a competição agressiva com outras culturas por água, luz, nutrientes e espaço (Zagonel et al., 2000). Sendo assim, buscam-se estratégias de controle dessas plantas espontâneas, com o objetivo de inibir ou reduzir seu desenvolvimento, a fim de chegar a níveis aceitáveis para a convivência entre as espécies envolvidas, sem danos para as mesmas ou prejuízos econômicos (Sardana et al., 2017).

A agricultura sustentável simboliza um dos objetivos primordiais no âmbito global. Assim, a adesão de práticas agrícolas economicamente viáveis e ecologicamente conscientes resulta em uma produção agrícola efetiva, e na promoção da estabilidade dos ecossistemas. Desse modo, a conjuntura atual é caracterizada pelo advento de tecnologias emergentes, avanços no controle de invasores vegetais e na utilização de bioherbicidas para a implementação do controle biológico de plantas espontâneas. Entretanto, é inegável a permanência de desafios e fronteiras que precisam ser superadas para a efetiva implementação dessa tecnologia. Dentre esses obstáculos, destacam-se a variabilidade dos hospedeiros, as restrições impostas pelo ambiente e a necessidade de assegurar a confiabilidade no desenvolvimento das formulações, que são questões cruciais para o caminho da agricultura sustentável (Ramesh & Abinaya, 2022).

Os bioherbicidas ou herbicidas biológicos são baseados em princípios ativos naturais como extratos, plantas ou microrganismos patogênicos sendo em muitos casos, fungos isolados da própria planta alvo de controle (Bailey et al., 2011; Klaic et al., 2015; Mishra et al., 2018). Inúmeros estudos de bioherbicidas a base de fungos vêm sendo desenvolvidos e

demonstram potencial para aplicação em processos de controle biológico, provocando danos foliares diminuindo a taxa fotossintética, e conseqüentemente dificultando e inibindo o seu crescimento (Bordin et al., 2018; Reichert Júnior et al., 2019).

Sem dúvida o mercado de produtos fitossanitários para a agricultura é de ampla concorrência, entretanto os bioherbicidas apresentam pontos positivos fortes, por exemplo: ação específica; difícil aquisição de resistência pela planta alvo; efetivo em menores doses quando comparados a herbicidas, ocasionando um menor impacto no ecossistema; por ser um produto biodegradável, diminui o risco de contaminação ambiental; potencializa o controle quando aplicado de maneira integrada com outras técnicas de manejo (Ash, 2010).

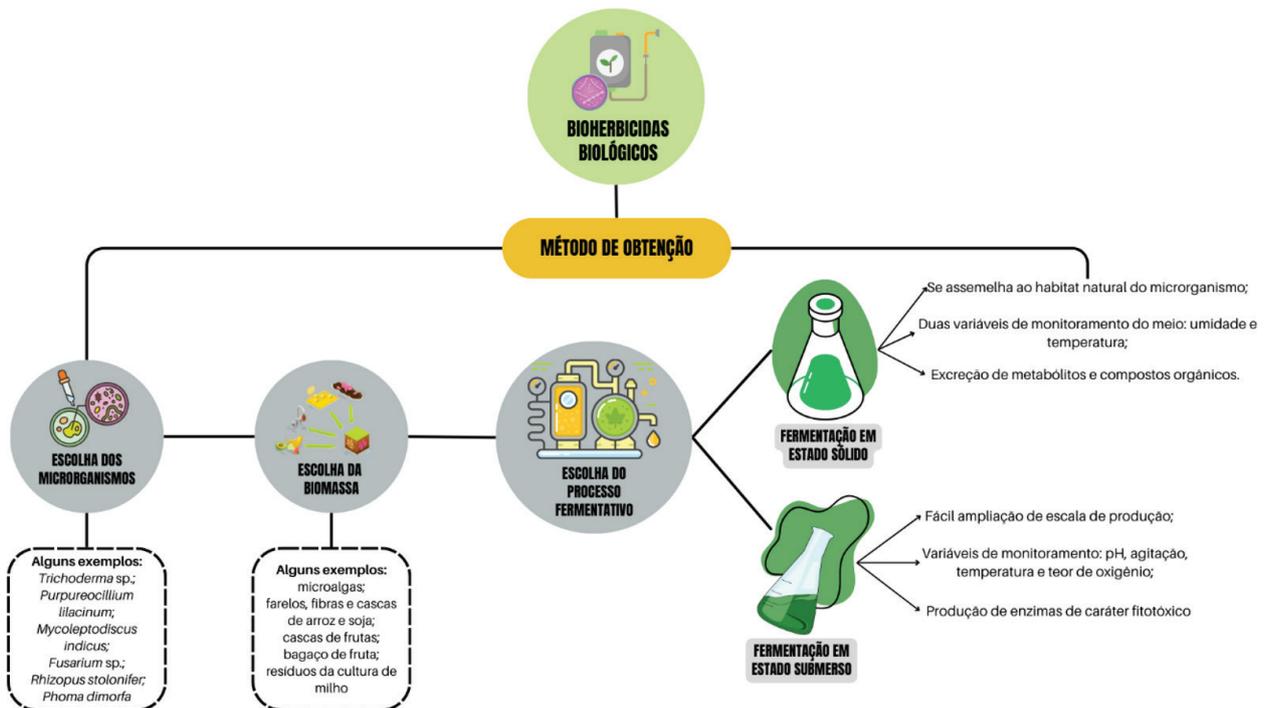
Apesar de promissor, o uso de bioherbicidas ainda enfrenta muitas limitações, dentre elas está a dificuldade de mensurar os resultados obtidos em condições à campo e a diversidade genética dos hospedeiros, pois em muitos casos os patógenos de plantas apresentam alta especificidade, restringindo o uso do microrganismo a apenas uma espécie de planta (Camargo et al., 2023b; Soltys et al., 2013).

## **BIOHERBICIDAS: MÉTODOS E OBTENÇÃO**

A obtenção de bioherbicidas possui diversas etapas para que ao final se tenha um produto de qualidade, que cause o efeito desejado nas plantas espontâneas e principalmente que não agrida o meio ambiente e a saúde humana, em especial os agricultores que aplicam o tratamento nas culturas. Os bioherbicidas de base biológica, seguem de maneira resumida as seguintes etapas de produção: i) escolha do microrganismo; ii) escolha do substrato e iii) avaliação e determinação do método fermentativo de obtenção, conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

O uso de microrganismos para a obtenção de herbicidas vem sendo bastante explorado nos últimos anos, por serem de procedência natural e, portanto, possuem um ciclo de vida curto no meio ambiente diminuindo os impactos negativos, em comparação ao uso de agroquímicos (Bordin et al., 2018, 2021; Camargo et al., 2023b).

**Figura 1** - Etapas envolvidas na produção de herbicidas de base biológica.



Diante disso, a escolha de microrganismos conhecidos, por serem agentes de controle biológico, são ideais para serem utilizados neste processo devido aos seus mecanismos de ação e a liberação de substâncias que agem na estrutura das plantas (Adetunji et al., 2019). Dentre os microrganismos reconhecidos por possuírem esses mecanismos destaca-se o *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus stolonifer*; e o *Phoma dimorfa* (Camargo, et al., 2023a,b; Cavalcante et al., 2021; Chaves Neto et al., 2021; Portela et al., 2022; Saldaña-Mendoza et al., 2023).

A partir da escolha do microrganismo, se tem a etapa de escolha do substrato. É importante que esse substrato possua componentes que o microrganismo utilize para excretar substâncias como ácidos e metabólitos de interesse, além de fornecer carbono e nitrogênio para o seu desenvolvimento (Camargo et al., 2023a; Sala et al., 2021). Há diversos tipos de substrato que podem ser utilizados, desde soluções compostas principalmente por minerais até biomassas provenientes de resíduos ricos em compostos bioativos, açúcares, aminoácidos e proteínas (Matthiensen & Michelon, 2022).

A terceira etapa é a determinação do método fermentativo mais adequado. Os processos fermentativos microbianos podem ocorrer em dois diferentes estados, sólido e submerso. As fermentações em estado sólido recebem destaque por possuírem vantagens econômicas no seu processo como o uso de um único substrato sólido, sem a necessidade da adição de outros componentes químicos. Além disso, este processo também é considerado viável principalmente por reproduzir as condições de crescimento em um ecossistema natural e real. Neste tipo de fermentação, para que se tenha êxito na produção do composto de interesse é importante controlar algumas variáveis como o teor de umidade do meio e a temperatura do processo, para que assim o microrganismo utilize o meio fermentativo de maneira eficiente possibilitando a produção e a excreção de metabólitos e substâncias que causem o efeito desejado (Camargo et al., 2023 a,b; Singhanía et al., 2009).

Já a fermentação submersa é a mais utilizada atualmente devido a sua facilidade de reprodução em grande escala. Para que a fermentação submersa ocorra de maneira eficiente, se tem o acompanhamento de diversas variáveis durante sua execução. A temperatura, agitação, pH e teor de oxigênio do meio devem ser monitoradas e ajustadas para que assim o microrganismo consiga se reproduzir no meio líquido e conseqüentemente, ter a produção dos compostos de interesse (Camargo et al., 2023b; Intasit et al., 2021; Portela et al., 2022; Ulrich et al., 2021).

## **FUNCIONALIDADES DOS BIOHERBICIDAS**

As mudanças causadas pelo homem vêm impactando cada vez mais o meio ambiente, e um dos impactos que notamos é a presença de plantas mais persistentes e resistentes aos herbicidas tradicionais (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003). Neste cenário, os bioherbicidas surgem no como uma proposta de menor impacto para a viabilidade das produções agrícolas, e ao contrário dos compostos químicos tradicionais, ele traz diversas funcionalidades e benefícios pela sua aplicação.

O *pool* enzimático presente na composição de um bioherbicida detêm grande parte dos mecanismos de ação desse composto, dando destaque principalmente a classe de enzimas que atuam na degradação da parede celular das plantas. Enzimas como pectinases, celulases e ligninases atuam diretamente na parede celular da planta-alvo realizando a sua degradação, já enzimas como proteases, amilases e peptidases atuam diretamente na proteína e membrana lipídica, facilitando a ação dos agentes de biocontrole na planta alvo (Cordeau et al., 2016; Ghorbani et al., 2005). Além destas, as enzimas antioxidantes são de extrema importância para que haja o efeito fitotóxico na planta alvo, as quais incluem as peroxidases, catalases, superóxido dismutases e ascorbato peroxidases que atuam na estrutura dos polissacarídeos da parede celular por meio de processos como a peroxidação lipídica, criando um ambiente de estresse e conseqüentemente resultando em dano foliar (Stefanski et al., 2020; Ulrich et al., 2021).

Outros metabólitos como a cumarina e demais compostos fenólicos, tendem a prejudicar significativamente a germinação e o crescimento inicial das plantas, pois ao serem absorvidos pelas sementes, logo começam a gerar danos à membrana celular, DNA, mitose, processos bioquímicos bem como a atividade da amilase, inibindo a germinação das mesmas. Entretanto, vale ressaltar que estes compostos não afetam os organismos que auxiliam na manutenção do solo, como é o caso das minhocas (Portela et al., 2022). Desta forma, os metabólitos fitotóxicos provenientes de microrganismos, mostram uma potencialidade para bioherbicidas mais seguros, e que otimizem a produção e cultivo das culturas vegetais desejadas.

De forma geral, as plantas espontâneas ao serem submetidas a presença do bioherbicida rico em enzimas, se encontram em um ambiente de estresse e conseqüentemente produzem espécies reativas de oxigênio e que por serem altamente tóxicas, aumentam o estresse oxidativo da planta e ocasionam danos às proteínas, lipídios carboidratos e DNA, afetando a produção de clorofila da planta e causando o surgimento de clorose nas folhas (Hasan et al.,

2022). Vale ressaltar que por ser um composto de formulação diferenciada, sem a presença de substâncias químicas nocivas ao meio ambiente e ao agricultor que faz a aplicação na cultura, os seus mecanismos de ação são baseados nas atividades fitotóxicas realizadas por um *pool* enzimático e de metabólitos excretados pelos microrganismos durante o processo de obtenção do composto.

## BIOHERBICIDAS EM UM CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA

A agricultura convencional baseada em práticas industriais e intensificadas, justificada pela crescente demanda por alimentos, enfrenta o paradoxo de alimentar uma população em constante crescimento, com recursos finitos e degradados. O emprego de herbicidas para o aumento da produtividade, pode estar associado à perda da biodiversidade, incitando desequilíbrios entre as interações dos ecossistemas (Camargo et al., 2023).

O conceito de Saúde Única (*One Health*, em inglês) nos auxilia no entendimento das interações entre animais, seres humanos e ambiente, ou seja, fornece uma visão de como esses âmbitos se entrelaçam com o intuito de melhorar questões relacionadas à saúde humana. Para a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), “Saúde Única é uma força unificadora para salvaguardar a saúde humana e animal, para reduzir ameaças de doenças e para garantir um abastecimento alimentar seguro através de uma gestão eficaz e responsável dos recursos naturais” (Lombi et al., 2019). Essa abordagem é importante devido a busca por métodos agrícolas alternativos, que promovam a segurança alimentar e a manutenção saudável dos agroecossistemas.

Os sistemas de base agroecológica oferecem uma alternativa para alcançar a sustentabilidade e garantir maior segurança alimentar, através de interações biológicas naturais e da resiliência socioambiental. Com o uso de bioherbicidas, espera-se restabelecer o equilíbrio da microbiota local, estimulando a biodiversidade do ecossistema, e reduzindo o uso de insumos agroquímicos nos sistemas produtivos. A baixa toxicidade dos bioherbicidas aliada ao desenvolvimento da biodiversidade poderão resultar no controle de vetores e na disseminação de doenças e patógenos, atuando como uma frente na aplicação microbiológica em saúde única. Apesar dos bioherbicidas ainda apresentarem rendimento inferior, se comparado ao método convencional, eles representam uma alternativa emergente para solucionar questões de redução da fome e otimização de recursos naturais, por intermédio da implementação de padrões de produção e de consumo sustentáveis (Yan et al., 2022).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os bioherbicidas se tornam uma tecnologia verde, que ao ser aplicada em sistemas produtivos agroecológicos, atuam dentro do contexto de economia circular, encerrando ciclos dentro das propriedades. Com o uso dessa ferramenta biológica espera-se diminuição de entrada e saída de insumos e do uso de produtos tóxicos. Por outro lado, estimulam o aumento da biodiversidade, estabelecendo ambientes mais saudáveis, tendendo ao equilíbrio ecológico. Essas ações impulsionam a possibilidade de diminuir potenciais patógenos, vetores

de doenças e contaminações ambientais. Apresentando-se como uma frente na saúde única, os bioherbicidas estimulam a produção de alimentos mais saudáveis e diversificados.

## REFERÊNCIAS

Adetunji, C. O., Oloke, J. K., Bello, O. M., Pradeep, M. & Jolly, R. S. (2019). Isolation, structural elucidation and bioherbicidal activity of an eco-friendly bioactive 2-(hydroxymethyl) phenol, from *Pseudomonas aeruginosa* (C1501) and its ecotoxicological evaluation on soil. *Environmental Technology & Innovation*, 13, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.12.006>

Ash, G. J. (2010). The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control*, 52(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.007>

Bailey, K. L., Pitt, W. M., Falk, S. & Derby, J. (2011). The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control*, 58(3), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.001>

Bordin, E. R., Frumi Camargo, A., Rossetto, V., Scapini, T., Modkovski, T. A., Weirich, S., Carezia, C., Barretta Franceschetti, M., Balem, A., Golunski, S. M., Galon, L., Funghetto Fuzinato, C., Reichert Júnior, F. W., Fongaro, G., Mossi, A. J. & Treichel, H. (2018). Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. *Industrial Biotechnology*, 14(3), 157–163. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0007>

Bordin, E. R., Frumi Camargo, A., Stefanski, F. S., Scapini, T., Bonatto, C., Zanivan, J., Preczeski, K., Modkovski, T. A., Reichert Júnior, F., Mossi, A. J., Fongaro, G., Ramsdorf, W. A. & Treichel, H. (2021). Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security. *Biocatalysis and Biotransformation*, 39(5), 346–359. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1833864>

Camargo, A. F., Bonatto, C., Scapini, T., Klanovicz, N., Tadioto, V., Cadamuro, R. D., Bazoti, S. F., Kubeneck, S., Michelon, W., Reichert Júnior, F. W., Mossi, A. J., Alves Júnior, S. L., Fongaro, G. & Treichel, H. (2023b). Fungus-based bioherbicides on circular economy. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02926-w>

Camargo, A. F., Dalastra, C., Ulrich, A., Scapini, T., Bonatto, C., Klanovicz, N., Michelon, W., Lerin, L., Júnior, S. L. A., Mossi, A. J., Tramontin, M. A., Bernardi, O., Paudel, S. R., Fongaro, G. & Treichel, H. (2023a). The bioherbicidal potential of isolated fungi cultivated in microalgal biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(5), 665–679. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02852-x>

Cavalcante, B. D. M., Scapini, T., Camargo, A. F., Ulrich, A., Bonatto, C., Dalastra, C., Mossi, A. J., Fongaro, G., Di Piero, R. M. & Treichel, H. (2021). Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101947>

Chaves Neto, J. R., Nascimento dos Santos, M. S., Mazutti, M. A., Zabot, G. L. & Tres, M. V. (2021). *Phoma dimorpha* phytotoxic activity potentialization for bioherbicide

production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101986. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101986>

Christoffoleti, P. J. & López-Ovejero, R. (2003). Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, 21(3), 507–515. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000300020>

Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C. & Guillemin, J.-P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*, 87, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>

Ghorbani, R., Leifert, C. & Seel, W. (2005). Biological Control of Weeds with Antagonistic Plant Pathogens (pp. 191–225). [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)860043](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)860043)

Hasan, M., Mokhtar, A. S., Mahmud, K., Berahim, Z., Rosli, A. M., Hamdan, H., Motmainna, Mst. & Ahmad-Hamdani, M. S. (2022). Physiological and biochemical responses of selected weed and crop species to the plant-based bioherbicide WeedLock. *Scientific Reports*, 12(1), 19602. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24144-2>

Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W. & Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 173, 108086. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>

Klaic, R., Kuhn, R. C., Foletto, E. L., Dal Prá, V., Jacques, R. J. S., Guedes, J. V. C., Treichel, H., Mossi, A. J., Oliveira, D., Oliveira, J. V., Jahn, S. L. & Mazutti, M. A. (2015). An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. In *Fungal Biomolecules* (pp. 183–199). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch14>

Lombi, E., Donner, E., Dusinska, M. & Wickson, F. (2019). A One Health approach to managing the applications and implications of nanotechnologies in agriculture. *Nature Nanotechnology*, 14(6), 523–531. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0460-8>

Matthiensen, A. & Michelon, W. (2022). Produção de microalgas em sistema semiaberto: estrutura e funcionamento de tanques semicirculares (raceway tanks). *Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico*, 601., 17.

