UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HUGO MASSAMI ENDO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUEZAL

PONTA GROSSA
2025

HUGO MASSAMI ENDO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUEZAL

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi
Co-orientadora: Dra. Zelinda Schemczssen-Graeff

PONTA GROSSA

2025

Endo, Hugo Massami
E56 Bioprospecção de bactérias isoladas do manguezal / Hugo Massami Endo. Ponta Grossa, 2025.
72 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.
Coorientadora: Profa. Dra. Zelinda Schemczssen-Graeff.

1. Biorremediação. 2. Biocontrole. 3. Metabólitos bioativos. I. Pileggi, Marcos. II. Schemczssen-Graeff, Zelinda. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 660.6

Ficha catalográfica elaborada por Vera Lucia Braga da Silva- CRB9/1026

HUGO MASSAMI ENDO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DE MANGUEZAL

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado e Doutorado, Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 09 de setembro de 2025.

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCOS PILEGGI
Data: 06/11/2025 10:30:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Marcos Pileggi – UEPG
Presidente

gov.br Documento assinado digitalmente
JULIANA INABA
Data: 06/11/2025 10:21:00-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Juliana Inaba – UEPG
Membro titular interno

gov.br Documento assinado digitalmente
LUIZ RICARDO OLCHANHESKI
Data: 06/11/2025 09:05:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski – UEM
Membro titular externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - PPGCF
Bloco M Sala 93 B – Campus Universitário em Uvaranas – Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Cleusa e Paulo, pelo incentivo e o apoio incondicional e por sempre acreditarem em meu potencial, mesmo nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao Rafael por estar presente me ajudar de todas as formais possíveis, além de me dar uma família, trazendo alegria à minha vida com nossa família de quatro gatos: Tofu, Kingo, Pinhão e Mini, que tornaram os momentos de estudo mais leves e felizes.

Agradeço aos meus amigos Kaique e Vanessa pelo apoio, companhia e incentivo ao longo de toda a realização desta pesquisa.

Agradeço ao PPGCF pela disponibilização do curso.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de aproveitamento, código 001, que tornou possível a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Pileggi pelos ensinamentos, pelo apoio contínuo e pelo compromisso em me auxiliar no desenvolvimento científico e no aprimoramento da escrita acadêmica.

À minha coorientadora Dra. Zelinda Schemczssen-Graeff pela valiosa orientação e assistência nos experimentos com células tumorais, fundamentais para o avanço deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Giovani por permitir a realização dos ensaios antitumorais em seu laboratório e pelo fornecimento do material necessário.

Aos amigos de laboratório Brenda, Gabriel e Bárbara pelo apoio nos experimentos.

À Maria Janine Diniz por toda ajuda e empenho na realização da pesquisa.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente com esta pesquisa, minha mais sincera gratidão!

RESUMO

As bactérias isoladas de manguezais demonstram elevado potencial biotecnológico, evidenciado pela literatura, destacando-se em áreas como biorremediação, biocontrole de microrganismos oportunistas e atividade antitumoral. A diversidade microbiana e as condições seletivas dos manguezais, incluindo variações de salinidade, presença de contaminantes e intensa competição microbiana, promovem adaptações específicas que tornam esses microrganismos promissores como fontes de compostos bioativos e mecanismos de interesse biotecnológico. Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de isolados bacterianos de manguezal, com ênfase em processos de biorremediação, biocontrole e atividade antitumoral, cujos principais resultados estão descritos a seguir. Em relação a biorremediação, os isolados 2.3.A, 3.2.B e M.H.2 foram capazes de crescer em meio mineral contendo glifosato como única fonte de carbono, indicando a presença de vias metabólicas alternativas e respostas adaptativas. Os ensaios de antagonismo revelaram atividade antimicrobiana contra o fitopatógeno agrícola *Ralstonia* sp., e bactérias associadas a infecções hospitalares, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sugerindo a capacidade dos isolados de secretar compostos antibacterianos, incluindo peptídeos antimicrobianos, enzimas líticas e moléculas voláteis. Quanto à atividade antitumoral, os extratos de quatro isolados bacterianos reduziram significativamente a viabilidade das linhagens de carcinoma pulmonar A549 e adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, bem como a migração celular de A549. Esses efeitos sugerem a presença de proteínas ou compostos secundários bioativos capazes de interferir na sobrevivência, metabolismo e motilidade das células tumorais. Em conjunto, os resultados demonstram que as bactérias de manguezal não apenas possuem potencial de degradação de herbicidas e atuar como agentes de controle biológico, mas também para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Estudos futuros envolvendo análise genômica, proteômica e química dos extratos permitirão identificar os genes, vias metabólicas e moléculas responsáveis por essas atividades, ampliando o conhecimento sobre a bioprospecção de microrganismos de ambientes manguezais.