Mishra, R. K., Bohra, A., Kamaal, N., Kumar, K., Gandhi, K., GK, S., Saabale, P. R., SJ, S. N., Sarma, B. K., Kumar, D., Mishra, M., Srivastava, D. K. & Singh, N. P. (2018). Utilization of biopesticides as sustainable solutions for management of pests in legume crops: achievements and prospects. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s41938-017-0004-1>

Portela, V. O., Santana, N. A., Balbinot, M. L., Antonioli, Z. I., de Oliveira Silveira, A. & Jacques, R. J. S. (2022). Phytotoxicity Optimization of Fungal Metabolites Produced by Solid and Submerged Fermentation and its Ecotoxicological Effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 2980–3000. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03884-x>

Ramesh, M. & Abinaya, S. (2022). Synergistic effect of biosurfactant with bioherbicides and their effectiveness in the management of weeds. In *Applications of Biosurfactant in*

Agriculture (pp. 227–244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822921-7.00005-2>

Reichert Júnior, F. W., Scariot, M. A., Forte, C. T., Pandolfi, L., Dil, J. M., Weirich, S., Carezia, C., Mulinari, J., Mazutti, M. A., Fongaro, G., Galon, L., Treichel, H. & Mossi, A. J. (2019). New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. *Heliyon*, 5(5), e01676. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>

Sala, A., Vittone, S., Barrena, R., Sánchez, A. & Artola, A. (2021). Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: Use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 295, 113113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113113>

Saldaña-Mendoza, S. A., Pacios-Michelena, S., Palacios-Ponce, A. S., Chávez-González, M. L. & Aguilar, C. N. (2023). *Trichoderma* as a biological control agent: mechanisms of action, benefits for crops and development of formulations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 269. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03695-0>

Sardana, V., Mahajan, G., Jabran, K. & Chauhan, B. S. (2017). Role of competition in managing weeds: An introduction to the special issue. *Crop Protection*, 95, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.011>

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>

Soltys, D., Krasuska, U., Bogatek, R. & Gniazdowski, A. (2013). Allelochemicals as Bioherbicides — Present and Perspectives. In *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56185>

Stefanski, F. S., Camargo, A. F., Scapini, T., Bonatto, C., Venturin, B., Weirich, S. N., Ulkovski, C., Carezia, C., Ulrich, A., Michelon, W., Soares, H. M., Mathiensen, A., Fongaro, G., Mossi, A. J. & Treichel, H. (2020). Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.521102>

Ulrich, A., Lerin, L. A., Camargo, A. F., Scapini, T., Diering, N. L., Bonafin, F., Gasparetto, I. G., Confortin, T. C., Sansonovicz, P. F., Fabian, R. L., Reichert Júnior, F. W., Treichel, H., Müller, C. & Mossi, A. J. (2021). Alternative bioherbicide based on *Trichoderma koningiopsis*: Enzymatic characterization and its effect on cucumber plants and soil organism. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102127. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102127>

Yan, Z., Xiong, C., Liu, H. & Singh, B. K. (2022). Sustainable agricultural practices contribute significantly to One Health. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 1(3), 165–176. <https://doi.org/10.1002/sae2.12019>

Zagonel, J., Venâncio, W. S. & Kunz, R. P. (2000). Efeitos de métodos e épocas de controle das plantas daninhas na cultura do milho. *Planta Daninha*, 18(1), 143–150. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582000000100014>

## Ensaio de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento biotecnológico de produtos

DOI: 10.56041/9786599841859-4

**GUTERRES, Iara Zanella\***

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-12433765>

**DAI PRÁ, Isabella\***

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-6039-2534>

**BAUER, Yasmim Guterres**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-00033296-6419>

**CORREA, Giovana Sequinel**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0003-2939-8094>

**DALLEPIANE, Felipe Gomes**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0001-9677-9984>

**SEDREZ, Maria Eduarda**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-6573-1651>

**SCHULTE, Luise Gauer**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-8308-6337>

**SORDI, Mariane Beatriz**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-7873-0765>

**CRUZ, Ariadne Cristiane Cabral\*\***

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0001-7306-4708>

**SILVA, Izabella Thaís**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>

\* As autoras contribuíram igualmente para a execução do trabalho.

\*\* Autor Correspondente: [ariadne.cruz@ufsc.br](mailto:ariadne.cruz@ufsc.br)

## RESUMO

Muitos experimentos *in vitro* podem ser conduzidos para determinar a inocuidade de substâncias e biomateriais para serem empregados como agentes terapêuticos e cosméticos, lembrando que estes idealmente não podem apresentar citotoxicidade para desempenharem suas funções no organismo humano. Assim, novos fármacos, cosméticos, aditivos alimentares e biomateriais devem ter seu efeito citotóxico testado antes de serem liberados para uso humano. Historicamente, estes testes incluíam um grande número de experimentação em animais; porém, atualmente há vários métodos alternativos elaborados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Adicionalmente, a comunidade científica internacional continua se esforçando para seguir o princípio dos 3Rs em relação ao uso de animais, ao mesmo tempo que instituições públicas e privadas vêm alocando recursos humanos e financeiros para desenvolver novas metodologias *in vitro*. Deste modo, no presente capítulo serão abordados os principais métodos destinados à avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Acredita-se que a adoção destes métodos alternativos possa contribuir para a aceleração do processo de avaliação de novos produtos, com potencial redução de tempo e de custos para que sejam colocados à disposição da população.

**Palavras-Chave:** Biocompatibilidade; Ensaios *in vitro*, ISO 10993; 3Rs; Biotecnologia

## INTRODUÇÃO

A avaliação da citotoxicidade é um passo crucial no desenvolvimento biotecnológico de produtos, sendo essencial para garantir a segurança e eficácia de novas formulações. O desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e biomateriais é um processo complexo que demanda uma série de avaliações rigorosas para obter a aprovação regulatória. Dentro deste contexto, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* emergem como uma técnica de suma importância. Estes ensaios são empregados para a detecção de potenciais efeitos tóxicos, tendo como objetivo primordial a avaliação da segurança dos produtos em questão, em uma fase inicial do processo de desenvolvimento. Além disso, eles desempenham um papel crucial na antecipação e mitigação de potenciais riscos à saúde dos indivíduos, ao mesmo tempo em que asseguram a eficácia destes produtos (Jiang et al., 2022).

Em 1959, William Russel e Rex Bursch publicaram *The Principles of Humane Experimental Technique*, e, a partir desta publicação, surge o princípio dos 3Rs do inglês Reduction, Refinement e Replacement, o qual visa a proteção do uso de animais na pesquisa científica e nas diferentes etapas de desenvolvimento de produtos. O primeiro princípio referente à redução almeja a obtenção da mesma quantidade de informações utilizando o menor número de animais possíveis; o segundo princípio, chamado de refinamento, considera a redução e minimização da dor, sofrimento e estresse do animal, aprimorando as técnicas de manuseios destes animais; enquanto o terceiro princípio, a substituição, aponta que se deve

buscar métodos alternativos, sempre que possível, substituindo por completo a utilização de animais. A substituição é atribuída a qualquer método que substitui o uso de vertebrados conscientes por material não sensível e vem sendo amplamente investigada nas últimas décadas, podendo ser subdividida em substituição relativa, onde animais são utilizados, mas não expostos a nenhum sofrimento, ou absoluta, onde nenhum animal é utilizado em qualquer fase experimental (Balls, 2002; Doke & Dhawale, 2015).

A utilização de culturas de células e de tecidos *in vitro*, que consistem no crescimento de células em um ambiente controlado fora do organismo de origem, apresenta uma alternativa valiosa aos experimentos em animais. Assim, é possível retirar células e tecidos de diferentes órgãos e animais, mantendo-os em um meio de crescimento apropriado por períodos que variam de dias, meses, e até mesmo anos. Adicionalmente, as culturas de células animais *in vitro* envolvem o isolamento e o crescimento destas em ambientes artificiais, tais como placas ou frascos de cultura, podendo ser empregadas para diversas finalidades. Assim, a cultura celular é uma ferramenta com várias vantagens, como facilidade de aplicação, economia de tempo e redução de custos, sendo frequentemente empregada na avaliação preliminar da toxicidade e da eficácia de substâncias com potencial atividade biotecnológica (Doke & Dhawale, 2015).

Diante do exposto, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* representam uma abordagem promissora e uma alternativa ética e precisa ao uso de animais em experimentos laboratoriais e, este capítulo, aborda as técnicas mais utilizadas para avaliar a citotoxicidade, trazendo informações detalhadas sobre os ensaios mais relevantes dentro das normativas.

## **PRINCIPAIS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

### **MTT**

O ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) introduzido por Mosmann em 1983, está entre os ensaios de viabilidade celular mais versáteis e populares no mundo. Isto devido ao fato de ser um método rápido, simples, sensível e com excelente linearidade em diferentes densidades celulares, sendo possível realizá-lo em células aderentes e não aderentes (Kumar et al., 2018; Präbst et al., 2017). Pequenas modificações na atividade metabólica celular podem resultar em mudanças substanciais nos resultados do método de MTT, permitindo a detecção do estresse celular quando exposto a agentes citotóxicos, mesmo na ausência de morte celular (Kumar et al., 2018).

Este ensaio tem como princípio a redução do sal de tetrazólio, o qual é amarelo e solúvel em água, pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas onde ocorre a formação de cristais de formazana que possuem coloração roxa e são insolúveis em água (Berridge et al., 2005; Ghasemi et al., 2021). A intensidade da cor dos cristais de formazana está diretamente relacionada à quantidade de células viáveis. Convém ressaltar que, após a dissolução dos cristais, ocorre a lise celular (Gonzalez & Tarloff, 2001). Conseqüentemente, a formação do

formazana é interrompida e o ponto final da reação é empregado para a avaliação da viabilidade das culturas celulares por meio da medição da densidade óptica.

## **MTS**

O método de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) combina todas as características de um bom sistema de medição em termos de facilidade de uso, precisão e rápida indicação de toxicidade (Berg et al., 1994). Neste ensaio, o reagente é reduzido por células viáveis, na presença de metossulfato de fenazina (PMS) ou sulfato de etilfenazina (PES), também pelas desidrogenases mitocondriais, gerando cristais de formazana (Barltrop et al., 1991). O método de MTS surgiu como uma alternativa ao MTT, contornando alguns problemas que este último apresentava (Buttke et al., 1993). O MTS, assim como outros reagentes de tetrazólio (XTT e WST), permite a formação direta de produtos solúveis, eliminando a etapa de solubilização dos precipitados intracelulares produzidos pela conversão do MTT (Ishiyama et al., 1993; Roehm et al., 1991).

Cabe ressaltar que o reagente MTS apresenta carga negativa o que contribui para a solubilidade no meio de cultura aquoso, porém, tal propriedade limita a sua permeabilidade celular, sendo assim, é necessário a intermediação de um aceptor de elétrons, como o PMS ou PES, conforme já citado. Isto permite a sua penetração nas células viáveis e conversão do tetrazólio no produto solúvel de formazana (Berridge et al., 2005). O uso do MTS também permite a leitura contínua da absorbância, desde estágios iniciais do experimento (Riss et al., 2004).

O ensaio MTS é frequentemente descrito como um “ensaio de MTT de um passo”, o que oferece a facilidade de adicionar o reagente diretamente à cultura de células, sem os passos intermitentes necessários no método MTT. A vantagem do MTS em relação ao MTT é que o primeiro é mais solúvel e não tóxico, permitindo que as células sejam devolvidas à cultura para posteriores avaliações ou ensaios adicionais. A desvantagem é que ele requer a presença de PMS ou PES para uma redução eficiente (Cory et al., 1991).

## **Sulforrodamina B (SRB)**

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando a Sulforrodamina B (SRB), inicialmente proposto por Skehan et al. em 1990, representa uma técnica amplamente empregada na avaliação da viabilidade em culturas celulares. O método se baseia na capacidade da Sulforrodamina B de se ligar a resíduos de aminoácidos básicos presentes em proteínas celulares fixadas, permitindo a quantificação do conteúdo de proteínas celulares e, conseqüentemente, a estimativa da quantidade de material celular viável (Shakil et al., 2022).

O protocolo padrão para o ensaio de SRB consiste na etapa inicial de tratamento das células, seguida pela fixação das mesmas com ácido tricloroacético (TCA) para assegurar a preservação das proteínas celulares. Posteriormente, a adição de Sulforrodamina B resulta na coloração das proteínas celulares, possibilitando a mensuração subsequente da absorbância, a qual reflete a quantidade de Sulforrodamina B ligada e, por conseguinte, o conteúdo de

material celular presente na cultura (Vichai & Kirtikara, 2006).

Apesar de sua ampla aplicabilidade e eficiência na avaliação de tratamentos experimentais em culturas celulares, é necessário destacar que o ensaio de SRB apresenta limitações importantes. A avaliação da viabilidade celular é indireta e dependente da quantidade de material celular ao invés de refletir diretamente a viabilidade celular intrínseca (Shakil et al., 2022). Além disso, fatores experimentais, incluindo fixação inadequada das células, a presença de contaminantes ou amostras com coloração, podem afetar a ligação da Sulforrodamina B e, portanto, distorcer os resultados do ensaio (Vichai & Kirtikara, 2006).

Porém, apesar das limitações mencionadas, o ensaio de Sulforrodamina B é uma ferramenta amplamente empregada na avaliação de citotoxicidade *in vitro*, proporcionando informações valiosas sobre a viabilidade celular (Orellana & Kasinski, 2016).

## **Alamar Blue**

O Alamar Blue, também conhecido como resazurina, é um reagente utilizado na avaliação da viabilidade celular (Gonzalez & Tarloff, 2001). Além da viabilidade, esta substância possui aplicações destinadas à análise de apoptose, função e controle do ciclo celular em uma variedade de sistemas biológicos e ambientais (O'Brien et al., 2000). A resazurina destaca-se por sua ausência de toxicidade e capacidade de atravessar as membranas celulares. A utilização deste composto se baseia no fato que, inicialmente, o mesmo apresenta uma coloração azul desprovida de propriedades fluorescentes (White et al., 1996). No entanto, quando incorporada nas células, sofre redução, transformando-se em resorufina, uma substância de coloração vermelha e com notável fluorescência (Rampersad, 2012). Esta transição de estado, da forma oxidada para a forma reduzida, oferece flexibilidade nas medições, permitindo avaliações quantitativas por meio de leituras colorimétricas e fluorimétricas em dois comprimentos de onda distintos (Page et al., 1993).

A eficiência do ensaio de citotoxicidade empregando a resazurina é influenciada por diversos fatores incluindo a composição do meio de cultura, a capacidade de tampão, o pH, a densidade celular, a temperatura de incubação, as interações químicas entre os componentes do meio, bem como a concentração e o tempo de exposição ao composto-teste (O'Brien et al., 2000). Adicionalmente, é importante conduzir os ensaios em condições de ausência de luz uma vez que o Alamar Blue é sensível à luz (Longhin et al., 2022). Além disso, é recomendável que as células estejam na fase exponencial de crescimento, uma vez que a intensidade da cor vermelha reflete a extensão da proliferação celular (Ansar Ahmed et al., 1994).

## **Vermelho neutro (VN)**

O ensaio de retenção de Vermelho Neutro (VN) tem como fundamento avaliar e quantificar a capacidade das células viáveis de reter o corante vermelho neutro em seus lisossomos intracelulares (Repetto et al., 2008; Rodrigues et al., 2023). Após a lavagem, o corante é extraído das células utilizando etanol acidificado e a sua concentração é determinada por espectrofotometria (Repetto et al., 2008). Dado que somente as células viáveis possuem

esta capacidade, a quantidade de corante medida está diretamente relacionada ao número de células vivas (Rodrigues et al., 2023).

Este ensaio é aplicável a uma ampla variedade de linhagens celulares, tanto as aderentes quanto as não aderentes, desde que protocolos estabelecidos sejam estritamente seguidos (Repetto et al., 2008). O ensaio de captação de VN é um procedimento sensível e de fácil quantificação, exigindo menos equipamentos e sendo economicamente mais viável em comparação aos outros testes de viabilidade amplamente utilizados. Além disso, ele é menos suscetível a interferências e possui uma sensibilidade superior. No entanto, é importante observar que, uma vez iniciado, o ensaio deve ser concluído imediatamente, já que não é possível fixar ou congelar as células tendo em vista que o ensaio se baseia na determinação do conteúdo total de lisossomos de células viáveis (Repetto et al., 2008).

### **Lactato desidrogenase (LDH)**

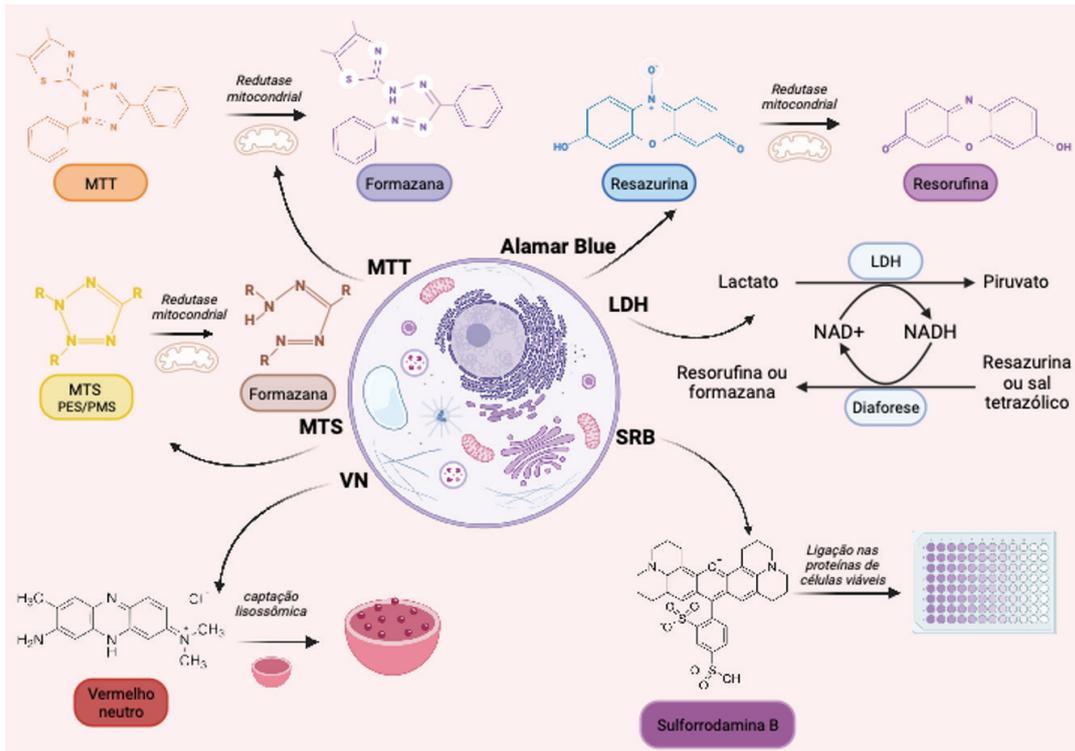
O ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a citotoxicidade de substâncias em culturas celulares. Ele mede a liberação da enzima LDH, que está presente no citoplasma das células, quando a membrana celular é danificada, indicando morte celular ou lesão (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). O ensaio de LDH se baseia na conversão do substrato tetrazólio em um produto colorido solúvel em água. A quantidade de produto formado é diretamente proporcional à concentração de LDH liberada no meio de cultura (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; P. Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019).

O método de LDH é uma técnica simples e rápida, onde as células em cultura são expostas à substância ou ao fármaco em teste. Após o período de exposição, uma alíquota do meio de cultura é coletada. A reação enzimática é iniciada pela adição de substrato e cofatores enzimáticos. Após o tempo de incubação, a reação é interrompida e a absorbância é medida em um espectrofotômetro (Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019). A absorbância medida é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada, ou seja, quanto maior a absorbância, maior a citotoxicidade avaliada.

O ensaio de LDH oferece diversos benefícios na avaliação da citotoxicidade em culturas celulares e na pesquisa biotecnológica. Alguns dos principais benefícios incluem simplicidade e facilidade de execução, sensibilidade, reprodutibilidade, avaliação quantitativa e baixo custo (Decker & Lohmann-Matthes, 1988).

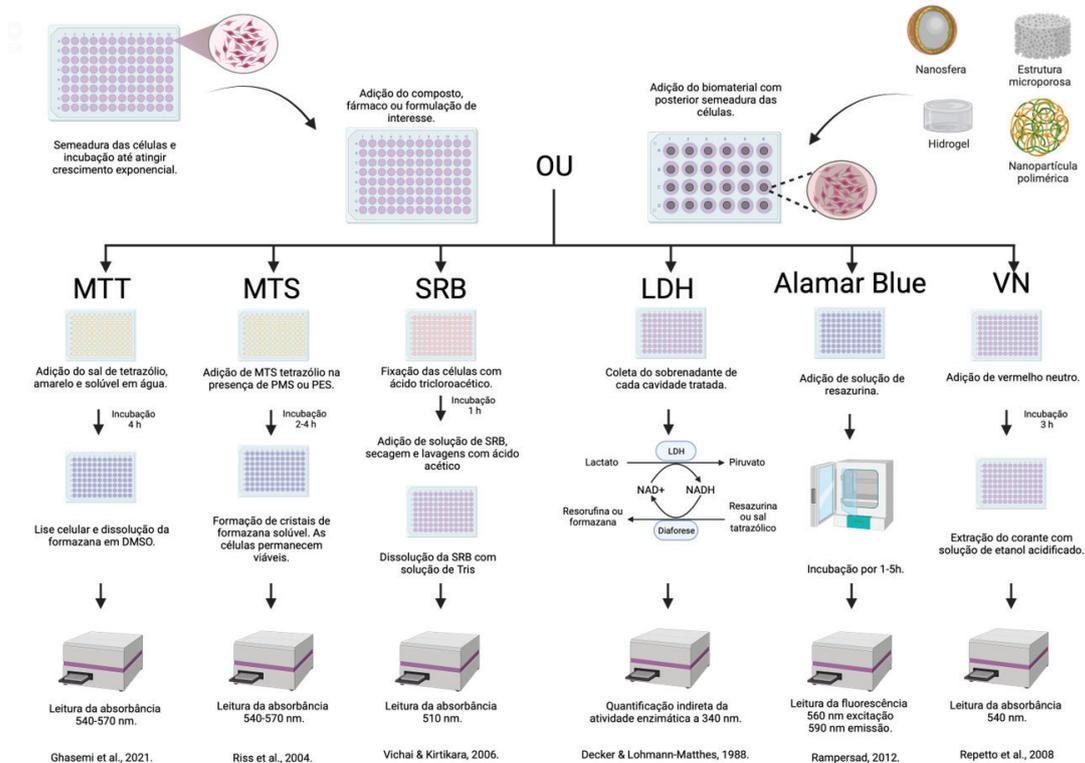
Na Figura 1 estão representadas as principais técnicas empregadas para avaliar a citotoxicidade de amostras *in vitro*, enquanto no Quadro 1 é possível encontrar um compilado das vantagens e desvantagens das principais técnicas.

**Figura 1** - Principais métodos empregados para avaliação da citotoxicidade *in vitro*.



A Figura 2 descreve a metodologia resumida das técnicas empregadas para determinação da citotoxicidade celular.

**Figura 2** - Metodologia resumida das técnicas para determinação da citotoxicidade *in vitro*.



**Quadro 1** - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de avaliação de citotoxicidade in vitro.

<b>TÉCNICA</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
<b>MTT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido.</li> <li>- Simples.</li> <li>- Econômico.</li> <li>- Sensível a mudanças metabólicas das células.</li> <li>- Utilização em diversos modelos celulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Causa lise celular.</li> <li>- Longo tempo longo de incubação.</li> <li>- Necessidade de equipamento para leitura.</li> <li>- Incluiu componentes tóxicos.</li> <li>- Compostos-testes podem interferir na reação afetando os resultados.</li> </ul>
<b>MTS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido.</li> <li>- Simples.</li> <li>- Econômico.</li> <li>- Alta sensibilidade.</li> <li>- Elevada taxa de reprodutibilidade.</li> <li>- Tempo de incubação curto.</li> <li>- Não causa lise ou toxicidade celular.</li> <li>- Pode ser realizado com culturas celulares em andamento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Demanda equipamento para leitura.</li> <li>- Não fornece informações detalhadas sobre os mecanismos de toxicidade.</li> </ul>
<b>SRB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilita pausas entre as etapas.</li> <li>- Não tóxico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Avaliação da viabilidade celular é indireta.</li> <li>- A presença de contaminantes ou amostras com coloração podem afetar a ligação da Sulforrodamina B.</li> </ul>
<b>LDH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica rápida e simples, alta sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Falta de especificidade, limitações na detecção de citotoxicidade, falta de detalhes sobre mecanismos de ação.</li> </ul>
<b>Alamar Blue</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Não tóxico.</li> <li>- Alta sensibilidade.</li> <li>- Não ocorre lise celular.</li> <li>- Pode ser usado em diferentes modelos celulares.</li> <li>- É escalonável.</li> <li>- Leitura pode ser realizada por meio de fluorescência e/ou absorvância.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compostos testes podem interferir na sensibilidade da técnica.</li> <li>- Demanda de equipamentos específicos para leitura.</li> <li>- Sensível à luminosidade.</li> </ul>
<b>Vermelho neutro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicado em diferentes tipos celulares.</li> <li>- Simples.</li> <li>- Facilmente quantificável.</li> <li>- Apresenta pouca interferência.</li> <li>- Sensível.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uma vez iniciado, deve ser concluído imediatamente.</li> <li>- Limitações relacionadas ao caráter dos compostos a serem testados.</li> </ul>

## REFERÊNCIAS

- Ansar Ahmed, S., Gogal, R. M. & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
- Balls, M. (2002). Future improvements: Replacement in vitro methods. *ILAR Journal*, 43(SUPPL.). [https://doi.org/10.1093/ilar43.suppl\\_1.s69](https://doi.org/10.1093/ilar43.suppl_1.s69)
- Barltrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H. & Cory, J. G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. In *Bimrganic & Metficti Chunrrlry Lerters* (Vol. 1, Issue 11).
- Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, Issue SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Buttke, T. M., McCubrey, J. A. & Owen, T. C. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods*, 157(1–2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90092-L](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90092-L)
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A. & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7). <https://doi.org/10.3727/095535491820873191>
- Decker, T. & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Doke, S. K. & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gonzalez, R. J. & Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 15(3). [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)000145](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)000145)
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M. & He, P. (1993). A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6). <https://doi.org/10.1248/cpb41.1118>
- ISO/EN109935. (2009). ISO 109935 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. International Standard ISO, 3 Ed.
- Jiang, M., Chattopadhyay, A. N. & Rotello, V. M. (2022). Cell-Based Chemical Safety Assessment

and Therapeutic Discovery Using Array-Based Sensors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073672>

Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>

Kumar, S., Kumar, A., Mamidi, P., Tiwari, A., Kumar, S., Mayavannan, A., Mudulli, S., Singh, A. K., Subudhi, B. B. & Chattopadhyay, S. (2018). Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19295-0>

Longhin, E. M., El Yamani, N., Rundén-Pran, E. & Dusinska, M. (2022). The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

Orellana, E. & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL*, 6(21). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1984>

Page, B., Page, M. & Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*, 3(3). <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3473>

Parhamifar, L., Andersen, H. & Moghimi, S. M. (2019). Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1943). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4_18)

Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. (2017). Cell Viability Assays: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. *Methods in Molecular Biology*, 1601.

Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/s120912347>

Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Riss, T. L., Nilas, A. L. & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. Assay Guidance Manual. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

Rodrigues, R. M., Stinckens, M., Ates, G. & Vanhaecke, T. (2023). Neutral Red Uptake Assay to Assess Cytotoxicity In Vitro. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2644). [https://doi.org/10.1007/978-1-071630525\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-071630525_15)

Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. & Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90114-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90114-U)

Russel, W. M. S. & Bursch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*.

Shakil, M. S., Rana, Z., Hanif, M. & Rosengren, R. J. (2022). Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents. In *Anti-Cancer Drugs* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001131>

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13). <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

White, M. J., DiCaprio, M. J. & Greenberg, D. A. (1996). Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 70(2). [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)001185](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)001185)

## Bioprospecção de metabólitos de leveduras para fins biotecnológicos aplicados à saúde

DOI: 10.56041/9786599841859-5

### **DOS SANTOS, Angela Alves**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-8621-4311>

### **TADIOTO, Viviani**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-76285175>

### **GIEHL, Anderson**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil

<https://orcid.org/0000-000252783436>

### **BRESSAN, Stéfany Kell**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0009-0000-9942-648X>

### **WERLANG, Larissa**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0009-0007-4750-8505>

**OLIVEIRA, Camila Girardi**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/009-0003-7957-7426>

**DINIZ, Mariana Da Costa**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-7692-9893>

**PEREIRA, Triciane Tornai**

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0009-0001-2572-9186>

**SILVA, Izabella Thaís**

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>

**FONGARO, Gislaine**

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.

<https://orcid.org/0000-000155963320>

**ALVES, Sérgio Luiz Jr.\***

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil.

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-7787-971X>

\*Autor Correspondente: slalvesjr@uffs.edu.br

## RESUMO

As leveduras, fungos unicelulares amplamente empregados na indústria de alimentos e bebidas, estão desempenhando um papel cada vez mais relevante na síntese de metabólitos naturais para fins biotecnológicos. Esses metabólitos, de natureza diversificada, encontram aplicações em diversos setores, particularmente na área da saúde, e abrangem uma variedade de moléculas com atividades biológicas vantajosas, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. Nesse contexto, este capítulo visa explorar as leveduras que ocorrem naturalmente como produtoras de metabólitos bioativos, explanando os tipos de compostos que elas produzem e destacando suas potenciais aplicações em benefício da saúde humana. Também são discutidas as abordagens biotecnológicas mais promissoras para a produção de metabólitos terapêuticos a partir de leveduras, que incluem (1) o isolamento de leveduras e a otimização de processos de fermentação e extração dos compostos, (2) a engenharia genética de leveduras para melhorar a produção desses compostos, e (3) testes de citotoxicidade e avaliação do potencial terapêutico dos metabólitos de leveduras. Em síntese, as leveduras desempenham um papel crucial na produção de metabólitos naturais com múltiplas propriedades benéficas para a saúde, e este capítulo investiga as estratégias e avanços biotecnológicos que estão impulsionando o potencial terapêutico desses compostos.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos; antimicrobianos; antioxidantes; anticâncer; biotecnologia.

## INTRODUÇÃO

As leveduras têm papel fundamental na história da humanidade, sobretudo na produção de alimentos e bebidas (Rani et al., 2021). Com o avanço da ciência, esses microrganismos encontraram novas aplicações na pesquisa genética e na indústria farmacêutica, contribuindo também para a produção de medicamentos e enzimas (Kulagina et al., 2021). No entanto, para além dessas aplicações, as leveduras representam também uma rica fonte de metabólitos bioativos — substâncias com diversas funções biológicas. Entre esses compostos, alguns apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antineoplásicas, o que se traduz em oportunidades para o desenvolvimento de novos medicamentos, com a perspectiva de maior eficácia e menores efeitos colaterais em comparação as opções de tratamento existentes (Rahmat & Kang, 2020). Metabólitos antibacterianos, por exemplo, podem assumir uma importância ainda maior em um cenário onde o aumento das cepas bacterianas resistentes a antibióticos se tornou um desafio global (Muccilli & Restuccia, 2015).

Considerando este campo promissor, as seções a seguir apresentam metabólitos produzidos por leveduras que possuem propriedades terapêuticas, bem como os ambientes naturais dos quais essas leveduras vêm sendo isoladas. Ao final, algumas formas de isolar leveduras e extrair tais compostos, o papel da engenharia genética no aumento da produtividade e, ainda, como são realizados os testes de citotoxicidade desses metabólitos também são

abordados.

## LEVEDURAS COMO FONTES DE METABÓLITOS NATURAIS COM PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

As leveduras são eucariotos unicelulares encontrados na natureza em diferentes condições de crescimento, incluindo ambientes extremos. Essa característica pode proporcionar a aplicação desses organismos na preservação ambiental e em distintos setores da indústria. Além do uso tradicional na fermentação de pães e bebidas, as leveduras podem contribuir para o biocontrole de organismos indesejados (Muccilli & Restuccia, 2015) através da competição por ambiente e nutrientes (Liu et al., 2013) e, entre outros fatores, pela síntese de compostos que atenuam, e até mesmo impedem, a sobrevivência de outros organismos (Schmitt & Breinig, 2006).

Diversas leveduras podem sintetizar, por exemplo, toxinas *killer*, que são de grande aplicabilidade no controle de organismos patogênicos (incluindo organismos resistentes aos antibióticos usados atualmente), e na biopreservação de alimentos pela ação antifúngica (Marquina et al., 2002; Muccilli & Restuccia, 2015). A levedura *Pichia kudriavzevii*, por exemplo, secreta a toxina *killer* RY55, que apresenta atividade antibacteriana diante de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (Bajaj et al., 2013). De forma similar, a levedura *Pichia anomala* apresenta atividade antifúngica, além de poder atuar em processos de biorremediação (Walker, 2011).

Outra característica importante das leveduras é o metabolismo fermentativo, isto é, esses organismos podem converter carboidratos em álcool ou ácido, eliminando dióxido de carbono, para obtenção de energia (Maicas, 2020). Nesse sentido, as leveduras são organismos potenciais para melhoria da nutrição humana. *Brettanomyces claussenii*, por exemplo, pode utilizar a lactose durante o processo fermentativo do leite permeado, gerando produtos com baixo teor de glicose e ricos em galactose (Rivera Flores et al., 2023). Por meio da capacidade fermentativa, leveduras podem ser usadas, ainda, na biossíntese de produtos naturais que substituem o açúcar, como oligossacarídeos (2'-fucosilactose e trealose), álcoois de açúcar (como eritritol e xilitol), glicosídeos (rubusosídeos e glicirrizina), além de monossacarídeos raros como D-psicose e D-tagatose (Li et al., 2023).

Microrganismos extremófilos, adaptados a ambientes de condições extremas, desempenham um papel crucial na pesquisa científica, e a Antártica tem sido um foco importante nesse contexto. Leveduras encontradas no solo ou até mesmo na água em regiões polares desenvolveram notáveis estratégias de sobrevivência e tolerância ao estresse, e demonstram potencial na produção de novas enzimas e metabólitos secundários, como compostos bioativos (Zucconi et al., 2020). De maneira similar, leveduras isoladas em altas altitudes, expostas constantemente a radiação ultravioleta, desenvolveram como estratégias de sobrevivência a produção compostos com capacidade fotoprotetora como a micosporina. Leveduras do clado *Erythrobasidium* e *Tremellales*, por exemplo, isoladas da Patagônia (Argentina) apresentam

micosporinas absorventes de ultravioleta (310320 nm) (Libkind et al., 2005). Além disso, leveduras encontradas em lagos com alta altitude na Antártica como *Cryptococcus antarcticus*, *Rhodotorula laryngis* e *Exophiala xenobiotica* também são produtoras de micosporinas (Vaz et al., 2011).

Algumas leveduras também podem produzir e liberar exopolissacarídeos (EPS), polímeros de carboidrato com alto peso molecular que podem apresentar atividade antioxidante. Nesse sentido, a cepa *Rhodotorula mucilaginosa* GOMAS16 demonstrou liberar EPS com maior atividade antioxidante do que a de biopolímeros como ácido hialurônico (Hamidi et al., 2020). Leveduras isoladas na Ilha Livingston, *Cryptococcus laurentii* AL65, *Sporobolomyces salmonicolor* AL36, *Debaryomyces hansenii*, *Leucosporidium scottii* e *Rhodotorula glutinis*, também se mostram produtoras de EPS. Essas leveduras são também grandes produtoras de aminoácidos como leucina, alanina e valina, com aplicações em tratamentos médicos (Rusinova-Videva et al., 2019). O Quadro 1 destaca outros metabólitos gerados por leveduras, bem como suas propriedades terapêuticas, evidenciando a diversidade de compostos com atividade biológica que podem ser produzidos por esses microrganismos.

**Quadro 1** – Exemplos de metabólitos produzidos por leveduras e suas propriedades terapêuticas

Levedura	Composto	Propriedade terapêutica	Referência
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Coenzima Q10 e $\beta$ -caroteno	Barreira contra radiação ultravioleta	(Dimitrova et al., 2010)
<i>Cryptococcus laurentii</i>			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Terpenos	Anti-inflamatórios, anticancerígenos e neuroprotetores	(Kiyama, 2017; Worland et al., 2020)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			(Liang et al., 2021)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hiosciamina e escopolamina	Atividade anticolinérgica	(Cardillo et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Antocianinas e flavonóides	Atividade antioxidante	(Martín-Gómez et al., 2021)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Ácido gálico e catequina		(Vieira et al., 2016)

Os carotenóides — compostos orgânicos secundários, solúveis em gordura e facilmente encontrados na natureza — também podem ser produzidos por leveduras. Estes compostos são responsáveis pelos pigmentos avermelhados, alaranjados ou amarelados presentes nas frutas, vegetais e óleos (Li et al., 2022). Além de sua função como pigmentos naturais, essas moléculas possuem alta atividade antioxidante, previnem doenças cardiovasculares e oculares, são capazes de aumentar a imunidade e são também a principal fonte de vitamina A (Johra et al., 2020; Kot et al., 2018; Krinsky & Johnson, 2005).

Apesar dos inúmeros benefícios que oferecem, os carotenóides não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, precisam ser suplementados. Atualmente, mais de 90% dos carotenóides necessários em aplicações industriais são produzidos por métodos químicos. Entretanto, a produção química poderia ser facilmente substituída por microrganismos (Kot

et al., 2018; Tang et al., 2019). Nesse sentido, leveduras pigmentadas do gênero *Rhodotorula*, além de leveduras da classe Tremellomycetes, como *Cystofilobasidium infirmomiiatum* e *C. capitatum*, e outras da classe Microbotryomycetes, como *Rhodosporidium babjevae* e *Sporobolomyces ruberrimus*, são capazes de produzir carotenóides como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina, compostos que apresentam funções antimicrobianas e antioxidantes, além de propriedades antitumorais (Burton et al., 2021; Kot et al., 2018; Z. Li et al., 2022).

## USO DE METABÓLITOS DE LEVEDURAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

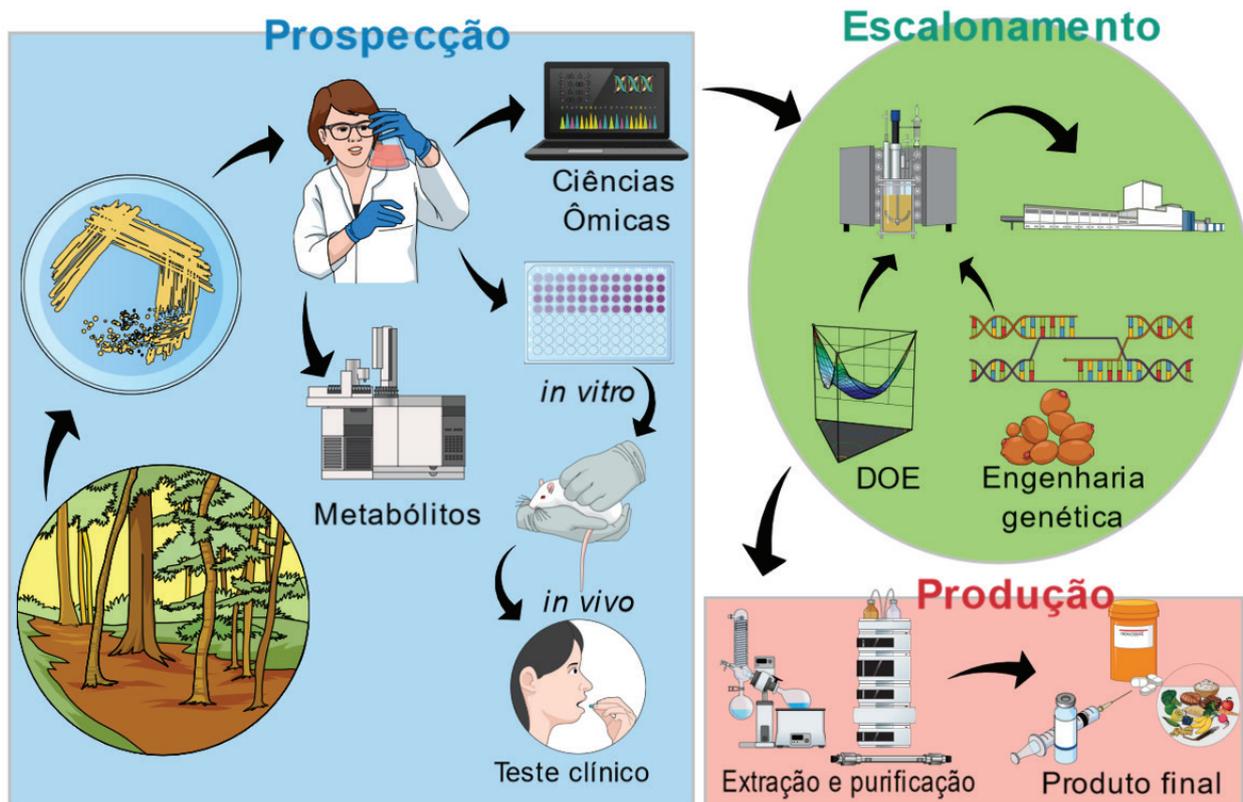
Os estudos sobre compostos produzidos por leveduras com potencial antitumoral estão em constante evolução. Alguns compostos, como os  $\beta$ -D-glucanos, apresentam propriedades antitumorais promissoras. Estudos iniciais sugerem que os  $\beta$ -D-glucanos — polissacarídeos encontrados em diversas fontes, incluindo algumas leveduras, fungos e cereais, como a cevada e a aveia — têm propriedades imunomoduladoras e atividade antitumorais, estimulando o sistema imunológico, especialmente os macrófagos, na defesa contra o câncer (Abreu et al., 2015). No entanto, mais pesquisas clínicas são necessárias para confirmar sua eficácia e segurança. Além disso, o  $\beta$ -D-glucano pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando na morte celular, embora o mecanismo exato ainda não seja completamente compreendido (Abreu et al., 2015).

Ainda no contexto de metabólitos de leveduras com atividade antitumoral, o potencial terapêutico da enzima L-asparaginase, produzida por leveduras como *Candida utilis*, *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*, também é digno de nota (Arima et al., 1972; Soler, 2016). Essa enzima possui propriedades antitumorais, onde sua ação envolve a hidrólise da L-asparagina, um aminoácido essencial para o crescimento de certas células tumorais (Killander et al., 1976). A redução da L-asparagina impede a síntese de proteínas, inibindo a multiplicação das células tumorais (Soler, 2016). Essa molécula pode, portanto, ser utilizada no tratamento de leucemias linfoblásticas agudas e linfomas, geralmente em combinação com outros agentes quimioterápicos, variando de acordo com o tipo e o estágio do câncer e as condições dos pacientes (El-Nagga et al., 2014).

## ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS TERAPÊUTICOS A PARTIR DE LEVEDURAS

Como já visto nas seções anteriores, a biodiversidade de leveduras existente no planeta se torna uma fonte de novos produtos ou mesmo de moléculas já conhecidas, além de auxiliar na resolução de problemas ainda não resolvidos na medicina atual, e trazer uma forma mais sustentável na síntese de fármacos, bem como uma economia que valoriza a importância da existência da biodiversidade (Tadioto et al., 2023). Para realizar essa bioprospecção, são necessárias abordagens integradas que vão desde o isolamento das leveduras até o escalonamento do produto de interesse, por meio de várias técnicas e processos laboratoriais, farmacológicos e industriais (Figura 1).

**Figura 1** - Métodos integrados para a bioprospecção de metabólitos de leveduras: técnicas de coleta seletiva e isolamento são essenciais, juntamente com testes fenotípicos e abordagens *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, e clínicas. Uma vez identificados os compostos de interesse, o escalonamento da produção requer um conhecimento aprofundado das variáveis envolvidas, com métodos como o Design de Experimentos (DOE) e biologia molecular. Podem ser requeridas, ainda, extrações e purificações dos produtos, variando de processos unitários convencionais a técnicas de cromatografia, dependendo das concentrações e natureza dos metabólitos ou proteínas produzidos.



## ISOLAMENTO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS TERAPÊUTICOS

No contexto da prospecção de leveduras naturalmente produtoras de compostos terapêuticos, inicialmente, é necessário isolar essas leveduras do ambiente. Nesse sentido, devem ser consideradas as características adaptativas tanto para a escolha do tipo de amostra, quanto no processo de isolamento, e é importante a utilização de meios e condições de cultivo seletivos, de modo a propiciar condições que evidenciem as características fenotípicas das linhagens que serão isoladas (de Souza et al., 2023; Tadioto et al., 2022).

Após a obtenção das culturas puras, são necessários testes fenotípicos que avaliem a capacidade de produção de compostos antitumorais, antibacterianos, virucidas, ou até mesmo do potencial probiótico e nutracêutico dos metabólitos. Concomitantemente, as abordagens *in silico* (Atanasov et al., 2021) podem auxiliar na busca de genes que conferem o metabolismo da produção dos compostos de interesse, no screening de possíveis proteínas e metabólitos secundários que possam ser aplicadas em testes posteriores *in vitro*, *in vivo* e clínicos, após o conhecimento da molécula contendo o princípio ativo (Saeidnia et al., 2016).

Assim que comprovado o potencial terapêutico ou nutricional, o escalonamento para a produção do bioproduto é necessário. Em vista da pouca exigência das leveduras quanto as fontes de carbono (Parapouli et al., 2020), é necessário conhecer as demais variáveis que influenciam na maior produção dos metabólitos e proteínas de interesse a fim de otimizar a produção. Metodologias como o Design de Experimentos (DOE) (Knight, 2010) e de biologia molecular auxiliam no aumento da produtividade ou rendimento (Lebozec et al., 2018; Martínez et al., 2012), assim como facilitam o processo de escalonamento ao auxiliar na compreensão em nível bioquímico da reação de conversão de substrato em produto.

Por fim, os métodos de extração e purificação do produto final dependem das concentrações de produto geradas, já compreendidas pelas abordagens prévias descritas nesta seção. Quando produzida em quantidades maiores, processos unitários convencionais podem ser empregados, como a destilação, filtração, adsorção e separação por fase (He et al., 2016; Ventura et al., 2017). Contudo, como alguns desses metabólitos ou proteínas são produzidos em pequenas quantidades, técnicas de cromatografia se tornam necessárias para a separação e purificação do produto (Gurramkonda et al., 2010).

## **PRODUÇÃO DE METABÓLITOS TERAPÊUTICOS UTILIZANDO LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS**

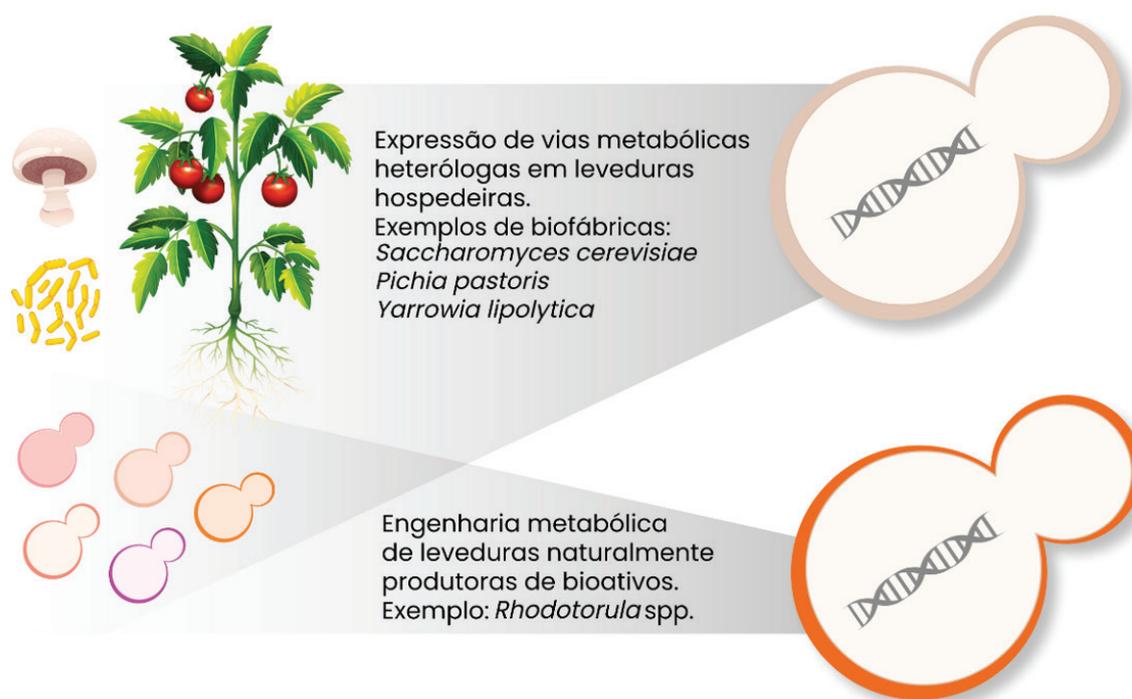
As leveduras têm sido microrganismos valiosos na indústria biotecnológica, servindo como biofábricas no desenvolvimento de vários bioprodutos, principalmente biocombustíveis e proteínas e, mais recentemente, metabólitos terapêuticos. O desenvolvimento e o aperfeiçoamento da tecnologia do DNA recombinante e das ferramentas de biologia sintética vêm permitindo a modificação genética de várias espécies de leveduras, fornecendo vias otimizadas para a síntese de diversas moléculas (Wagner & Alper, 2016). Técnicas mais recentes, como a edição de genoma utilizando CRISPR/Cas9, ampliaram ainda mais a engenharia desses microrganismos, proporcionando modificações mais precisas e direcionadas (Jinek et al., 2012; Raschmanová et al., 2018).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, além de sua histórica aplicação na indústria de bebidas, alimentos e biocombustíveis, já é empregada também na produção de biofármacos comerciais, que incluem hormônios recombinantes, vacinas e anticorpos (Kulagina et al., 2021). Além disso, pesquisas utilizando *S. cerevisiae* recombinantes também exploram a produção de compostos naturais com atividade bioativa; metabólitos, estes, encontrados em plantas, bactérias, fungos e outras leveduras (Figura 2). Muitas vezes, os organismos que originalmente sintetizam os compostos bioativos de interesse o fazem com baixo rendimento ou são difíceis de ser empregados na síntese de nível industrial; é aí que entram as “fábricas microbianas”, com microrganismos, como *S. cerevisiae*, que podem ser manipulados geneticamente para produzir o composto alvo e que suportam ambientes industriais (Madhavan et al., 2021). Nesse sentido, *S. cerevisiae* já foi utilizada como hospedeiro heterólogo para aumentar a bioprodução de alcalóides, terpenóides e fenilpropanóides naturais de plantas, como o opioide tebaína (Galanie et al., 2015), o triterpeno ginsenosídeo Rh2 (Zhuang et al.,

2017) e o flavonóide escutelarina (Liu et al., 2018).

A engenharia genética de leveduras para permitir e/ou aumentar a produção compostos bioativos não está limitada à *S. cerevisiae*. Outras leveduras, como *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica*, vêm ganhando destaque por apresentarem uma capacidade biossintética alta, conhecimento genético disponível, e ainda serem capazes de consumir fontes de carbono de baixo custo, como hidrolisados lignocelulósicos (Patra et al., 2021; Rebello et al., 2018). Além disso, leveduras naturalmente produtoras de bioativos também têm sido objeto de pesquisas envolvendo a engenharia genética, como algumas espécies do gênero *Rhodotorula*, que podem acumular carotenóides (Lee et al., 2016; Pi et al., 2018). *Rhodotorula glutinis*, por exemplo, foi modificada geneticamente por Pi e colaboradores (2018) para aumentar a produção de  $\beta$ -caroteno, e, simultaneamente, produzir celulases heterólogas, visando a aplicação da levedura em hidrolisados lignocelulósicos no contexto das biorrefinarias.

**Figura 2** – Estratégias de engenharia genética para permitir e/ou aumentar a produção de metabólitos bioativos utilizando leveduras.



Em suma, conforme ilustrado na Figura 2, as atuais ferramentas de engenharia genética oferecem uma valiosa contribuição para a produção de metabólitos bioativos em leveduras. Isso pode ser alcançado de duas maneiras principais: possibilitando a produção de compostos de outros organismos (como plantas, fungos, bactérias e outras leveduras) por meio de expressão heteróloga e utilização de leveduras como biofábricas; ou, ainda, permitindo a otimização das vias metabólicas intrínsecas em leveduras que já são capazes de produzir os compostos de interesse.

## TESTES DE CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO

A bioprospecção de metabólitos secundários com potencial terapêutico requer uma triagem inicial que inclui a avaliação da citotoxicidade, essencial para identificar moléculas bioativas (Kulagina et al., 2021; Rahmat & Kang, 2020; Upreti et al., 2022). Esse processo permite identificar compostos que podem afetar negativamente a viabilidade e a integridade celular, fornecendo informações fundamentais sobre a segurança e a eficácia de candidatos a novos produtos farmacêuticos (Madorran et al., 2022; Tabana et al., 2023). Para esse tipo de avaliação, são utilizados os testes de citotoxicidade, os quais são procedimentos laboratoriais delineados para determinar a capacidade de uma substância em afetar a sobrevivência e/ou a função celular (Garcia-Hernando et al., 2020; Li et al., 2015). Esses ensaios são conduzidos em diversas linhagens celulares e podem envolver uma variedade de parâmetros, como viabilidade, proliferação, apoptose e genotoxicidade (Banfalvi, 2017; Luan & Honma, 2022; Madorran et al., 2022).

De maneira geral, os testes citotóxicológicos podem ser classificados em dois principais tipos: *in vitro* e *in vivo* (Greco et al., 2020; Hirsch & Schildknecht, 2019). Os testes *in vitro* são conduzidos em culturas de células isoladas, permitindo uma análise controlada e detalhada dos efeitos da substância em teste (Chapman et al., 2021; Kitaeva et al., 2020). Entre as técnicas metodológicas utilizadas estão ensaios de sal de tetrazolium (MTT), sulforrodamina B (SRB), exclusão do corante azul tripan e a avaliação da atividade enzimática lactato desidrogenase (LDH) (Coyle et al., 2023; Mani & Swargiary, 2023; Mosmann, 1983; Skehan et al., 1990; Smith et al., 2011; Vajrabhaya & Korsuwannawong, 2018; Van den Bossche et al., 2020). Os resultados obtidos nos testes *in vitro* são valiosos para a triagem inicial dos compostos com potenciais terapêuticos, assim como para a compreensão dos mecanismos subjacentes à toxicidade celular (Kitaeva et al., 2020; Pan et al., 2020). Já os testes *in vivo* envolvem a avaliação da citotoxicidade sistêmica, a toxicocinética e a toxicodinâmica de substâncias em um ambiente mais complexo, o que implica a administração da substância em organismos vivos, ou seja, modelos animais de laboratório, como ratos e camundongos (Ahmed et al., 2023; Greco et al., 2020).

Posteriormente aos testes iniciais, já na etapa pré-clínica, as substâncias promissoras passam por avaliações terapêuticas detalhadas, incluindo a análise da farmacocinética, farmacodinâmica, eficácia pré-clínica e toxicologia (Hirsch & Schildknecht, 2019; Salehi et al., 2019). Esses testes visam determinar a segurança, eficácia e potencial toxicidade das substâncias, bem como seus efeitos a longo prazo (Crandon & Nicolau, 2012; Huang et al., 2019; Shahid et al., 2020; Tanner et al., 2019; Tubau-Juni et al., 2018).

A integração dos testes de citotoxicidade e a avaliação do potencial terapêutico desempenham um papel essencial na aplicação dos metabólitos para o avanço das novas terapias; esses procedimentos fornecem informações experienciais para garantir a segurança e eficácia de novos compostos, contribuindo para orientar as decisões na pesquisa farmacêutica e biomédica (Espíndola et al., 2022; Garcia-Hernando et al., 2020). À medida que ocorre a

progressão no desenvolvimento de terapias mais avançadas e personalizadas, a aplicação dessas técnicas continua sendo fundamental para impulsionar a inovação nas áreas das ciências da saúde.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa e a aplicação de metabólitos produzidos por leveduras têm grande potencial na biotecnologia, com muitos destes compostos apresentando atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. Nesse contexto, estudos que visam aprimorar a produção e a extração desses metabólitos a partir de leveduras estão impulsionando sua aplicabilidade. Ainda neste campo, a engenharia genética vem permitindo a produção de metabólitos específicos por meio das biofábricas microbianas, auxiliando no ajuste das vias metabólicas e da produtividade. No entanto, é crucial a realização de testes de citotoxicidade e a avaliação terapêutica, para garantir a segurança e eficácia clínica desses metabólitos. Em suma, a bioprospecção de metabólitos produzidos por leveduras desempenha um papel fundamental na descoberta de novos compostos com atividade biológica, o que pode ampliar a gama de produtos terapêuticos, incluindo, por exemplo, compostos para o tratamento de doenças complexas como o câncer.

## REFERÊNCIAS

Abreu, J. A. S., Rovida, A. F. S., & Pamphile, J. A. (2015). Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista Uningá Review*, 2(1), 5559.

Ahmed, W., El-Gogary, R. I., Nasr, M., & Sammour, O. A. (2023). Development and in Vitro/In Vivo Evaluation of Itopride Hydrochloride Expanding Tablets. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. <https://doi.org/10.1007/s12247-023-09729-2>

Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., & Tamura, G. (1972). Production of Extracellular L-Asparaginases by Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(3), 356–361. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860270>

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>

Banfalvi, G. (2017). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), 306–323. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-13333>

Burton, G. W., Mogg, T. J., Riley, W. W., & Nickerson, J. G. (2021).  $\alpha$ -Carotene oxidation products - Function and safety. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112207. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112207>

Cardillo, A. B., Rodriguez Talou, J., & Giulietti, A. M. (2009). Recombinant yeast as an alternative biocatalysis system for tropane alkaloids production. *New Biotechnology*, 25,

S132. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06443>

Chapman, K. E., Wilde, E. C., Chapman, F. M., Verma, J. R., Shah, U.-K., Stannard, L. M., Seager, A. L., Tonkin, J. A., Brown, M. R., Doherty, A. T., Johnson, G. E., Doak, S. H., & Jenkins, G. J. S. (2021). Multiple-endpoint in vitro carcinogenicity test in human cell line TK6 distinguishes carcinogens from non-carcinogens and highlights mechanisms of action. *Archives of Toxicology*, 95(1), 321–336. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-029023>

Coyle, J. P., Johnson, C., Jensen, J., Farcas, M., Derk, R., Stueckle, T. A., Kornberg, T. G., Rojanasakul, Y., & Rojanasakul, L. W. (2023). Variation in pentose phosphate pathway-associated metabolism dictates cytotoxicity outcomes determined by tetrazolium reduction assays. *Scientific Reports*, 13(1), 8220. <https://doi.org/10.1038/s41598-023353105>

Crandon, J. L., & Nicolau, D. P. (2012). In Vivo Pharmacodynamic Modeling for Drug Discovery. In *Antibiotic Discovery and Development* (pp. 1035–1054). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_34)

de Souza, L. M. D., Ogaki, M. B., Teixeira, E. A. A., de Menezes, G. C. A., Convey, P., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2023). Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1923–1933. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00834-x>

Dimitrova, S., Pavlova, K., Lukanov, L., & Zagorchev, P. (2010). Synthesis of Coenzyme Q10 and  $\beta$ -carotene by Yeasts Isolated from Antarctic Soil and Lichen in Response to Ultraviolet and Visible Radiations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8845-z>

El-Nagga, N. E.-A., El-Ewasy, S. M., & El-Shweihy, N. M. (2014). Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. *International Journal of Pharmacology*, 10(4), 182–199. <https://doi.org/10.3923/ijp.2014.182.199>

Espíndola, M. R., Varotti, F. de P., Aguiar, A. C. C., Andrade, S. N., & Rocha, E. M. M. da. (2022). In vitro assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e18308>

Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., & Smolke, C. D. (2015). Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 349(6252), 1095–1100. <https://doi.org/10.1126/science.aac9373>

Garcia-Hernando, M., Benito-Lopez, F., & Basabe-Desmonts, L. (2020). Advances in Microtechnology for Improved Cytotoxicity Assessment. *Frontiers in Materials*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.582030>

Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>

Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., Swaminathan, S., Khanna, N., Tisminetzky, S., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique

to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-931>

Hamidi, M., Gholipour, A. R., Delattre, C., Seddighi, F., Mirzaei Seveiri, R., Pasdaran, A., Kheirandish, S., Pierre, G., Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P., & Karimitabar, F. (2020). Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.206>

He, D., Wang, Z., Yang, L., Liu, T., Yao, Y., & Mao, Z. (2016). Modeling and Optimization of the Drug Extraction Production Process. *Scientific Programming*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/3279423>

Hirsch, C., & Schildknecht, S. (2019). In Vitro Research Reproducibility: Keeping Up High Standards. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01484>

Huang, W., Percie du Sert, N., Vollert, J., & Rice, A. S. C. (2019). General Principles of Preclinical Study Design. In *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine* (pp. 55–69). [https://doi.org/10.1007/164\\_2019\\_277](https://doi.org/10.1007/164_2019_277)

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Johra, F. T., Bepari, A. K., Bristy, A. T., & Reza, H. M. (2020). A Mechanistic Review of  $\beta$ -Carotene, Lutein, and Zeaxanthin in Eye Health and Disease. *Antioxidants*, 9(11), 1046. <https://doi.org/10.3390/antiox9111046>

Killander, D.; Dohlwitz, A.; Engstedt, L.; Franzén, S.; Gahrton, G., & Gullbring, B. (1976). Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer*, 37:220-8. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197601\)37:1%3C220::AID-CNCR2820370132%3E3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197601)37:1%3C220::AID-CNCR2820370132%3E3.0.CO;2-W)

Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00322>

Kiyama, R. (2017). Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. *European Journal of Pharmacology*, 815, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.049>

Knight, K. L. (2010). Study/Experimental/Research Design: Much More Than Statistics. *Journal of Athletic Training*, 45(1), 98–100. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-45.1.98>

Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>

Kulagina, N., Besseau, S., Godon, C., Goldman, G. H., Papon, N., & Courdavault, V. (2021). Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. *Frontiers in Fungal Biology*, 2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.733492>

Lebozec, K., Jandrot-Perrus, M., Avenard, G., Favre-Bulle, O., & Billiald, P. (2018). Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: A case study prior to pharmaceutical development. *New Biotechnology*, 44, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.04.006>

Lee, J. J. L., Chen, L., Cao, B., & Chen, W. N. (2016). Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 869–877. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-71023>

Li, J., Li, H., Liu, H., & Luo, Y. (2023). Recent Advances in the Biosynthesis of Natural Sugar Substitutes in Yeast. *Journal of Fungi*, 9(9), 907. <https://doi.org/10.3390/jof9090907>

Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3(5), 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015481>

Li, Z., Li, C., Cheng, P., & Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>

Liang, Z., Zhi, H., Fang, Z., & Zhang, P. (2021). Genetic engineering of yeast, filamentous fungi and bacteria for terpene production and applications in food industry. *Food Research International*, 147, 110487. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110487>