Palavras-chave: Biorremediação, biocontrole, metabólitos bioativos.

ABSTRACT

Mangrove-derived bacteria exhibit remarkable biotechnological potential, as evidenced in the literature, particularly in areas such as bioremediation, biocontrol of opportunistic microorganisms, and antitumor activity. The microbial diversity and selective pressures of mangrove ecosystems, including fluctuations in salinity, the presence of contaminants, and intense microbial competition, drive specific adaptations that render these microorganisms promising sources of bioactive compounds and mechanisms of biotechnological interest. Within this context, the present study aimed to evaluate the biotechnological potential of bacterial isolates from mangrove environments, with emphasis on processes of bioremediation, biocontrol, and antitumor activity, whose main results are summarized below. Regarding bioremediation, isolates 2.3.A, 3.2.B, and M.H.2 were able to grow in mineral medium containing glyphosate as the sole carbon source, indicating the presence of alternative metabolic pathways and adaptive responses. Antagonism assays revealed antimicrobial activity against the agricultural phytopathogen *Ralstonia* sp. and against bacteria associated with nosocomial infections, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, suggesting the ability of these isolates to secrete antibacterial compounds, including antimicrobial peptides, lytic enzymes, and volatile molecules. With respect to antitumor activity, extract by four bacterial isolates significantly reduced the viability of A549 lung carcinoma and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cell lines, as well as A549 cell migration. These effects suggest the presence of proteins or secondary bioactive compounds capable of interfering with tumor cell survival, metabolism, and motility. Taken together, the results demonstrate that mangrove-derived bacteria not only possess the potential to degrade herbicides and act as biological control agents but also hold promise for the development of novel antitumor agents. Future studies involving genomic, proteomic, and chemical analyses of the extracts will enable the identification of the genes, metabolic pathways, and molecules responsible for these activities, thereby advancing knowledge on the bioprospecting of microorganisms from mangrove ecosystems.

Keywords: Bioremediation, biocontrol, bioactive metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenvolvimento de tumor benigno. 25
Figura 2 – Estágios de desenvolvimento tumoral e metástase. 26
Figura 3 – Preparo das suspensões bacterianas R, A, B, C e D. 40
Figura 4 – Inoculação das bactérias do manguezal em discos de papel filtro e placas. 41
Figura 5 – Ensaio de Antagonismo. 42
Figura 6 – Inoculação das placas. 42
Figura 7 – Captura de imagem dos resultados. 44
Figura 8 – Resultado do ensaio comparativo de crescimento bacteriano em glifosato e glicose. 45
Figura 9 – Ensaio de antagonismo com fitopatógeno. 49
Figura 10 – Resultado de antagonismo contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. 51
Figura 11 – Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem A549 e MDA-MB-231. 62
Figura 12 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 2.3.A nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL. 66
Figura 13 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.A nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL. 66
Figura 14 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.B nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL. 67
Figura 15 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.B nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL. 67
Quadro 1 – Genes e enzimas microbianas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos. 16
Quadro 2 – Genes e mecanismos de resistência bacteriana a metais pesados. 18
Quadro 3 – Genes envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos. 24
Quadro 4 – Mecanismos envolvidos na biodegradação de herbicidas por bactérias. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de raio e diâmetro do halo formado no antagonismo (em mm). 49
Tabela 2 – Valores do raio e do diâmetro do halo formado no teste de antagonismo (em cm). 52
Tabela 3 – Tratamentos do ensaio de viabilidade e proliferação celular. Volume por poço equivale a 200 µL. 59
Tabela 4 – Tratamentos do ensaio de migração celular. Volume por poço equivale a 200 µL. 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4 DTBP	2,4-di-terc-butilfenol
A549	Carcinoma pulmonar humano
ANOVA	Análise de variância
BDDB	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil biciclo[4.3.0]nonano e 3-benzil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo[4.3.0]nonano
BHI	Meio sólido Brain Heart Infusion
COV	Compostos orgânicos voláteis
Ca Ski	Carcinoma cervical humano
CC	Catabolismo de carbono
DEHP	Di-(2-etilhexil) ftalato
DMEM	Dullbeco Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
ESKAPE	*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.
Fe(III)	Óxidos de ferro
FDF	Fosfoenolpiruvato-dependente de fosfotransferase
Fig.	Figura
Haloxyfop	Haloxyfop-R-metil
HeLa	Carcinoma cervical humano
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IARC	International Agency for Research on Cancer
LA	Meio de cultura sólido Lúria Bertani
LB	Caldo Lúria Bertani
M9GLIF	Meio de cultura mineral M9 sólido com glifosato comercial
M9GLIC	Meio de cultura mineral M9 sólido com glicose

MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário
MH	Meio sólido Mueller-Hinton
mehpH	Mono-ftalato alquilado
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NAP	Proteína associada ao nucleoide
NO_3^-	Nitrato
O_2	Oxigênio
Pb^{2+}	Íons chumbo
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Qua.	Quadro
RCC	Repressão do catabolismo de carbono
SARM	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
sRNAs	RNAs regulatórios bacterianos
SO_4^{2-}	Sulfato
SW480	Células de câncer de cólon
Tab.	Tabela
VC	Viabilidade celular

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DE MANGUEZAL: AVANÇOS, PERSPECTIVAS E APLICAÇÕES 12

1.1 INTRODUÇÃO 12
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
1.2.1 Biorremediação 14
1.2.1.1 Derivados do petróleo 15
1.2.1.2 Metais pesados 17
1.2.1.3 Herbicidas 20
1.2.1.4 Outros poluentes 20
1.2.2 Biocontrole 22
1.2.2.1 Fitopatógenos 22
1.2.2.2 Bactérias multirresistentes a antibióticos 23
1.2.3 Potencial Antitumoral 25
1.2.4 Desafios e Avanços na Literatura 28
REFERÊNCIAS 31

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DE MANGUEZAL COM ÊNFASE EM BIORREMEDIAÇÃO E BIOCONTROLE 37

2.1 RESUMO 37
2.2 INTRODUÇÃO 37
2.3 MATERIAL E MÉTODOS 38
2.3.1 Coleta e Isolamento Bacteriano 38
2.3.2 Meios de Cultura e Condições de Crescimento 38
2.3.3 Análises Físico-Químicas do Solo 39
2.3.4 Ensaio Comparativo de Crescimento Bacteriano em Glifosato e Glicose 39
2.3.5 Ensaio de Antagonismo Contra Fitopatógenos 40
2.3.6 Ensaio de Antagonismo Contra Bactérias Resistentes a Antibióticos 43
2.3.7 Captura de Imagem 43
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
2.4.1 Características Físico-Químicas do Manguezal 44
2.4.2 Seleção de Isolados em Meios de Cultura Contendo Glifosato como Única Fonte de Carbono 45
2.4.2.1 Glicose como fonte de carbono 46