Libkind, D., Sommaruga, R., Zagarese, H., & van Broock, M. (2005). Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.005>

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>

Liu, X., Cheng, J., Zhang, G., Ding, W., Duan, L., Yang, J., Kui, L., Cheng, X., Ruan, J., Fan, W., Chen, J., Long, G., Zhao, Y., Cai, J., Wang, W., Ma, Y., Dong, Y., Yang, S., & Jiang, H. (2018). Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nature Communications*, 9(1), 448. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02883-z>

Luan, Y., & Honma, M. (2022). Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability & Disease*, 3(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s42764-021-00058-7>

Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Krishnamoorthy, J., Reshmy, R., Sirohi, R., Pugazhendi, A., Awasthi, M. K., Szakacs, G., & Binod, P. (2021). Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>

Madorran, E., Stožer, A., Arsov, Z., Maver, U., & Rožanc, J. (2022). A Promising Method for the Determination of Cell Viability: The Membrane Potential Cell Viability Assay. *Cells*,

11(15), 2314. <https://doi.org/10.3390/cells11152314>

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Mani, S., & Swargiary, G. (2023). In Vitro Cytotoxicity Analysis: MTT/XTT, Trypan Blue Exclusion. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 267–284). [https://doi.org/10.1007/9783-031-19485-6\\_18](https://doi.org/10.1007/9783-031-19485-6_18)

Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>

Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.011>

Martín-Gómez, J., García-Martínez, T., Varo, M. Á., Mérida, J., & Serratos, M. P. (2021). Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts. *LWT*, 146, 111661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111661>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588–611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>

Pan, E., Bogumil, D., Cortessis, V., Yu, S., & Nieva, J. (2020). A Systematic Review of the Efficacy of Preclinical Models of Lung Cancer Drugs. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00591>

Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A.S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Patra, P., Das, M., Kundu, P., & Ghosh, A. (2021). Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances*, 47, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>

Pi, H.-W., Anandharaj, M., Kao, Y.-Y., Lin, Y.-J., Chang, J.-J., & Li, W.-H. (2018). Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous  $\alpha$ -carotene and cellulase production. *Scientific Reports*, 8(1), 10850. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29194-z>

Rahmat, E., & Kang, Y. (2020). Yeast metabolic engineering for the production of pharmaceutically important secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4659–4674. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10587-y>

Rani, A., Saini, K., Bast, F., Mehariya, S., Bhatia, S., Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2021). *Microorganisms*: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules*, 26(4), 1142. <https://doi.org/10.3390/molecules26041142>

Raschmanová, H., Weninger, A., Glieder, A., Kovar, K., & Vogl, T. (2018). Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnology Advances*, 36(3), 641–665. <https://doi.org/10.1016/j>

biotechadv.2018.01.006

Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Babu, A. K., Aneesh, E. M., & Pandey, A. (2018). Non-conventional Yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny222>

Rivera Flores, V. K., Fan, X., DeMarsh, T. A., deRiancho, D. L., & Alcaine, S. D. (2023). Leveraging Milk Permeate Fermentation to Produce Lactose-Free, Low-In-Glucose, Galactose-Rich Bioproducts: Optimizations and Applications. *Fermentation*, 9(9), 825. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090825>

Rusinova-Videva, S., Kambourova, M., Alipieva, K., Nachkova, S., & Simova, S. (2019). Metabolic profiling of Antarctic yeasts by proton nuclear magnetic resonance-based spectroscopy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 12–19. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1490201>

Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M. (2016). From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(4), 218–224. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140>

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W., & Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>

Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>

Shahid, M., Nadeem, M., & Bakhat, H. F. (2020). Environmental toxicology and associated human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(32), 39671–39675. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10516-6>

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

Smith, S. M., Wunder, M. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2011). A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time. *PLoS ONE*, 6(11), e26908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026908>

Soler, M. F. de C. R. (2016). Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.97.2016.tde-25022016-093904>

Tabana, Y., Babu, D., Fahlman, R., Siraki, A. G., & Barakat, K. (2023). Target identification of small molecules: an overview of the current applications in drug discovery. *BMC Biotechnology*, 23(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00815-4>

Tadioto, V., Deoti, J. R., Müller, C., de Souza, B. R., Fogolari, O., Purificação, M., Giehl, A., Deoti, L., Lucaroni, A. C., Matsushika, A., Treichel, H., Stambuk, B. U., & Alves Junior, S. L. (2022). Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(8),

1133–1145. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02812-x>

Tadioto, V., Giehl, A., Cadamuro, R. D., Guterres, I. Z., dos Santos, A. A., Bressan, S. K., Werlang, L., Stambuk, B. U., Fongaro, G., Silva, I. T., & Alves, S. L. (2023). Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. *Fermentation*, 9(4), 363. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040363>

Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>

Tanner, L., Haynes, R. K., & Wiesner, L. (2019). An in vitro ADME and in vivo Pharmacokinetic Study of Novel TB-Active Decoquinone Derivatives. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00120>

Tubau-Juni, N., Hontecillas, R., Ehrich, M., Leber, A., Zoccoli-Rodríguez, V., & Bassaganya-Riera, J. (2018). Preclinical Studies: Efficacy and Safety. In *Accelerated Path to Cures* (pp. 25–40). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/9783319-73238-1\\_3](https://doi.org/10.1007/9783319-73238-1_3)

Upreti, S., Pandey, S. C., Bisht, I., & Samant, M. (2022). Evaluation of the target-specific therapeutic potential of herbal compounds for the treatment of cancer. *Molecular Diversity*, 26(3), 1823–1835. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10271-x>

Vajrabhaya, L., & Korsuwannawong, S. (2018). Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0146-0>

Van den Bossche, S., Vandeplassche, E., Ostyn, L., Coenye, T., & Crabbé, A. (2020). Bacterial Interference With Lactate Dehydrogenase Assay Leads to an Underestimation of Cytotoxicity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00494>

Vaz, A. B. M., Rosa, L. H., Vieira, M. L. A., Garcia, V. de, Brandão, L. R., Teixeira, L. C. R. S., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., & Rosa, C. A. (2011). The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 937–947. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>

Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Quental, M. V., Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2017). Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chemical Reviews*, 117(10), 6984–7052. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00550>

Vieira, E. F., Carvalho, J., Pinto, E., Cunha, S., Almeida, A. A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.006>

Wagner, J. M., & Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>

Walker, G. M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other

yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>

Worland, A. M., Czajka, J. J., Li, Y., Wang, Y., Tang, Y. J., & Su, W. W. (2020). Biosynthesis of terpene compounds using the non-model yeast *Yarrowia lipolytica*: grand challenges and a few perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.020>

Zhuang, Y., Yang, G.Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Deng, Z., & Feng, Y. (2017). Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme. *Metabolic Engineering*, 42, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jymben.2017.04.009>

Zucconi, L., Canini, F., Temporiti, M. E., & Tosi, S. (2020). Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 6459. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186459>

## Bioprospecção de bacteriófagos e suas interações no controle microbiano e nas resistências bacterianas

DOI: 10.56041/9786599841859-6

**PILATI, Giulia V. T.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0001-9689-0279>

**SOUSA, Amanda. K. F.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0003-27183129>

**CADAMURO, Rafael. D.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

**ELOIS, Mariana A.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

**SAVI, Beatriz P.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0002-7948-6212>

**PAVI, Catielen P.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0003-2986-6900>

**JEMPIERRE, Yasmin F. S. H.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-00025805-9510>

**SOUZA, Estêvão B.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0002-9278-4003>

**DALLEPIANE, Felipe G.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Implantodontia, CCS/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0001-9677-9984>

**TELL, Theo D.**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0001-9768-7512>

**PESSI, Leonardo**

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-0002-4253-7792>

**FONGARO, Gislaine\***

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, CCB/UFSC  
<https://orcid.org/0000-000155963320>

## RESUMO

Os bacteriófagos, entidades replicativas dependentes de bactérias, realizam seu ciclo replicativo dentro dessas células hospedeiras. Desde sua descoberta, a utilização dos bacteriófagos foi inicialmente incentivada, porém, posteriormente, desestimulado, sobretudo devido à predominância do uso e comércio de biocontroladores químicos. Nos últimos anos, novas pesquisas têm demonstrado as aplicações biotecnológicas promissoras dos bacteriófagos, particularmente em relação ao biocontrole de bactérias patogênicas. A capacidade lítica de certos bacteriófagos, revela um potencial no biocontrole de bactérias patogênicas em diferentes matrizes. Por outro lado, a transferência horizontal de genes de resistência entre diferentes grupos bacterianos, mediada por bacteriófagos com capacidade lisogênica, enfatiza a necessidade da compreensão acerca dos fagos envolvidos e dos genes de resistência predominantes em diversas matrizes ambientais. A resistência bacteriana, quando não controlada adequadamente, pode ter repercussões significativas no âmbito de saúde única, afetando a saúde animal e humana e potencialmente circulando e contaminando o ambiente. Este capítulo oferece uma análise aprofundada desses tópicos, destacando a importância crítica da pesquisa e aplicação responsável dos bacteriófagos na busca por soluções biotecnológicas.

**Palavras-chave:** Ferramentas biotecnológicas. Biocontrole bacteriano. Genes de resistência a antimicrobianos. Transferência horizontal de genes.

## INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias, sendo os organismos mais abundantes do mundo, com aproximadamente  $10^{31}$  partículas existentes. Apesar de sua descoberta em 1917 por Félix d'Herelle, os bacteriófagos têm grande potencial em diversas aplicações, como terapia fágica, quebra de biofilmes, transporte de genes, desenvolvimento de vacinas, biocontrole alimentar e tratamento ambiental (Hussain et al., 2023; Strathdee et al., 2023).

A biotecnologia em constante evolução traz inovações promissoras, com os bacteriófagos se destacando como ferramentas versáteis na promoção da saúde única, sendo um campo de amplo interesse para pesquisa e desenvolvimento (Rogovski et al., 2021; Schenberg, 2010).

Assim, os bacteriófagos podem ser utilizados para o biocontrole de bactérias patogênicas em infecções nosocomiais, podendo ser utilizado em diversas vias e superfícies bióticas ou abióticas, sendo de extrema importância em situações que as terapias convencionais possuem pouca eficácia. Além do desenvolvimento de métodos de diagnóstico bacteriano, já que possuem especificidade e sensibilidade na detecção de bactérias patogênicas, agilizando o diagnósticos e tratamentos eficazes (D'Accolti et al., 2021; Poluri et al., 2021).

Os bacteriófagos têm potencial na produção de antígenos e vacinas, na biorremediação ambiental para melhorar a qualidade da água e do solo, e na regulação de microbiomas humanos e ambientais. Seu extenso potencial destaca a importância de estudos, abordagens e regulamentações para otimizar sua utilização biotecnológica (Guerin & Hill, 2020).

Além disso, os bacteriófagos são relevantes na produção de antígenos e vacinas mais específicas, na biorremediação para melhorar a qualidade da água e do solo, e na regulação dos microbiomas humanos e ambientais. Seu potencial terapêutico se destaca na luta contra patógenos resistentes a antibióticos, oferecendo alternativas eficazes de tratamento (Gordillo Altamirano et al., 2022; Oduor et al., 2020).

Outra aplicação promissora envolve o uso de fagos-display, que permite a identificação de fármacos peptídicos eficientes, com afinidade e especificidade para alvos específicos, sendo úteis no diagnóstico de tumores e doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (Saw & Song, 2019; Zhang et al., 2022).

Os bacteriófagos possuem a capacidade de serem facilmente conjugados ou geneticamente modificados (Peltomaa et al., 2016). A padronização do cultivo e purificação de bacteriófagos em laboratórios envolvidos na produção de bacteriófagos para a terapia fágica de acesso expandido pode desempenhar um papel fundamental na reintrodução da terapia fágica na medicina ocidental (Luong et al., 2020). No entanto, o uso de bacteriófagos no controle de doenças demanda um conhecimento minucioso de sua composição genética, devido à necessidade de compreender a estrutura genômica dos bacteriófagos, o que é essencial para garantir sua eficácia terapêutica e evitar potenciais efeitos adversos (Castillo & Middelboe, 2016).

Bactérias resistentes encontradas em reservatórios humanos, animais e ambientes têm o potencial de se espalhar local e globalmente. O resistoma, que representa a coleção de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) em um ambiente específico, desempenha um papel crucial na disseminação da resistência. Muitos estudos se concentraram em patógenos altamente resistentes a medicamentos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e outros, que foram identificados em diferentes reservatórios microbianos. A disseminação da resistência pode ocorrer de várias maneiras, incluindo a transmissão de ARGs em diferentes matrizes. Animais de produção também desempenham um papel na disseminação de ARGs, principalmente devido ao uso de antibióticos na agricultura. Ambientes poluídos, como aqueles contaminados com metais pesados, também contribuem para a resistência antimicrobiana. A interação entre diferentes ambientes, como hospitais e estações de tratamento de águas residuais, é crucial na disseminação de ARGs. Portanto, a compreensão dessas dinâmicas é essencial na gestão da resistência antimicrobiana, considerando a abordagem de Saúde Única, com os bacteriófagos desempenhando um papel fundamental na distribuição de genes de resistência entre diferentes grupos bacterianos e ambientes, afetando potencialmente a saúde humana e animal (Despotovic et al., 2023; Ngoi et al., 2021).

Este capítulo consiste em uma revisão abrangente da literatura, abordando o papel da bioprospecção de bacteriófagos, explorando suas interações no contexto do controle efetivo de microrganismos e no desenvolvimento da resistência bacteriana.

## ATIVIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTERIÓFAGOS EM BIOCONTROLE

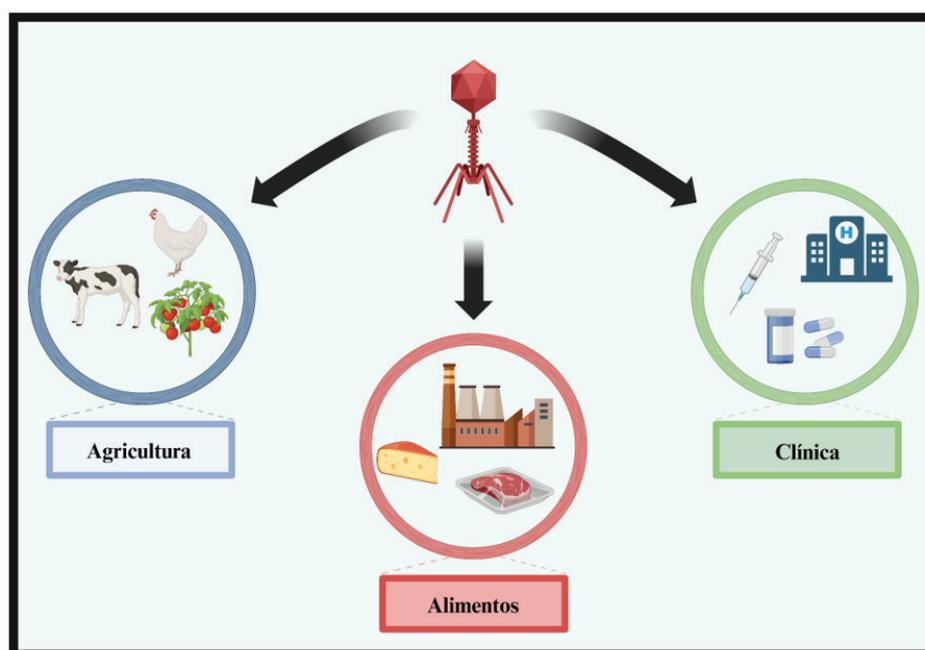
Os bacteriófagos têm grande potencial biotecnológico, em grande parte devido à sua notável especificidade na infecção de patógenos bacterianos. Características adicionais como coevolução com os hospedeiros, onde esses ajudam a preservar linhagens bacterianas, enquanto fagos resistentes ameaçam essas novas cepas bacterianas evidenciam esse potencial (Labrie et al., 2010). Os fagos também possuem enzimas capazes de remover componentes importantes e fatores de virulência das paredes celulares bacterianas (Klumpp et al., 2023).

O potencial biotecnológico dos fagos é observado a partir destas características do seu mecanismo de ação frente às bactérias hospedeiras. Neste sentido, a adsorção à bactéria é um dos eventos mais bem estudados, já que existem proteínas específicas originadas da cauda dos fagos que se ligam aos receptores presentes nas células bacterianas, denominadas *Receptor Binding Proteins* (RBPs), identificadas como fibras da cauda (TFs) ou espículas da cauda (TSPs) (Klumpp et al., 2023).

Inicialmente, a adsorção do fago ocorre através da ligação da RBP ao receptor bacteriano por um processo reversível. Como exemplo, o fago Enterobacteria T4 utiliza sua proteína de fibra da cauda denominada gp37, a qual tem sua conformação modificada para se ligar aos receptores da superfície bacteriana de *Escherichia coli*. Na segunda etapa, a ligação passa a ser irreversível, onde para o fago T4, a proteína gp12 liga-se aos lipopolissacarídeos da parede celular de *E. coli* e a contração da cauda injeta o material genético viral (Elois et al., 2023).

A aplicação dos fagos demonstra potencial em uma variedade de áreas, destacando-se os setores alimentar, agrícola e clínico, conforme será detalhadamente explorado nas seções subsequentes e ilustrado na Figura 1.

**Figura 1** - Potenciais aplicações de bacteriófagos em biocontrole, nos setores de indústria agrícola, alimentícia e na clínica humana e veterinária.



A atividade antibacteriana inerente aos bacteriófagos é aplicada no controle da contaminação bacteriana em cultivos alimentares, superfícies (fômites), plantas, água e em diversas outras áreas (Bai et al., 2016; Jensen et al., 2015; Jones et al., 2007; Jun et al., 2016). Devido à crescente preocupação com a segurança alimentar e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, os bacteriófagos estão se tornando cada vez mais uma opção viável na preservação de alimentos (Kumar et al., 2020).

Com base nisso, diversos produtos baseados em bacteriófagos têm recebido aprovação na indústria de alimentos. Entre esses produtos estão o ListShield (Intralytix, Inc., Baltimore, MD, EUA), EcoShield (Intralytix), Listex P100 (Microcos Food Safety, Wageningen, Países Baixos) e SalmoFresh (Intralytix). Estes, consistem em coquetéis de bacteriófagos ou bacteriófagos de espécies individuais que visam bactérias específicas, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.*, respectivamente (Sharma, 2013). Tais produtos à base de fagos são destinados à aplicação direta em alimentos, em especial queijos e carnes, devido aos riscos mínimos à saúde humana associados ao produto e efetividade como controladores de infecção bacteriana nos produtos (Sharma, 2013).

O reconhecimento da eficácia do uso de bacteriófagos como biocontroladores reabriu a possibilidade de aplicação em outros setores da indústria, como a agricultura. Assim, já são encontrados produtos disponíveis comercialmente, como formulações da Agriphage para infecções de *Xanthomonas campestris* em tomates, CUSTUS®YRS para o controle de *Yersinia ruckeri* na aquicultura, Biolyse®-PB para *Pectobacterium sp.* em batatas e Staphage Lysate (SPL)® para infecções de *Staphylococcus aureus* em cães (Liu et al., 2022; Obradovic et al., 2005; Solomon et al., 2016; Wagemans et al., 2022). No entanto, a disponibilidade e aprovação desses produtos variam conforme as regulamentações de cada país, o que significa que seu uso como agentes de biocontrole reconhecidos pode não necessariamente resultar em aprovação para comercialização em todas as nações.

Além do uso de bacteriófagos íntegros, o uso de endolisinas provenientes dos mesmos pode ser aplicado no controle de espécies bacterianas inibindo o crescimento bacteriano, têm apresentado resultados promissores na preservação de (García et al., 2010; H. Zhang et al., 2012). O uso de endolisinas possui vantagens em relação ao uso de bacteriófagos íntegros, como a dificuldade da regulação de produtos à base de vírus, potencial transferência de genes de resistência bacteriana, incertezas da atuação do sistema imune no produto e potencial adaptação bacteriana ao produto (Murray et al., 2021). Além disso, bactérias possuem maior dificuldade de adquirir resistência à endolisinas, já que estas atuam em alvos conservados do envoltório bacteriano (Fischetti, 2010). As endolisinas, têm capacidade de hidrolizar a parede bacteriana, facilitando a exposição do vírus no interior bacteriano, assim como holinas (*holin protein*), enzimas que realizam a formação de poros na membrana (Drulis-Kawa et al., 2012; Fan et al., 2013).