2.4.2.2 Glifosato como fonte de carbono 46
2.4.3 Antagonismo de Isolados de Manguezal Contra o Fitopatógeno *Ralstonia* sp. 48
2.4.4 Antagonismo de Isolados Bacterianos de Manguezal Contra Bactérias Modelos Resistentes a Antibióticos 50
2.5 CONCLUSÕES 53
REFERÊNCIAS 54
CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTITUMORAL DE BACTÉRIAS DO MANGUEZAL 56
3.1 RESUMO 56
3.2 INTRODUÇÃO 56
3.3 MATERIAL E MÉTODOS 58
3.3.1 Coleta e Isolamento Bacteriano 58
3.3.2 Cultivo das Linhagens Tumorais 58
3.3.3 Preparo do Extrato dos Isolados do Manguezal 58
3.3.4 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular 59
3.3.5 Cristal Violeta 59
3.3.6 Ensaio de Migração Celular (*Scratch Assay*) 60
3.3.7 Análise Estatística 61
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
3.4.1 Redução da viabilidade celular dos extratos de bactérias de manguezal 61
3.4.2 Redução da migração celular induzida pelos extratos de bactérias do manguezal 65
3.5 CONCLUSÕES 67
REFERÊNCIAS 68
ANEXO A: COMPOSIÇÃO DE MEIO DULLBECO MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM) ALTA GLICOSE 70
ANEXO B: ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ENSAIO DE MTT NAS LINHAGENS TUMORAIS A549 E MDA-MB-231 71
ANEXO C: ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA NAS LINHAGENS TUMORAIS A549 E MDA-MB-231 72

CAPÍTULO 1: BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DE MANGUEZAL: AVANÇOS, PERSPECTIVAS E APLICAÇÕES

1.1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são regiões úmidas com alta produtividade de matéria orgânica encontradas em regiões tropicais e subtropicais. O Brasil abriga em torno de 8,5% da área global dos manguezais, com extensas florestas de mangue na costa norte da região tropical, enquanto na costa sul subtropical a distribuição é mais dispersa e é geralmente limitada por deltas de rios, lagoas costeiras e baías internas. O solo é composto pela combinação de matéria orgânica espessa e sedimentos, formando a base para os organismos que vivem nele. A disponibilidade de nutrientes é altamente variável, de acordo com a região, sendo que, em áreas costeiras, a disponibilidade é extremamente baixa, já em áreas com alto acúmulo de lama, é muito alta (Ceccon *et al.*, 2019).

Dentre os organismos encontrados no manguezal, há uma variedade de microrganismos que habitam este ambiente, como bactérias, arqueias, fungos, fitoplâncton e protozoários (Palit *et al.*, 2022). Os organismos presentes no manguezal necessitam lidar com os gradientes extremos de salinidade influenciados por chuvas sazonais, condições de maré e fluxo de água doce. Além disso, comunidade das bactérias de manguezal é altamente influenciada pela presença de espécies de plantas (Marcos *et al.*, 2018).

Estes microrganismos apresentam um papel crucial no ecossistema dos manguezais, como a modulação estrutural do solo, e estão envolvidos em ciclos de nutrientes, como o de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Alguns exemplos de atividades relacionadas a esses ciclos são: a degradação de celulose e da serapilheira vegetal, a remoção de dióxido de carbono do ambiente, a oxidação do enxofre e a fixação de nitrogênio (Palit *et al.*, 2022).

Entre esses organismos, as bactérias têm despertado interesse crescente devido ao seu potencial biotecnológico (Soni *et al.*, 2025). Bactérias isoladas de manguezal demonstraram ser capazes de degradar herbicidas (Soni *et al.*, 2025) e derivados do petróleo, como o diesel (Saha; Sen, 2024), além de inibir o crescimento de fitopatógenos (Pereira *et al.*, 2023) e bactérias resistentes a antibióticos (Sermkaew *et al.*, 2024b). Com isso, bactérias isoladas de manguezal apresentam um grande potencial para uso como biorremediação de poluentes e biocontrole de agentes na agricultura e saúde humana.

Apesar do potencial biotecnológico reconhecido, muitos estudos sobre bioprospecção bacteriana ainda se concentram em ambientes terrestres ou marinhos mais acessíveis (Ayilara; Adeleke; Babalola, 2023), enquanto os manguezais permanecem relativamente pouco explorados. Além disso, embora estudos como o de Soni *et al.* (2025) tenham reunido evidências sobre a eficácia das bactérias isoladas de manguezal em diferentes aplicações biotecnológicas, estes trabalhos se limitam em compilar os efeitos relatados, sem avançar na discussão sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos nas atividades descritas.