Porém, endolisinas possuem desvantagens em relação à característica proteica desses compostos, como baixa estabilidade à proteases e sensibilidade a alterações de pH (Murray et al., 2021). Apesar de contrapontos da farmacocinética, produtos a base de endolisinas já são

aprovados e comercializados para o biocontrole de infecções bacterianas, como Staphekt™ (Microes), produto a base de gel ou pomada contendo endolisinas de fagos contra infecções de *Staphylococcus aureus* (Totté et al., 2017).

O uso de bacteriófagos como agentes terapêuticos para tratar infecções bacterianas iniciou imediatamente após a descoberta dos fagos em 1915 por Twork e 1917 por d'Herelle e ganhou destaque nas primeiras décadas do século XX, mas gradualmente perdeu visibilidade com o advento dos antibióticos, especialmente a penicilina, até meados dos anos 40 (Egido et al., 2022). Por muitas décadas, a crença predominante era que os antibióticos eram preferíveis devido à sua capacidade de ação de amplo espectro, uma perspectiva que recebeu o respaldo das indústrias farmacêuticas, visto que criar um único produto eficaz contra múltiplos patógenos infecciosos era considerado vantajoso (Murray et al., 2021).

Porém, atualmente, com o crescente desafio da resistência bacteriana a antibióticos devido a mutações adquiridas por meio da transferência de genes, como a transdução e conjugação, e o papel de elementos genéticos móveis, o uso de bacteriófagos no tratamento de infecções ganhou destaque novamente (Aranaga et al., 2022).

Atualmente, um grupo de bactérias multirresistentes têm sido popularmente designado como ESKAPE e engloba os microrganismos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Dessa forma, o uso de bacteriófagos poderia fornecer um efeito sinérgico aos tratamentos com antibióticos existentes para combater infecções desses patógenos (Moelling et al., 2018).

Bacteriófagos têm sido usados no tratamento de infecções, incluindo aquelas causadas por patógenos resistentes como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, os resultados variam em ensaios clínicos, e existem desafios, como a potencial liberação de toxinas bacterianas após a lise do patógeno e a falta de conhecimento sobre a diversidade dos bacteriófagos, sua segurança e critérios de seleção adequados (Elois et al., 2023).

Com base na crescente utilização dos bacteriófagos para biocontrole nas áreas anteriormente apresentadas no capítulo, surge a necessidade do desenvolvimento de legislações para controle e qualidade dos bioprodutos. Geralmente, as regulamentações variam conforme o país e a finalidade do produto, sendo majoritariamente relacionadas à segurança alimentar e à proteção da saúde humana (Q. Yang et al., 2023).

Em casos de bioprodutos relacionados a área alimentar, as agências regulatórias, como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos ou a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) na União Europeia, realizam esse tipo de regulamentação (Sharma, 2013). A terapia fágica foi regulamentada como medicamento pela Agência Europeia de Medicamentos em 2011, em países como Reino Unido, França e Bélgica; enquanto no caso da China, por exemplo, ocorre um processo de formação da regulamentação com base em tratamentos com regulamentações semelhantes, como aqueles relacionados a vacinas com vetores virais (Q. Yang et al., 2023).

Dessa forma, com base na crescente utilização dos fagos, incluindo a terapia fágica frente infecções por bactérias multirresistentes, o desenvolvimento de regulamentações

prezando a bioética é imprescindível para manter a segurança, equidade, transparência e proteção do meio ambiente, dos seres humanos e outros animais (Broncano-Lavado et al., 2021).

## **RESISTÊNCIA BACTERIANA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL CARREADA POR FAGOS NO ÂMBITO DE SAÚDE ÚNICA**

Estima-se que cerca de 75% das doenças infecciosas humanas que emergiram ou re-emergiram nas últimas décadas são zoonóticas, ou seja, tiveram sua origem nos animais (McEwen & Collignon, 2018). O compartilhamento de doenças infecciosas entre humanos, animais e o ambiente impulsionou a colaboração na busca da saúde ideal para todos (Collignon, 2012). Baseado no conceito que a saúde humana é também a saúde animal e ambiental, a Saúde Única apresenta-se como uma abordagem interdisciplinar que reconhece a interconexão entre essas áreas e busca promover a prevenção e o controle de doença (McEwen & Collignon, 2018; Zinsstag et al., 2012).

Doenças zoonóticas podem ser causadas por vários agentes, incluindo vírus, bactérias, parasitas e fungos. Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas podem ser zoonóticas (Rahman et al., 2020). O uso de antibióticos tem sido uma estratégia fundamental ao longo das décadas para o tratamento e controle de infecções bacterianas (Kittler et al., 2017).

A descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, no início do século XX foi por muito tempo pensada como a solução para o combate às doenças bacterianas na sociedade (Fleming, 1980). A descoberta do DNA como código genético teve um impacto significativo na comunidade científica. As variações genéticas nas populações, resultado de mutações, permitem que certos indivíduos ou cepas sobrevivam às mudanças ambientais. A introdução de antibióticos nas populações bacterianas aumenta a frequência de genes de resistência e a aptidão biológica (Kaplan, 2014).

Bactérias podem adquirir material genético por transferência horizontal, gerando novas variantes. Isso ocorre por transformação, conjugação ou transdução, na qual um bacteriófago transfere DNA não viral entre células hospedeiras bacterianas (Borodovich et al., 2022; von Wintersdorff et al., 2016).

Os bacteriófagos desempenham um papel importante na evolução e patogênese bacteriana, transferindo material genético entre diferentes cepas ou espécies bacterianas, por meio da transferência de material genético entre distintas cepas ou espécies bacterianas (Brüssow et al., 2004; Canchaya et al., 2003). Após a infecção de um hospedeiro, os bacteriófagos temperados apresentam a capacidade de integrar-se ao cromossomo do hospedeiro, permanecendo na forma de profagos até que sejam reativados sob condições específicas. Profagos que abrigam genes responsáveis pela codificação de toxinas e outros fatores de virulência têm a capacidade de induzir a chamada conversão lisogênica, que se configura como o meio mais evidente de contribuição para a patogênese bacteriana (Meng et al., 2022; Penadés et al., 2015)

A resistência antimicrobiana é um importante problema de saúde e o seu surgimento

e propagação são o resultado de uma interação complexa de múltiplos fatores interligados. Nesse contexto, diversos estudos foram conduzidos com o intuito de analisar o genoma de fagos isolados a partir de distintas matrizes (Quadro 1). Tais pesquisas evidenciaram que o papel dos bacteriófagos na disseminação de genes de resistência.

**Quadro 1** - Genes de resistência a antimicrobianos veiculados por fagos em diferentes espécies bacterianas e matrizes.

Genes de resistência	Bactérias hospedeiras	Matriz	Referência
Genes de resistência à betalactâmicos ( <i>blaTEM</i> , <i>blaCTX-M9</i> )	<i>Escherichia coli</i>	Esgoto urbano e amostras de rio	(Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2011)
<i>mecA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Genes de resistência à betalactâmicos ( <i>blaTEM</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-1</i> , <i>blaCTX-M3</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaCTX-M-14</i> )	<i>Escherichia coli</i>	Amostras fecais coletadas de aves	(Al-Mustapha et al., 2023)
Genes de resistência à aminoglicosídeos ( <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> )	N/A	Amostras fecais de granjas de frangos de corte e galinhas poedeiras	(Y. Yang et al., 2020)
<i>blaCTX-M</i>			
Genes de resistência à macrolídeos ( <i>ermB</i> , <i>ermF</i> )			
<i>floR</i>			
<i>mcr-1</i>			
<i>qnrS</i>			
Genes de resistência à sulfonamidas ( <i>sul1</i> , <i>sul2</i> )			
<i>vanA</i>			
<i>tetM</i>			
<i>int11</i>			
(Colomer-Lluch, Imamovic, et al., 2011)	<i>Escherichia coli</i>	Resíduos fecais de suínos, aves e bovinos	(Colomer-Lluch et al., 2011)
<i>mecA</i>			
Genes de resistência à tetraciclinas ( <i>tet(44)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(Y)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(36)</i> , <i>tet(40)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(32)</i> , <i>tet(X)</i> , <i>tetA(P)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(H)</i> )	N/A	Águas residuais	(Wang et al., 2018)
Genes de resistência à aminoglicosídeos ( <i>aph(3')-III</i> , <i>aadA6</i> , <i>aadA1</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aadE</i> , <i>aac(6')-IIa</i> , <i>strB</i> , <i>aac(6')aph(2'')</i> , <i>strA</i> , <i>aadA5</i> , <i>ant(6)Ib</i> , <i>aadA8b</i> , <i>aadA17</i> , <i>aph(3')-Ic</i> )			

Genes de resistência à macrolídeos ( <i>mef(A)</i> , <i>mef(B)</i> , <i>erm(F)</i> , <i>msr(D)</i> , <i>lnu(C)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>ere(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(G)</i> , <i>srm(B)</i> , <i>erm(42)</i> , <i>car(A)</i> , <i>erm(X)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>lnu(F)</i> )			
Genes de resistência à fenicolis ( <i>floR</i> , <i>cat</i> , <i>optrA</i> , <i>catQ</i> , <i>cm1A1</i> , <i>cmx</i> , <i>catB3</i> , <i>fexA</i> , <i>cml</i> , <i>catB8</i> , <i>catP</i> , <i>cfr</i> , <i>catB2</i> , <i>cat(pC194)</i> , <i>catA2</i> )			
Genes de resistência à sulfonamidas ( <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> )			
<i>qnrS</i>	<i>Escherichia coli</i>	Estações de tratamento de águas residuais	(Marti et al., 2014)
<i>blaSHV</i>			
Genes de resistência à tetraciclinas ( <i>tetA</i> , <i>tetW</i> )	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Stenotrophomonas spp.</i> , <i>Salmonella Gallinarum</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Citrobacter sedlakii</i>	Solo, água, cama de aves, esgoto, lagoa	(Anand et al., 2016)
Genes de resistência à betalactâmicos ( <i>blaOXA-2</i> , <i>blaTEM</i> )			
<i>tet(A)</i>	<i>Escherichia coli</i>	Carne de frango	(Shousha et al., 2015)
<i>aphA1</i>			
<i>blaTEM</i>			
<i>floR</i>			

A natureza ecológica da resistência antimicrobiana é um reflexo e uma consequência da interconectividade e da diversidade da vida no planeta (Robinson et al., 2016). Portanto, qualquer medida para combater esse problema precisa considerar não apenas a saúde humana e animal, mas também o meio ambiente. A abordagem conhecida como Saúde Única, oriunda do inglês *One Health*, reconhece as interconexões estabelecidas entre meio ambiente, bem como da saúde humana e animal e, portanto, se torna crucial para o enfrentamento da resistência antimicrobiana (Ryu et al., 2017).

As estratégias de mitigação voltadas às resistências antimicrobianas e ancoradas na abordagem de Saúde Única foram desenvolvidas pela OMS e outras agências internacionais como a FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura) e a OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), juntamente com outros países (WHO, 2015). Dentre estas estratégias, está o fortalecimento dos conhecimentos e evidências por meio de vigilância e pesquisa que se alinha integralmente com os trabalhos que buscam avaliar o papel dos fagos e a transferência horizontal de genes. Conforme discutido acima, a HGT mediada por fagos desempenha um papel crucial na disseminação de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas. Portanto, a vigilância e a investigação desses eventos são essenciais para identificação e prevenção da resistência antimicrobiana. Além de permitir a identificação de padrões emergentes de resistência antimicrobiana relevantes para humanos e animais, a vigilância

auxilia na avaliação da eficácia das estratégias adotadas para controlar esse problema (McEwen & Collignon, 2018).

## REFERÊNCIAS

Al-Mustapha, A. I., Raufu, I. A., Ogundijo, O. A., Odetokun, I. A., Tiwari, A., Brouwer, M. S. M., Adetunji, V., & Heikinheimo, A. (2023). Antibiotic resistance genes, mobile elements, virulence genes, and phages in cultivated ESBL-producing *Escherichia coli* of poultry origin in Kwara State, North Central Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 389, 110086. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110086>

Anand, T., Bera, B. Ch., Vaid, R. K., Barua, S., Riyesh, T., Virmani, N., Hussain, M., Singh, R. K., & Tripathi, B. N. (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *Journal of General Virology*, 97(12), 3458–3466. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000639>

Aranaga, C., Pantoja, L. D., Martínez, E. A., & Falco, A. (2022). Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4577. <https://doi.org/10.3390/ijms23094577>

Bai, J., Kim, Y.-T., Ryu, S., & Lee, J.-H. (2016). Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00474>

Borodovich, T., Shkoporov, A. N., Ross, R. P., & Hill, C. (2022). Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. *Gastroenterology Report*, 10. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac012>

Broncano-Lavado, A., Santamaría-Corral, G., Esteban, J., & García-Quintanilla, M. (2021). Advances in Bacteriophage Therapy against Relevant MultiDrug-Resistant Pathogens. *Antibiotics*, 10(6), 672. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060672>

Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.-L., & Brüssow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 417–424. [https://doi.org/10.1016/S13695274\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S13695274(03)00086-9)

Castillo, D., & Middelboe, M. (2016). Genomic diversity of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiology Letters*, 363(24), fnw272. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw272>

Collignon, P. (2012). The Importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance (p. 19–36). [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_224](https://doi.org/10.1007/82_2012_224)

Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>

Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic Resistance Genes in the

Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS ONE*, 6(3), e17549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>

D'Accolti, M., Soffritti, I., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2021). Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy. *Microorganisms*, 9(2), 261. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020261>

Despotovic, M., de Nies, L., Busi, S. B., & Wilmes, P. (2023). Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102291. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102291>

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S., & Lavigne, R. (2012). Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 699–722. <https://doi.org/10.2174/138920312804871193>

Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P.-J., & Brouns, S. J. J. (2022). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>

Elois, M. A., Silva, R. da, Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*, 15(2), 349. <https://doi.org/10.3390/v15020349>

Fan, X., Li, W., Zheng, F., & Xie, J. (2013). Bacteriophage Inspired Antibiotics Discovery against Infection Involved Biofilm. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 23(4), 317–326. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013007717>

Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.002>

Fleming, A. (1980). Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236, 1929. *Reviews of infectious diseases*, 2(1), 129–139.

García, P., Martínez, B., Rodríguez, L., & Rodríguez, A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.029>

Gordillo Altamirano, F. L., Kostoulias, X., Subedi, D., Korneev, D., Peleg, A. Y., & Barr, J. J. (2022). Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *eBioMedicine*, 80, 104045. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104045>

Guerin, E., & Hill, C. (2020). Shining Light on Human Gut Bacteriophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00481>

Hussain, W., Yang, X., Ullah, M., Wang, H., Aziz, A., Xu, F., Asif, M., Ullah, M. W., & Wang, S. (2023). Genetic engineering of bacteriophages: Key concepts, strategies, and applications. *Biotechnology Advances*, 64, 108116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108116>

Jensen, K. C., Hair, B. B., Wienclaw, T. M., Murdock, M. H., Hatch, J. B., Trent, A. T., White, T. D., Haskell, K. J., & Berges, B. K. (2015). Isolation and Host Range of Bacteriophage

with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant. *PLOS ONE*, 10(7), e0131714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131714>

Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto45.062806.094411>

Jun, J. W., Giri, S. S., Kim, H. J., Yun, S. K., Chi, C., Chai, J. Y., Lee, B. C., & Park, S. C. (2016). Bacteriophage application to control the contaminated water with *Shigella*. *Scientific Reports*, 6(1), 22636. <https://doi.org/10.1038/srep22636>

Kaplan, T. (2014). The Role of Horizontal Gene Transfer in Antibiotic Resistance. *Eukaryon*, 10, 80.

Kittler, S., Wittmann, J., Mengden, R. A. L. P., Klein, G., Rohde, C., & Lehnerr, H. (2017). The use of bacteriophages as One-Health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5, 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.06.001>

Klumpp, J., Dunne, M., & Loessner, M. J. (2023). A perfect fit: Bacteriophage receptor-binding proteins for diagnostic and therapeutic applications. *Current Opinion in Microbiology*, 71, 102240. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102240>

Kumar, S. B., Arnipalli, S. R., & Ziouzenkova, O. (2020). Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 9(10), 688. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688>

Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>

Liu, R., Han, G., Li, Z., Cun, S., Hao, B., Zhang, J., & Liu, X. (2022). Bacteriophage therapy in aquaculture: current status and future challenges. *Folia Microbiologica*, 67(4), 573–590. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00965-6>

Luong, T., Salabarria, A.-C., Edwards, R. A., & Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols*, 15(9), 2867–2890. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0>

Marti, E., Variatza, E., & Balcázar, J. L. (2014). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), O456–O459. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (p. 521–547). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch25>

Meng, M., Li, Y., & Yao, H. (2022). Plasmid-Mediated Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Soil. *Antibiotics*, 11(4), 525. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040525>

Moelling, K., Broecker, F., & Willy, C. (2018). A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses*, 10(12), 688. <https://doi.org/10.3390/v10120688>

Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*, 13(4), 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680>

Ngoi, S. T., Chong, C. W., Ponnampalavanar, S. S. L. S., Tang, S. N., Idris, N., Abdul

Jabar, K., Gregory, M. J., Husain, T., & Teh, C. S. J. (2021). Genetic mechanisms and correlated risk factors of antimicrobial-resistant ESKAPEE pathogens isolated in a tertiary hospital in Malaysia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 10(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-009365>

Obradovic, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., Guven, K., & Iriarte, F. B. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*, 89(7), 712–716. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0712>

Oduor, J. M. O., Kadija, E., Nyachio, A., Mureithi, M. W., & Skurnik, M. (2020). Bioprospecting Staphylococcus Phages with Therapeutic and Bio-Control Potential. *Viruses*, 12(2), 133. <https://doi.org/10.3390/v12020133>

Peltomaa, R., López-Perolio, I., Benito-Peña, E., Barderas, R., & Moreno-Bondi, M. C. (2016). Application of bacteriophages in sensor development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(7), 1805–1828. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9087-2>

Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>

Poluri, K. M., Sitthisak, S., Khairnar, K., & Czajkowski, R. (2021). Editorial: Bacteriophages Isolation From the Environment and Their Antimicrobial Therapeutic Potential. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649334>

Rahman, Md. T., Sobur, Md. A., Islam, Md. S., Levy, S., Hossain, Md. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>

Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>

Rogovski, P., Cadamuro, R. D., da Silva, R., de Souza, E. B., Bonatto, C., Viancelli, A., Michelon, W., Elmahdy, E. M., Treichel, H., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2021). Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793135>

Ryu, S., Kim, B. I., Lim, J.-S., Tan, C. S., & Chun, B. C. (2017). One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 50(6), 411–414. <https://doi.org/10.3961/jpmp.17.097>

Saw, P. E., & Song, E.-W. (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein & Cell*, 10(11), 787–807. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0639-7>

Schenberg, A. C. G. (2010). Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. *Estudos Avançados*, 24(70), 07–17. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300002>

Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages. *Bacteriophage*, 3(2), e25518. <https://doi.org/10.4161/bact.25518>

Shousha, A., Aawaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F. J. M., Paulsen, P., Szostak, M. P., Humphrey, T., & Hilbert, F. (2015). Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4600–4606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-15>

Solomon, S. E. B., Farias, M. R. de, & Pimpão, C. T. (2016). Use of Staphylococcus aureus Phage Lysate Staphage Lysate (SPL)® for the Control of Recurrent Pyoderma Eczema in Dogs with Atopic Dermatitis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 7. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81103>

Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>

Totté, J. E. E., van Doorn, M. B., & Pasmans, S. G. M. A. (2017). Successful Treatment of Chronic Staphylococcus aureus-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphfect SA.100: A Report of 3 Cases. *Case Reports in Dermatology*, 9(2), 19–25. <https://doi.org/10.1159/000473872>

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

Wagemans, J., Holtappels, D., Vainio, E., Rabiey, M., Marzachi, C., Herrero, S., Ravanbakhsh, M., Tebbe, C. C., Ogliastro, M., Ayllón, M. A., & Turina, M. (2022). Going Viral: Virus-Based Biological Control Agents for Plant Protection. *Annual Review of Phytopathology*, 60(1), 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-114208>

Wang, M., Xiong, W., Liu, P., Xie, X., Zeng, J., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Metagenomic Insights Into the Contribution of Phages to Antibiotic Resistance in Water Samples Related to Swine Feedlot Wastewater Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02474>

World Health Organization. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. [www.paprika-annecy.com](http://www.paprika-annecy.com)

Yang, Q., Le, S., Zhu, T., & Wu, N. (2023). Regulations of phage therapy across the world. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1250848>

Yang, Y., Xie, X., Tang, M., Liu, J., Tuo, H., Gu, J., Tang, Y., Lei, C., Wang, H., & Zhang, A. (2020). Exploring the profile of antimicrobial resistance genes harboring by bacteriophage in chicken feces. *Science of The Total Environment*, 700, 134446. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134446>

Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J. A., & Wang, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food Microbiology*, 31(1), 133–136. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.005>

Zhang, X., Zhang, X., Gao, H., & Qing, G. (2022). Phage display derived peptides for Alzheimer's disease therapy and diagnosis. *Theranostics*, 12(5), 2041–2062. <https://doi.org/10.7150/thno.68636>

Zinsstag, J., Meisser, A., Schelling, E., Bonfoh, B., & Tanner, M. (2012). From 'two medicines' to 'One Health' and beyond. *Onderstepoort J Vet Res*, 79(2). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i2.492>

## Vacinologia reversa: um novo paradigma para o desenvolvimento de imunizantes destinados à saúde única

DOI: 10.56041/9786599841859-7

**DE OLIVEIRA, Miguel De Abreu**

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-6907-189X>

**BELTRÃO, Gabriel Salles**

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0009-0005-4262-4705>

**PINTO, Aguinaldo Roberto\***

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-0991-8876>

**SILVEIRA, Douglas Bardini**

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-2212-9564>

## RESUMO

A universalização da vacinação constitui uma das políticas de saúde pública mais bem-sucedidas da história da humanidade, diminuindo sobremaneira a incidência, a morbidade e a mortalidade de doenças imunopreveníveis. Para tanto, a primeira geração de imunizantes se baseou na atenuação ou inativação do respectivo patógeno-alvo para induzir uma resposta imune protetora. Tal abordagem possui a desvantagem de demandar o cultivo e propagação *in vitro* do agente infeccioso em laboratórios de elevado nível de biossegurança e complexidade operacional. Alternativamente, avanços na área da biotecnologia vêm possibilitando o desenvolvimento de novas vacinas por meio da integração das ciências ômicas, permitindo uma maior compreensão a nível molecular da fisiologia do patógeno-alvo. Diante desse panorama, a vacinologia reversa emerge como uma abordagem promissora ao prospectar antígenos sem a necessidade do cultivo *in vitro* de patógenos, utilizando ferramentas computacionais para o reconhecimento e triagem de potenciais alvos vacinais. O presente capítulo irá transcorrer sobre as principais etapas aplicadas na vacinologia reversa, suas limitações e as perspectivas de avanço para as próximas décadas.

**Palavras-chave:** Vacinas; Bioinformática; Imunoinformática; Biologia computacional.

## INTRODUÇÃO

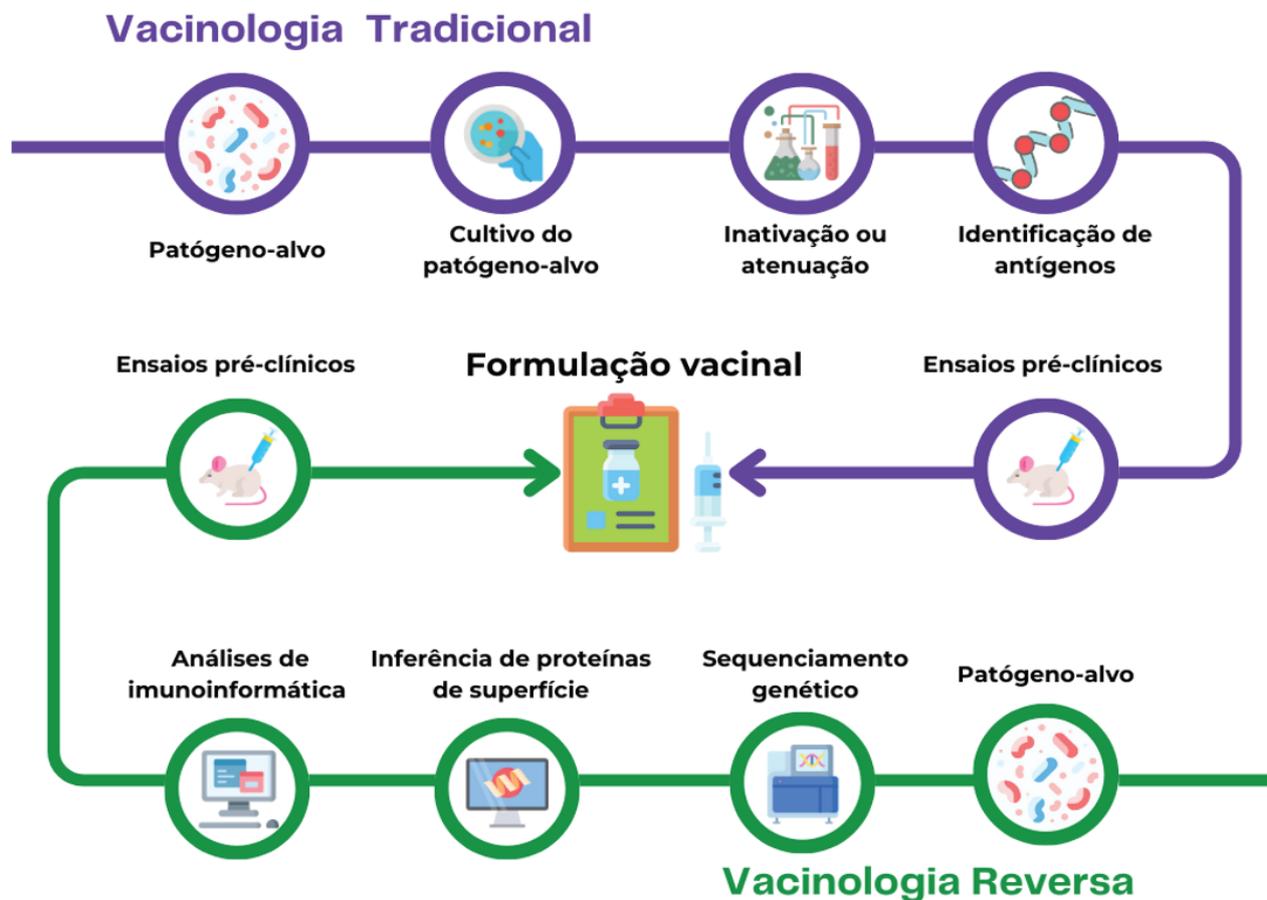
Ao longo da história da humanidade, doenças infecciosas moldaram profundamente a formação de sociedades e culturas. À medida que a população mundial se expandiu em tamanho e complexidade, a disseminação dessas doenças promoveu impacto direto sobre a expectativa de vida, fundamentando a necessidade de uma maior compreensão acerca de sua etiologia, profilaxia e tratamento (Excler et al., 2021; Friedler, 2020; World Health Organization, 2012; Iacono; Nichols 2017). A Teoria Microbiana das Doenças emergiu nesse contexto como um marco notável ao determinar o papel patogênico dos microrganismos, além de fomentar o surgimento de práticas assépticas, promover o saneamento e estruturar bases teóricas para o desenvolvimento de outras ferramentas profiláticas, como as vacinas (The Lancet, 2022; Riedel, 2005).

Vacinas integram uma gama de bioprodutos capazes de induzir uma resposta imune protetora frente a um agente infeccioso, estabelecendo uma defesa duradoura, capaz de prevenir a instauração de determinadas doenças infecciosas em caso de exposição subsequente ao respectivo patógeno (Khan et al., 2022a). A capilarização da vacinação como estratégia de saúde pública contou com a seminal contribuição de Edward Jenner, que imunizou o primeiro indivíduo contra a varíola humana a partir do fluido obtido de lesões cutâneas ocasionadas pelo vírus da varíola bovina. Devido à sua origem, a etimologia do termo vacina deriva da palavra latina “*vaccā*”, cujo significado se refere ao léxico “vaca” na língua portuguesa. O sucesso dos programas de vacinação frente à varíola humana resultou em 1980 na sua erradicação, conforme anunciado pela Organização Mundial da Saúde (Depelseñaire et al., 2017; World Health Organization, 1980).

Para tal finalidade, a vacinologia clássica empregou a inativação e atenuação de patógenos como pilar basilar no desenvolvimento de imunizantes. Essas abordagens contribuíram substancialmente no controle do sarampo, poliomielite, caxumba, rubéola, difteria, raiva e coqueluche (Rodrigues; Plotkin, 2020; Kallerup; Foged, 2014). Destaca-se como vantagens dessa plataforma vacinal o seu baixo custo de produção e sua elevada efetividade. No entanto, algumas limitações inerentes ao seu processo produtivo constituem um desafio em situações que envolvam uma alta demanda por determinados imunizantes, como diante da pandemia ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2 (Abu-Raya et al., 2020). Nesse cenário, faz-se necessário estabelecer plantas industriais com elevado nível de biossegurança e complexidade operacional para o cultivo e propagação viral, objetivando a produção de vacinas inativadas. No que se refere a produção de vacinas atenuadas, é imperativo um amplo sistema de controle de qualidade para certificar a sua segurança e garantir que o vírus não apresente reativação após sua administração em seres humanos (Van Riel; De Wit, 2020; Stauffer et al., 2006; Abu-Raya et al., 2020).

Em paralelo aos últimos avanços no âmbito da biologia molecular e da bioinformática, novas plataformas vacinais vêm sendo desenvolvidas, como é o caso das vacinas feitas de ácidos nucleicos ou baseadas em peptídeos recombinantes (Braz et al., 2014; Diniz; Ferreira, 2010). Tais estratégias possibilitaram a ascensão de um novo paradigma para o desenvolvimento de imunizantes: a vacinologia reversa. Essa abordagem visa utilizar dados genômicos, através de simulações computacionais (*in silico*), na triagem de potenciais alvos vacinais, como por exemplo, fatores de virulência e proteínas de superfície do patógeno-alvo (Figura 1). Em contraposição com a vacinologia tradicional, a vacinologia reversa não necessita da expansão e do cultivo do patógeno-alvo e apresenta como vantagens a aceleração do processo de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, personalização de antígenos, assim como a redução de efeitos adversos relacionados a esses imunizantes (Nandy; Basask, 2019; He, 2015; Tselis, 2014; Khalid; Poh, 2023; Rappuoli, 2001).

**Figura 1** - Principais etapas utilizadas para o desenvolvimento de potenciais imunizantes através da vacinologia tradicional ou reversa.

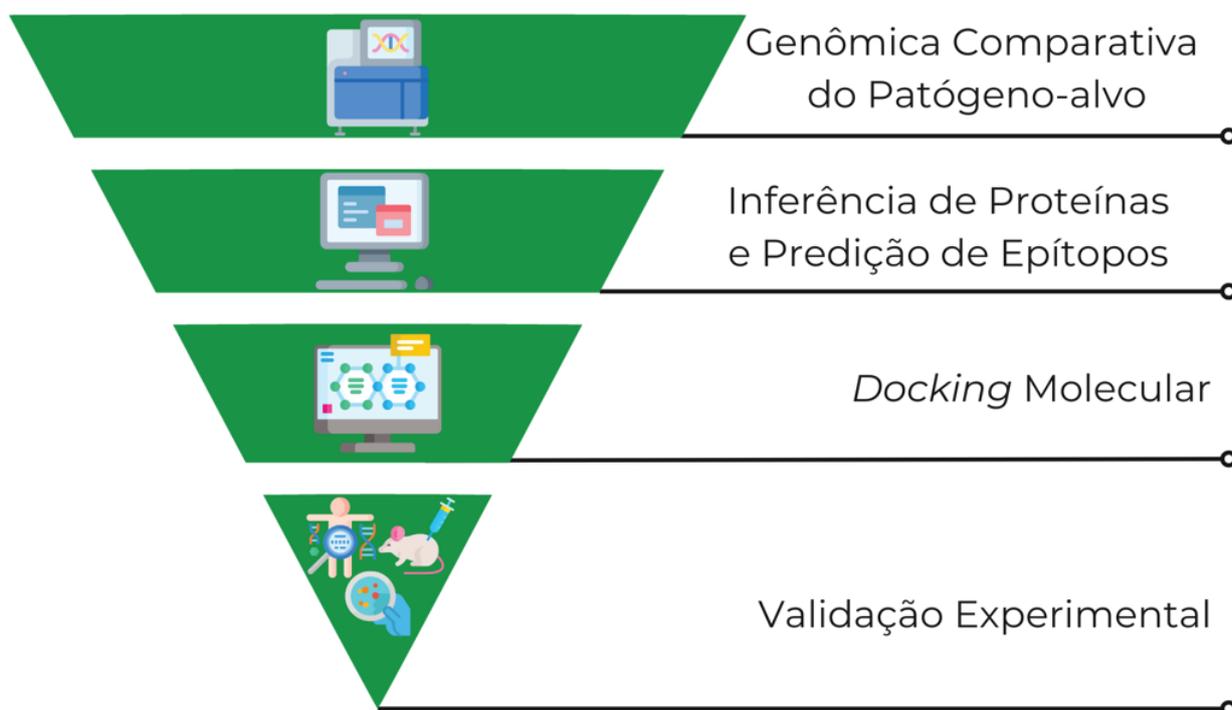


A vacina 4CMenB (Bexsero®), desenvolvida pela companhia multinacional britânica GlaxoSmithKline, apresenta-se como exemplo emblemático da aplicação da estratégia de vacinologia reversa no desenvolvimento de imunizantes. Essa vacina foi aprovada pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* no ano de 2015 e constitui uma importante ferramenta profilática contra a bactéria *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B, elencada como uma das principais causadoras de meningite bacteriana e sepse pediátrica (*Food and Drug Administration*, 2015; Davide et al., 2012). A concepção dessa vacina se tornou possível após o sequenciamento completo do genoma da *N. meningitidis* cepa MC58, evidenciando a expressão de cerca de 2.000 proteínas (Tettelin et al., 2000). Com o intuito de realizar a triagem dos possíveis alvos vacinais, foram empregados algoritmos de bioinformática para inferência de proteínas presentes na superfície bacteriana, as quais foram posteriormente clonadas, expressas e submetidas a ensaios para avaliação da resposta humoral. A formulação final da vacina licenciada é composta por quatro antígenos: a proteína de ligação ao fator H (fHbp), o antígeno de ligação à heparina (NHBA), adesina A (NadA) e a vesícula de membrana externa contendo a proteína PorA. (Rappuoli et al., 2018; Giuliani et al., 2006). Ao final dos ensaios clínicos a vacina 4CMenB se mostrou segura e com uma efetividade de 71% contra a doença meningocócica sorogrupo B em indivíduos que receberam a administração das duas doses (Castilla et al., 2023).

## PRINCIPAIS ETAPAS DA VACINOLOGIA REVERSA

O processo de pesquisa e desenvolvimento de imunizantes por meio da vacinologia reversa destaca-se por aplicar diversas ferramentas computacionais, objetivando a identificação e análise de potenciais alvos vacinais (Quadro 1). Nesse sentido, o sequenciamento de genomas, caracterização proteômica e a utilização de bases de dados biológicos constituem uma etapa fundamental ao fornecer um vasto repertório sobre o patógeno-alvo. Conjuntamente, essas abordagens possibilitam a inferência de antígenos proteicos de superfície, direcionando a formulação de um imunizante adaptado às especificidades do patógeno-alvo em questão (Quiroz-Castañeda, 2018; Rappuoli, 2001; Bentley; Lo, 2021; Lu et al., 2020; Tsolakos et al., 2014; Bambini; Rappuoli, 2009). As principais etapas envolvidas na triagem e seleção de antígenos na vacinologia reversa estão indicados na Figura 2.

**Figura 2** - Fluxo de trabalho utilizado na triagem e seleção de proteínas imunogênicas na vacinologia reversa



**Quadro 1** - Ferramentas frequentemente utilizadas na vacinologia reversa.

Ferramenta	Etapa	Fonte
VISTA	Genômica comparativa	<a href="https://genome.lbl.gov/vista/">https://genome.lbl.gov/vista/</a>
PipMaker	Genômica comparativa	<a href="http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/">http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/</a>
BepiPred 2.0	Predição de epítopo de células B	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/</a>

DiscoTope	Predição de epítopo de células B	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/">http://www.cbs.dtu.dk/</a>
Ellipro	Predição de epítopo de células B	<a href="http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro/iedbinput">http://tools.immuneepitope.org/ tools/ElliPro/iedbinput</a>
IEDB ( <i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i> )	Predição de epítopos de células B e T	<a href="http://tools.iedb.org/">http://tools.iedb.org/</a>
NetCTL	Predição de epítopo d de células T	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ NetCTL/</a>
Propred	Predição de epítopo d de células T	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/propred1">http://www.imtech.res.in/raghava/ propred1</a>
EpiMatrix	Predição de epítopo de células T	<a href="http://www.epivax.com/">http://www.epivax.com/</a>
SwissDock	Docking molecular	<a href="http://www.swissdock.ch/">http://www.swissdock.ch/</a>
Autodock	Docking molecular	<a href="https://autodock.scripps.edu/">https://autodock.scripps.edu/</a>

## GENÔMICA COMPARATIVA DO PATÓGENO-ALVO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

A genômica comparativa é um campo de pesquisa utilizado para identificar diferenças entre o genoma de duas ou mais espécies. Neste campo a técnica de genômica subtrativa possui o objetivo de encontrar sequências nucleotídicas presentes em um organismo e ausentes em outro (Barh et al., 2011; Lin et al., 2020). Na vacinologia reversa, a genômica subtrativa permite identificar genes exclusivos do patógeno, servindo como alvos vacinais com baixas chances de reações cruzadas (Ashraf et al., 2022; Khan et al., 2022b). Em paralelo, as rotas físico-químicas e metabólicas desses alvos vacinais, assim como a estrutura das proteínas envolvidas, tendem a ser diferentes daquelas encontradas no hospedeiro e sua inibição ou bloqueio podem ser virtualmente letais ao patógeno (Martínez-Carranza et al, 2018).

Após a identificação dos genes de interesse é realizada a inferência da localização celular de suas respectivas proteínas, buscando selecionar potenciais antígenos secretados e/ou presentes na superfície do patógeno. Quanto mais exposto ao sistema imunológico do hospedeiro, melhor estes atuarão como alvo vacinal. Para isso, algoritmos computacionais se baseiam na identificação de sequências de aminoácidos que servem como peptídeo sinal com a finalidade de se determinar o endereçamento das proteínas ao seu compartimento celular

(Jorge & Dellagostin, 2017; Rappuoli, 2000; Rappuoli, 2001; Sette; Rappuoli, 2010).

## **PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS B E T**

Após a seleção das proteínas secretadas e/ou presentes na superfície do patógeno, segue-se a análise estrutural/conformacional de tais antígenos para a predição de epítomos, comumente empregando modelagens por homologia (Sanchez-Trincado et al., 2017; Yurina; Adianingsih, 2022; Jing & Dong, 2017). A predição de epítomos para linfócitos T tem como objetivo identificar os menores peptídeos de antígenos com caráter imunogênico, ou seja, que podem gerar uma resposta de linfócitos CD8 ou CD4. Essa identificação é realizada através da previsão de ligação de peptídeos às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Ullah et al., 2023). A previsão de ligação ao MHC do tipo I geralmente considera peptídeos de tamanho fixo, enquanto para o MHC do tipo II são considerados peptídeos de tamanhos variáveis (Sanchez-Trincado et al., 2017).

A predição de epítomos pra linfócitos B tem busca identificar estruturas que levam à produção de anticorpos (Ras-Carmona et al., 2022). Os epítomos conformacionais são estruturalmente mais complexos, formados por regiões não sequenciais e geralmente em estruturas tridimensionais (Cia; Pucci; Rooman, 2023). Para prever esses epítomos são utilizadas diversas técnicas, como a análise de acessibilidade ao solvente, identificação de regiões proeminentes na superfície da proteína e análise das propriedades físico-químicas dos aminoácidos (Sanchez-Trincado et al., 2017; Yurina; Adianingsih, 2022). A previsão de epítomos conformacionais necessita de validação experimental e é mais trabalhosa que a predição de epítomos lineares. Enquanto os linfócitos T reconhecem epítomos lineares e processados, os linfócitos B reconhecem antígenos conformacionais e sem a necessidade de processamento.

## ***DOCKING MOLECULAR***

O *docking* molecular é um método *in silico* utilizado para simular interações entre pequenos compostos ou macromoléculas com um receptor e prever suas interações moleculares. Consiste, portanto, em prever a melhor posição e orientação de um ligante em relação à outra molécula (Meng et al., 2011). Na vacinologia reversa essa abordagem tem o objetivo de validar as predições de epítomos realizadas anteriormente. O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: previsão da conformação molecular e avaliação da afinidade de ligação.