A hipótese deste trabalho é que o potencial biotecnológico das bactérias de manguezal esteja relacionado a alta seletividade recorrente das características físico-químicas do ambiente, particularmente em regiões com histórico de atividade antropogênica. Desta forma, organismos provenientes do manguezal tendem a ser mais investigados quanto a capacidade de degradar derivados do petróleo, enquanto estudos sobre biorremediação de herbicidas e o biocontrole de fitopatógenos concentram-se a microrganismos isolados de solos expostos diretamente a esses agentes.

Diante disso, este trabalho reúne e analisa dados disponíveis sobre bioprospecção de bactérias isoladas de manguezal com ênfase nos compostos bioativos produzidos. Além de mapear os efeitos datados pela literatura, buscou-se as principais lacunas no entendimento sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos e nas áreas pouco exploradas, como atividade antitumoral. O presente estudo visa o avanço no conhecimento sobre a microbiota de manguezal e contribuir para novas estratégias de bioprospecção com foco no desenvolvimento de soluções biotecnológicas sustentáveis e menos agressivas à saúde humana.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os manguezais são regiões úmidas com alta produtividade encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Ceccon *et al.*, 2019). As variáveis biofísicas dos manguezais, como área foliar, altura das árvores, estoque de carbono e biomassa, são decorrentes de condições climáticas, enquanto o nível do mar influencia na estrutura e distribuição espacial desse ecossistema (Tran; Reef; Zhu, 2022).

Há um grande interesse na conservação de manguezais devido sua propriedade de proteger o ambiente costeiro de eventos naturais como inundações e tempestades, além de amortecer variações de salinidade, reduzir a erosão e promover a biodiversidade (Akram *et al.*, 2023). Apesar de grande parte dos usos e benefícios dos manguezais não serem

comercializáveis, a pesca e a extração de madeira são atividades comuns realizadas pelas comunidades presentes na região (Afonso *et al.*, 2022).

O solo dos manguezais é composto pela combinação de matéria orgânica espessa e sedimentos, formando a base para os organismos que vivem nele. A disponibilidade de nutrientes é altamente variável (Ceccon *et al.*, 2019), assim como as concentrações de oxigênio no solo e influxo de água salina, resultando em um ambiente ecológico dinâmico (Akram *et al.*, 2023). Em áreas costeiras a disponibilidade de nutrientes é extremamente baixa, já em áreas com alto acúmulo de lama é muito alta (Ceccon *et al.*, 2019).

Os manguezais apresentam fauna e flora taxonomicamente diversos distribuídos em habitats terrestres e marinhos (Primavera *et al.*, 2019). A copa dos manguezais abriga animais como macacos, aves, lagartos e cobras, e oferecem sombra e cobertura para animais aquáticos como anfíbios e répteis. A flora residente em troncos do mangue inclui orquídeas, samambaias e trepadeiras, que servem de habitat para aranhas e insetos. As raízes do mangue são povoadas por moluscos, artrópodes, vermes, águas-vivas e peixes. Os manguezais abrigam uma comunidade de microalgas epibiontes em raízes aéreas e troncos e, em conjunto com a floresta de mangue auxiliam na manutenção e estrutura do ecossistema (Akram *et al.*, 2023).

Um estudo sobre o microbioma do manguezal na Baía de Paranaguá constatou que 95,3% da amostra de RNA encontrada em sedimentos do manguezal é pertencente à bactérias, 1,7% à arquéias e não foi possível de estabelecer 2,9% das sequências em um grupo específico. Os filos de bactérias mais prevalentes foram Pseudomonadota (53,5 ± 4,2%), Bacteroidetes (9,6 ± 2,4%), Cyanobacteria (5,5 ± 2,8%), Chloroflexi (3,8 ± 1,3%), Acidobacteria (3,7 ± 1,2%) e Planctomycetes (3,6 ± 1,2%). Os gêneros mais abundantes (10%) foram Chromatiales não atribuídas (5,1 ± 1,8%), Desulfococcus (4,7 ± 2,1%) e Piscirickettsiaceae não atribuídas (4,3 ± 2,2%) (Ceccon *et al.*, 2019).

Essa elevada diversidade microbiana não apenas sustenta a dinâmica ecológica dos manguezais, mas também fornece uma base funcional para a degradação de poluentes e compostos xenobióticos. Nesse sentido, compreender o papel desses microrganismos é essencial para avaliar seu potencial em processos de biorremediação.

1.2.1 Biorremediação

A atividade humana, impulsionada por setores como a agroindústria, produção de plásticos e exploração do petróleo, desempenham um papel central no desenvolvimento

econômico e no fornecimento de bens essenciais para a sociedade. No entanto, essas atividades podem estar associadas com a emissão de poluentes, como resíduos químicos e microplásticos que comprometem a qualidade do ar, da água e do solo, podendo apresentar riscos à biodiversidade e à saúde humana (Birania *et al.*, 2022).

A bioprospecção, por definição, é a busca por genes, recursos naturais e organismos com potencial de desenvolvimento de produtos por métodos biofísicos, bioquímicos e genéticos, buscando conciliar a exploração desses recursos com a conservação ambiental (Sonia *et al.*, 2025). A biorremediação utiliza sistemas biológicos para tratar a poluição de forma eficiente, com baixo custo e sem gerar subprodutos poluentes. As bactérias se destacaram na atividade de biorremediação pela sua natureza versátil e adaptativa (Sevak; Pushkar; Kapadne, 2021).

1.2.1.1 Derivados do petróleo

Devido à grande demanda mundial de petróleo e a redução de reservas em terra, houve um aumento na exploração de fontes de petróleo marítimo. Desta forma, ocorreu uma evolução de tecnologias envolvidas no transporte, como o desenvolvimento de superpetroleiros e oleodutos cruzando os oceanos. A produção e o transporte de petróleo ameaçam o ecossistema por meio de derramamentos em grande escala, associados a impactos ambientais, sociais e financeiros, e efeitos de longo prazo. Esses derramamentos ocorrem após liberações naturais, transporte e perfuração de petróleo, além de colisões acidentais ou naufrágio de petroleiros. Pequenos derramamentos são mais fáceis de controlar e de forma eficaz, porém ocorrem diariamente, tornando-se uma preocupação ambiental (Keramea *et al.*, 2021). Entre os diferentes compostos presentes no petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm recebido destaque em razão de sua elevada toxicidade, incluindo potenciais efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (Tiralerdpanich *et al.*, 2021).

A biorremediação de HPAs por bactérias ocorre por meio de processos metabólicos aeróbios e anaeróbios, que utilizam diferentes aceptores de elétrons, como oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro (Fe(III)) e sulfato (SO_4^{2-}), cuja disponibilidade varia de acordo com a profundidade e as condições redox do sedimento de manguezal. Em ambientes com valores positivos de potencial redox, predominam rotas aeróbias e facultativas, nas quais o O_2 e o NO_3^- são os principais aceptores, já em valores negativos, predominam processos anaeróbios, utilizando SO_4^{2-}, CO_2 e óxidos metálicos como aceptores (De Almeida *et al.*, 2021).

Microrganismos capazes de degradar HPAs que possuem genes associados a degradação de hidrocarbonetos, como o *alkB* e o *ndo*, comumente encontrados em bactérias que atuam sob condições aeróbias, como bactérias dos filos Pseudomonadota, Firmicutes e Bacteroidetes isoladas do manguezal de Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. A abundância desses genes varia de acordo com a profundidade do sedimento. Nas camadas superficiais (1-10 cm), a degradação tende a ser mais eficiente devido a maior disponibilidade de O_2 para os microrganismos portadores destes genes, que favorece o crescimento e a atividade de microrganismos portadores desses genes. Já nas camadas mais profundas (25–35 cm), observa-se uma maior diversidade de genes relacionados à degradação de hidrocarbonetos, contudo, genes típicos de condições anaeróbias, como *assA* e *bssA*, não foram detectados (Qua. 1) (Machado *et al.*, 2019).

Quadro 1 – Genes e enzimas microbianas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos.

Condição	Gene	Proteína/Enzima	Função
Aeróbia	*alkB*	Alcano monooxigenase	Degradação de alcanos
	ndo	Naftaleno dioxigenase	Degradação de HPAs
Anaeróbica	*assA*	Alquilsuccinato sintase A	Degradação de alcanos
	bssA	Benzilsuccinato sintase A	Degradação de HPAs

Fonte: Machado *et al.*, 2019.