A previsão da conformação molecular determina como um ligante se encaixa e interage com o sítio ativo de uma proteína. Esse processo inicia com a exploração de diferentes conformações do ligante, ou seja, as várias disposições tridimensionais que a molécula pode assumir (Agu et al., 2023). Uma vez que um ligante pode adotar múltiplas conformações devido à flexibilidade das moléculas, almeja-se aqui identificar aquela que melhor se ajusta ao sítio de ligação da proteína. Isso é feito por meio de algoritmos de amostragem, que exploram o espaço conformacional do ligante dentro do sítio ativo da proteína, considerando tanto a orientação quanto a posição do ligante (Morris & Lim-Wilby, 2008; Meng et al., 2011).

A avaliação da afinidade de ligação ocorre após a geração de várias conformações

possíveis do ligante no sítio ativo da proteína, quando uma função de pontuação é aplicada para estimar a afinidade da ligação. Essa função leva em conta fatores como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e efeitos eletrostáticos, fornecendo uma pontuação numérica que reflete a favorabilidade da interação ligante-receptor (Meng et al., 2011; Bender et al., 2021; Agu et al., 2023). Embora essas funções de pontuação busquem prever as conformações mais prováveis sob condições biológicas, também possuem limitações e tendem a simplificar as complexas interações moleculares, bem como a termodinâmica de ligação. A precisão das previsões de *docking*, portanto, depende da qualidade da função de pontuação e da validação experimental subsequente (Shivanika et al., 2020).

## VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

A validação experimental consiste em uma etapa central no desenvolvimento de uma vacina, independente da abordagem vacinológica empregada. Contudo, a diferença fundamental entre os métodos aqui discutidos é o tempo necessário para se chegar neste passo. Na vacinologia tradicional o processo requer o cultivo do patógeno e diversos ensaios em modelos *in vivo* para seleção de candidatos vacinais, sendo que tal processo requer consideravelmente mais recursos e tempo. Ao se utilizar a estratégia da vacinologia reversa, a identificação e análise de epítomos-alvo é realizada *a priori* por meio de ferramentas de imunoinformática e análise computacional, seguindo posteriormente para ensaios *in vitro* e em seres vivos (Rappuoli, 2000; Rappuoli, 2001).

A abordagem *in silico* de descoberta de alvos vacinais oferece ainda a grande vantagem de minimizar o uso de animais de experimentação, alinhando-se assim ao princípio dos '3Rs' (Reduzir, Refinar e Substituir) proposto por Russel e Burch em 1959. Esta abordagem não só atenua considerações éticas ao reduzir o número de animais sujeitos a procedimentos experimentais, mas também proporciona velocidade na obtenção de resultados e uma economia de custos significativa. Ademais, é possível dedicar maior atenção à qualidade e precisão dos dados obtidos, reduzindo o número de modelos animais necessários e garantindo assim resultados mais confiáveis e reproduzíveis (Shi et al., 2019; Danchin, 2022).

## LIMITAÇÕES ATUAIS E PERSPECTIVAS PARA A VACINOLOGIA REVERSA

A vacinologia reversa constitui uma abordagem metodológica em plena ascensão. Por meio dela já é possível acelerar o processo de desenvolvimento de vacinas, a customização de antígenos, a diminuição do número de animais em testes vacinais e a redução de possíveis efeitos adversos (Khalid; Poh, 2023; Rappuoli, 2001). Entretanto, essa abordagem metodológica apresenta também algumas limitações, dentre elas a complexidade de se identificar antígenos glicosilados, assim como a existência de proteínas que não são previstas por meio dos dados genômicos. As perspectivas para as próximas décadas no âmbito da vacinologia reversa incluem uma maior compreensão das fases de leitura aberta não-canônicas e a potencial relevância de suas respectivas proteínas codificadas na formulação de vacinas (Bruno et al., 2015). Outrossim, à medida que a compreensão acerca das interações celulares e moleculares

relacionadas ao sistema imunológico avançam, as ferramentas computacionais permitirão uma resposta cada vez mais rápida, precisa e adaptável ao desenvolvimento de novos imunizantes destinados à saúde única.

**Financiamento:** Aguinaldo R. Pinto é bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Miguel de Abreu de Oliveira é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Gabriel Salles Beltrão é bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/UFSC/CNPq).

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

Abu-Raya, B., Gantt, S., & Sadarangani, M. (2020). Challenges in evaluating SARS-CoV-2 vaccines during the COVID-19 pandemic. *CMAJ*, 192(34), E982-E985. doi: 10.1503/cmaj.201237

Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I. & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. doi: 10.1038/s41598-023-40160-2

Ashraf, B., Atiq, N., Khan, K., Wadood, A., & Uddin, R. (2022). Subtractive genomics profiling for potential drug targets identification against *Moraxella catarrhalis*. *Plos one*, 17(8), e0273252. doi: 10.1371/journal.pone.0273252

Bambini, S., & Rappuoli, R. (2009). The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug discovery today*, 14(5-6), 252-260. doi: 10.1016/j.drudis.2008.12.007

Barh, D., Tiwari, S., Jain, N., Ali, A., Santos, A. R., Misra, A. N., Azevedo, V. & Kumar, A. (2011). In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens. *Drug Development Research*, 72(2), 162-177. doi: 10.1002/ddr.20413

Bender B. J., Gahbauer S., Luttens A., Lyu J., Webb C. M., Stein R. M., Fink E. A., Balius T. E., Carlsson J., Irwin J. J., & Shoichet B.K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature protocols*, 16(10), 4799–4832. doi: 10.1038/s41596-021-00597-z

Bentley, S. D., & Lo, S. W. (2021). Global genomic pathogen surveillance to inform vaccine strategies: a decade-long expedition in pneumococcal genomics. *Genome Medicine*, 13(1), 1-12. doi: 10.1186/s13073-021-00901-2

Braz, L. C. C., Guimarães, D. T., Vaz, M. R. F., & de Farias Nóbrega, F. F. (2014). Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. *Revista Saúde & Ciência*, 3(3), 189-206. doi: 10.35572/rscv3i3.324

Bruno, L., Cortese, M., Rappuoli, R., & Merola, M. (2015). Lessons from Reverse

Vaccinology for viral vaccine design. *Current opinion in virology*, 11, 89-97. doi: 10.1016/j.coviro.2015.03.001

Castilla, J., García Cenoz, M., Abad, R., Sánchez-Cambronero, L., Lorusso, N., Izquierdo, C., Llabrés S., Roig J., Malvar A., González Carril F., Boone A. L. D., Pérez Martín J., Rodríguez Recio M. J., Galmés A., Caballero A., García Rojas A., Juanas F., Nieto M., Vitoria Raymundo L. J., Martínez Ochoa E., Rivas A. I., Castrillejo D., Moreno Pérez D., Martínez A., Borràs E., Sánchez Gómez A., Pastor E., Nartallo V., Arteagoitia J. M., Álvarez-Fernández B., García Pina R., Fernández Arribas S., Vanrell J., García Hernández S., Mendoza R. M., Méndez M., López-Tercero M. M., Fernández-Rodríguez Á., Blanco Á., Carrillo de Albornoz F. J., Ruiz Olivares J., Ruiz-Montero R., Limia A., Navarro-Alonso J. A., Vázquez J. A. & Barricarte, A. (2023). Effectiveness of a meningococcal group B vaccine (4CMenB) in children. *New England Journal of Medicine*, 388(5), 427-438. doi: 10.1056/NEJMoa2206433

Cia, G., Pucci, F., & Rooman, M. (2023). Critical review of conformational B-cell epitope prediction methods. *Briefings in bioinformatics*, 24(1), bbac567. doi: 10.1093/bib/bbac567

Danchin, A. (2022). In vivo, in vitro and in silico: an open space for the development of microbe-based applications of synthetic biology. *Microbial Biotechnology*, 15(1), 42-64. doi:10.1111/1751-7915.13937

Del Tordello, E., Rappuoli, R., & Delany, I. (2017). Chapter 3 - Reverse vaccinology: exploiting genomes for vaccine design. *Human Vaccines* (pp. 65-86). doi: 10.1016/B978-0-12-802302-0.00002-9

Depelseñaire, A. C. I., Kendall, M. A. F., Young, P. R., & Muller, D. A. (2017). Introduction to vaccines and vaccination. In *Micro and nanotechnology in vaccine development* (pp. 47-62). William Andrew Publishing. doi: 10.1016/B978-032339981-4.00003-8

Diniz, M. D. O., & Ferreira, L. C. D. S. (2010). Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos avançados*, 24, 1930. doi: 10.1590/S0103-40142010000300003

Excler, J. L., Saville, M., Berkley, S., & Kim, J. H. (2021). Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nature medicine*, 27(4), 591-600. doi: 10.1038/s41591-021-01301-0

Friedler, A. (2021). Sociocultural, behavioural and political factors shaping the COVID-19 pandemic: the need for a biocultural approach to understanding pandemics and (re) emerging pathogens. *Global public health*, 16(1), 1735. doi: 10.1080/17441692.2020.1828982

Food and Drug Administration. Bexsero (meningococcal serogroup B vaccine), Approval Letter dated January 23, 2015. 2015.

Giuliani, M. M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Aricò, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecchi, B., Cartocci, E., Ciucchi, L., Di Marcello, F., Ferlicca, F., Galli, B., Luzzi, E., Masignani, V., Serruto, D., Veggi, D., Contorni, M., Morandi M., Bartalesi A., Cinotti V., Mannucci D., Titta F., Ovidi E., Welsch JA., Granoff D., Rappuoli R., & Pizza, M. (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 10834–10839. doi: 10.1073/pnas.0603940103

He, Y. (2015). Bacterial whole-genome determination and applications. In *Molecular medical microbiology* (pp. 357368). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12397169-2.00020-2

Iacono, G. L., & Nichols, G. L. (2017). Modeling the impact of environment on infectious diseases. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. doi: 10.1093/acrefore/9780199389414.013.339

Jing, X., & Dong, Q. (2017). MQAPRank: improved global protein model quality assessment by learning-to-rank. *BMC bioinformatics*, 18, 1-8. doi: 10.1186/s12859-017-1691-z

Jorge, S.; Dellagostin, O. A.. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 6-13, 2017. doi: 10.1016/j.biori.2017.10.001

Kallerup, R. S., & Foged, C. (2014). Classification of vaccines. In *Subunit vaccine delivery* (pp. 15-29). New York, NY: Springer New York.

Khalid, K., & Poh, C. L. (2023). The promising potential of reverse vaccinology-based next-generation vaccine development over conventional vaccines against antibiotic-resistant bacteria. *Vaccines*, 11(7), 1264. doi: doi.org/10.3390/vaccines11071264

Khan, T., Abdullah, M., Toor, T. F., Almajhdi, F. N., Suleman, M., Iqbal, A., Ali L., Khan A., Waheed Y. & Wei, D. Q. (2022a). Evaluation of the Whole Proteome of *Achromobacter xylooxidans* to Identify Vaccine Targets for mRNA and Peptides-Based Vaccine Designing Against the Emerging Respiratory and Lung Cancer-Causing Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 8, 825876. doi: 10.3389/fmed.2021.825876

Khan, K., Jalal, K., Khan, A., Al-Harrasi, A., & Uddin, R. (2022b). Comparative Metabolic Pathways Analysis and Subtractive Genomics Profiling to Prioritize Potential Drug Targets Against *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 796363. doi: 10.3389/fmicb.2021.796363

Lin, X., Li, X., & Lin, X. (2020). A review on applications of computational methods in drug screening and design. *Molecules*, 25(6), 1375. doi: 10.3390/molecules25061375

Lu G., Shan S., Zainab B., Ayaz Z., He J., Xie Z., Rashid U., Zhang D., & Mehmood Abbasi A. (2021) Novel vaccine design based on genomics data analysis: A review. *Scandinavian journal of immunology*, 93(3), e12986. doi: 10.1111/sji.12986

Martínez-Carranza, E., Barajas, H., Alcaraz, L. D., Servín-González, L., Ponce-Soto, G. Y., & Soberón-Chávez, G. (2018). Variability of bacterial essential genes among closely related bacteria: The case of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1059. doi: 10.3389/fmicb.2018.01059

Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157. doi: 10.2174/157340911795677602

Monterrubio-López, G. P., & Gutiérrez, K. D. (2021). Vacunología reversa: estrategia contra patógenos emergentes. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 59(3), 233-241.

Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Molecular modeling of*

proteins, 365382. doi:10.1007/978-159745-177-2\_19

Nandy, A., & Basak, S. C. (2019). Bioinformatics in design of antiviral vaccines. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 280. doi: 10.1016/B978-0-12-8012383.108785

Oyston, P.C.F. (2015) Vaccines. In: *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, 2015. (pp. 627-634). doi: 10.1016/B978-0-12397169-2.00035-4

Quiroz-Castañeda, R. E. (2018). Pathogenomics and molecular advances in pathogen identification. In *Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen73695

Raoufi, E., Hemmati, M., Eftekhari, S., Khaksaran, K., Mahmodi, Z., Farajollahi, M. M., & Mohsenzadegan, M. (2020). Epitope prediction by novel immunoinformatics approach: a state-of-the-art review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1155-1163. doi: 10.1007/s10989-019-09918-z

Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, 3(5), 445-450. doi: 10.1016/S13695274(00)001193

Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*, 19(17-19), 2688-2691. doi: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)005545](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)005545)

Rappuoli, R., Pizza, M., Masignani, V., & Vadivelu, K. (2018). Meningococcal B vaccine (4CMenB): the journey from research to real world experience. *Expert Review of Vaccines*, 17(12), 1111-1121. doi: 10.1080/14760584.2018.1547637

Ras-Carmona, A., Lehmann, A. A., Lehmann, P. V., & Reche, P. A. (2022). Prediction of B cell epitopes in proteins using a novel sequence similarity-based method. *Scientific Reports*, 12(1), 13739. doi:10.1038/s41598-022-18021-1

Riedel, S. (2005, January). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. In *Baylor University medical center proceedings* (Vol. 18, No. 1, pp. 21-25). Taylor & Francis. doi: 10.1080/08998280.2005.11928028

Rodrigues, C. M., & Plotkin, S. A. (2020). Impact of vaccines; health, economic and social perspectives. *Frontiers in microbiology*, 11, 1526. doi: 10.3389/fmicb.2020.01526

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen Publishing.

Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. *Journal of immunology research*, 2017. doi:10.1155/2017/2680160

Serruto, D., Bottomley, M. J., Ram, S., Giuliani, M. M., & Rappuoli, R. (2012). The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, 30, B87-B97. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.033

Sette, A., & Rappuoli, R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*, 33(4), 530-541. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.017

Shi, D., Mi, G., Wang, M., & Webster, T. J. (2019). In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. *Biomaterials*, 198, 228-249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.017>

org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.030

Stauffer, F., El-Bacha, T., & Da Poian, A. T. (2006). Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1(3), 291-296. doi: 10.2174/157489106778777673

The Lancet (2022). Pasteur's legacy in 21st century medicine. *Lancet* (London, England), 400(10369), 2157. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02573-9

Tselis, A. C. (2014). Neurologic Complications of Vaccination. In: AMINOFF, M.J.; JOSEPHSON, S.A. *Aminoff's Neurology and General Medicine*. Academic Press (pp. 969-983).

Tsolakos, N., Brookes, C., Taylor, S., Gorringer, A., Tang, C. M., Feavers, I. M., & Wheeler, J. X. (2014). Identification of vaccine antigens using integrated proteomic analyses of surface immunogens from serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Journal of proteomics*, 101, 63-76. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.013

Ullah, A., Shahid, F. A., Haq, M. U., Tahir ul Qamar, M., Irfan, M., Shaker, B., Ahmad S., Alrumaihi F., Allemailem K. S. & Almatroudi, A. (2023). An integrative reverse vaccinology, immunoinformatic, docking and simulation approaches towards designing of multi-epitopes based vaccine against monkeypox virus. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(16), 7821-7834. doi: 10.1080/07391102.2022.2125441

Tettelin H., Saunders N. J., Heidelberg J., Jeffries A. C. , Nelson K. E., Eisen J. A., Ketchum K. A., Hood D. W., Peden J. F., Dodson R. J., Nelson W. C., Gwinn M. L., DeBoy R., Peterson J. D., Hickey E. K., Haft D. H., Salzberg S. L., White O., Fleischmann R. D., Dougherty B. A., Mason T., Ciecko A., Parksey D. S., Blair E., Citti H., Clark E. B., Cotton M. D., Utterback T. R., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Massignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H. O., Fraser C. M., Moxon E. R., Rappuoli R., & Venter J. C. (2000). Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 287(5459), 1809–1815. doi: 10.1126/science.287.5459.1809

Van Regenmortel, M. H. V. (2008). Antigenicity and immunogenicity of viral proteins. *Encyclopedia of Virology*. doi: 10.1016/B978-012374410-4.005835

Van Riel, D., & de Wit, E. (2020). Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature materials*, 19(8), 810-812. doi: 10.1038/s41563-020-0746-0

World Health Organization. (1980). *The global eradication of smallpox: final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication*, Geneva, December 1979. World Health Organization.

World Health Organization. (2012). *Global report for research on infectious diseases of poverty 2012*.

Yurina, V., & Adianingsih, O. R. (2022). Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 10, 25151355221100218. doi: 10.1177/25151355221100218

## Índice Remissivo

- Adenovírus, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18  
Aerossol, 16, 17  
Alamar Blue, 59, 62, 64  
Antibacterianas, 68  
Antifúngicas, 68  
Anti-inflamatórias, 68  
Antineoplásicas, 68  
Antioxidantes, 49, 68, 71  
*Ascaris lumbricoides*, 31  
Astrovírus, 10, 11, 14, 17  
Bacteriófago, 13  
Bacteriófagos, 4, 7, 12, 13, 14, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92  
Bioherbicidas, 7, 44, 46, 47, 49, 50, 51  
Biomateriais, 56  
Biorrefinarias, 74  
*Brettanomyces clausenii*, 69  
Carotenóides, 70, 71, 74  
Citotoxicidade, 7, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 68, 75, 76  
*Cryptococcus antarcticus*, 70  
*Cryptococcus laurentii*, 70  
*Cryptosporidium*, 31, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 43  
Cultivo sustentáveis, 46  
Culturas de células, 57, 75  
*Debaryomyces hansenii*, 70  
Docking, 106, 107, 108, 110, 112  
*Entamoeba histolytica*, 31  
Enzimas, 46, 49, 68, 69, 88, 89  
*Erythrobasidium*, 69  
*Escherichia coli*, 26, 34, 69, 87, 88, 92, 93, 94, 110  
*Exophiala xenobiotica*, 70  
*Fusarium* sp., 48  
Gastroenterite aguda, 10  
*Giardia lamblia*, 31  
Gram-negativas, 91  
Gram-positivas, 91  
Helmintos e protozoários, 31, 33, 36  
Hepatite A, 14  
Hepatite E, 14, 15  
*Klebsiella pneumoniae*, 87, 90  
Lactato desidrogenase, 60, 75  
*Leucosporidium scottii*, 70  
Leveduras, 5, 7, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 81  
Linfócitos, 106  
*Listeria monocytogenes*, 89  
Microplásticos, 10, 13, 15, 18, 19  
Mitigação, 10, 18, 19, 31, 56, 93  
Moluscos bivalves, 12  
MTS, 58, 62, 63  
MTT, 57, 58, 62, 63, 64, 75, 80, 82  
Norovírus humano, 10, 11  
*Phoma dimorfa*, 48  
*Pichia kudriavzevii*, 69, 76  
*Pichia pastoris*, 74, 77  
Plastisferas, 13  
*Pseudomonas aeruginosa*, 51, 69, 90  
Qualidade da água, 10, 34, 86, 87  
Resistência antimicrobna, 87, 91, 93, 94  
*Rhizopus stolonifer*, 48  
*Rhodotorula glutinis*, 70, 71, 74, 80  
*Rhodotorula laryngis*, 70  
*Rhodotorula mucilaginosa*, 70, 78, 79  
Rotavírus, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18  
*Saccharomyces cerevisiae*, 70, 73, 80  
Sapovírus, 14  
SARS-CoV-2, 102, 108, 112  
Saúde Única, 2, 4, 6, 50, 87, 91, 93  
*Schistosoma mansoni*, 31  
*Sporobolomyces salmonicolor*, 70  
*Staphylococcus aureus*, 69, 89, 90, 92, 95, 96, 98  
Sulforrodamina B, 58, 59, 62  
*Taenia*, 31, 33, 36  
Toxicidade, 50, 57, 58, 59, 62, 75  
Tremellales, 69  
*Trichoderma* sp., 48  
*Trichuris trichiura*, 31  
Unidade formadora de placa, 12  
Vacinas, 101  
Vacinologia reversa, 6, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107  
Vermelho Neutro, 59  
Vírus entéricos, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18  
Vírus envelopados, 17  
*Xanthomonas campestris*, 89  
*Yarrowia lipolytica*, 70, 74, 83





**GS4**  
**EDITORIA**

EXPERTISE EM PUBLICAÇÃO