Outros fatores podem afetar a biorremediação de derivados de petróleo, como condições ambientais, características da comunidade bacteriana e propriedades do hidrocarboneto. As bactérias degradadoras de petróleo atuam melhor entre 30-40 °C em pH 7-8. A disponibilidade de água é importante para o metabolismo bacteriano, sendo que solos com baixa umidade apresentam aumento na salinidade, o que reduz a diversidade e atividade microbiana. A biodegradabilidade dos hidrocarbonetos é determinada por suas propriedades físicas e químicas, como viscosidade, peso molecular, estrutura e complexidade, sendo que moléculas menores e menos complexas são degradadas mais rapidamente. Além disso, a concentração de hidrocarbonetos pode afetar a taxa de degradação, pois níveis muito elevados ou muito baixos podem diminuir a eficiência devido à toxicidade ou à limitação de carbono disponível (Siddique *et al.*, 2024).

Bactérias Gram-negativas isoladas de manguezal do Canal Sahakorn em Bangkhuntien, Bangkok, Tailândia, pertencentes ao filo Pseudomonadota, Chloroflexi e Epsilonbacteraeota,

desempenham papel central na degradação de fenantreno, um tipo de HPA. O marcador funcional GN PAH-RHDα foi utilizado para indicar a presença de genes que codificam a anel-hidroxilase (subunidade α), uma enzima essencial para a degradação inicial de fenantreno. A área de coleta de amostras é impactada por contaminação crônica por hidrocarbonetos, já que é localizada nas proximidades de um posto de petróleo para transporte aquaviário, o que sugere que a persistente exposição a contaminantes pode ter contribuído para a seleção e manutenção de genes catabólicos associados à degradação de HPAs (Tiralerdpanich *et al.*, 2021).

Além de Pseudomonadota, bactérias dos filos Actinobacteria e Acidobacteria, e gêneros como *Woeseia*, *Haliangium*, SBR1031 e A4b, isolados de manguezal da Grande Baía do sul da China, desempenham papéis-chave na degradação de HPAs, especialmente em áreas de escoamento fluvial. Além disso, a presença de genes funcionais como *pcaH/G* e salicilato hidroxilase indicou o potencial metabólico para degradação de HPAs, mostrando que solos com atividade agrícola promovem maior atividade biológica em comparação a solos distantes dessa região (Wu *et al.*, 2022).

Outra abordagem que as bactérias de manguezal com potencial de degradação de derivados de petróleo é sua aplicação agrícola. A cepa *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962 isolada de manguezal de Bengala Ocidental, Índia, demonstrou capacidade de fixar nitrogênio no solo, solubilização de fosfato, produção de hormônio vegetal do tipo ácido indolacético (AIA) e tolerância e absorção de sal. Além disso, a cepa foi capaz de degradar diesel, principalmente quando este foi a única fonte de carbono disponível. Esses resultados indicam que a *P. aeruginosa* JCM 5962 pode ser desenvolvida como um biofertilizante eficaz para uso em áreas agrícolas da região de manguezal com alta salinidade e contaminação crescente por hidrocarbonetos, especialmente derivados do petróleo (Saha & Sen, 2024).

1.2.1.2 Metais pesados

A contaminação por metais pesados constitui um dos principais problemas ambientais decorrentes da atividade humana, especialmente devido à mineração, uso de pesticidas, despejo industrial e práticas agrícolas intensivas. Esses elementos apresentam elevada persistência no ambiente e podem se acumular na cadeia alimentar, representando riscos significativos para ecossistemas e para a saúde humana (Zhang *et al.*, 2023).

Tradicionalmente, as estratégias empregadas para a remoção de metais pesados incluem processos físico-químicos, como precipitação, troca iônica, adsorção e eletroquímica. Embora

haja uma remoção eficaz dos metais pesados, esses métodos apresentam limitações, como alto custo, baixa seletividade e geração de resíduos secundários, o que restringe sua aplicação prática em larga escala e sua sustentabilidade (Nnaji *et al.*, 2023). Nesse contexto, ambientes contaminados submetidos a estresse químico, como os manguezais, representam um reservatório de microrganismos que desenvolveram mecanismos de tolerância e adaptação à presença de metais pesados (Ur Rahman *et al.*, 2024). A bioprospecção desses microrganismos surge como uma alternativa promissora, oferecendo soluções mais sustentáveis, econômicas e menos agressivas à saúde humana e ao meio ambiente.

Os mecanismos moleculares envolvem genes determinantes para a resistência e/ou teolerância a metais pesados. O operon *ars* apresenta um papel importante na resistência a arsênio em bactérias, assim como o operon *cad* está envolvido na resistência a cádmio, o operon *pbr* ao chumbo, o operon *mer* à mercúrio e o sistema *cop* à resistência ao cobre (Qua. 2) (Das; Ghosh; Banerjee, 2022).

Quadro 2 – Genes e mecanismos de resistência bacteriana a metais pesados.

(continua)

Metal	Gene	Molécula codificada e/ou função
Arsênio	*arsR*	Repressor transcricional responsivo a As(III)
	arsA	ATPase
	arsB	Transportador de efluxo de membrana
	arsC	Arsenato redutase
	arsD	Metalocaperona de arsênio
	arsH	NADPH-flavina mononucleotídeo oxidoredutase
	arsM	Arsenito S-adenosilmetionina metiltransferase
Cadmio	*cadA*	ATPase que bombeia Cd^{2+} para fora da célula
	cadC	Ativa a expressão de *cadA*
	cadB	Funções complementares à resistência
	cadD	
	copB	
	copC	

(conclusão)

Metal	Gene	Molécula codificada e/ou função
Chumbo	*pbrT*	Proteína de captação de íons chumbo (Pb^{2+})
	pbrA	ATPase de efluxo
	pbrB	Proteína integral da membrana
	pbrC	Peptidase sinal
Mercúrio	*merB*	Organomercurial liase
	merC	Redutase de mercúrio
Cobre	*copA*	Proteínas ligadoras de cobre que formam complexos, levando ao acúmulo intracelular e resistência
	copB	
	copC	

Adaptado de Das; Ghosh; Banerjee, 2022.

Embora os termos “tolerância” e “resistência” a metais pesados sejam frequentemente empregados como sinônimos, eles descrevem mecanismos fisiológicos distintos. A tolerância esta associada à capacidade do microrganismo de internalizar e sequestrar íons metálicos, geralmente por meio do transporte ativo da membrana interna para o periplasma, com a participação dos transportadores ABC, ou pela complexação intracelular desses íons. Em contrapartida, a resistência é atribuída por meio do efluxo ativo, nos quais o metal pesado é expulso para o meio extracelular, com destaque para a atuação de ATPases do tipo P e enzimas redutases responsáveis pela desintoxicação celular (Muñoz-García *et al.*, 2022). Dessa forma, embora a resistência proporcione vantagem adaptativa ao microrganismo em ambientes contaminados, ela não contribui diretamente para a biorremediação, uma vez que o metal é apenas removido do interior da célula, permanecendo no ambiente. Em contrapartida, microrganismos tolerantes apresentam maior potencial biotecnológico, pois são capazes de bioabsorver, bioacumular ou transformar quimicamente os metais, efetivamente reduzindo sua concentração e toxicidade no ecossistema.

Alguns estudos mostram a capacidade de bioabsorção de metais pesados, como no caso da cepa *Bacillus aerius* GC6, isolada de manguezal, demonstrou capacidade de tolerância e remoção de uma série de metais, como cobre, cromo e zinco (Surabhi et al., 2025). Em outro estudo, o isolado *Bacillus cereus* 3PE06 demonstrou capacidade de bioabsorção de níquel, cádmio, cobre, zinco e cobalto (Wafha; Gayathri; Baby, 2023). Ambos os estudos sugerem que

essas cepas possuem tolerância a metais pesados e podem ser aplicadas em ambientes contaminados para a remoção eficiente desses metais.

1.2.1.3 Herbicidas

Devido ao crescimento contínuo da população humana em escala global, há uma demanda cada vez maior por comida, pressionando diversos sistemas de produção agrícola. Nesse sentido, produzir mais exige maiores extensões de áreas de cultivo em campo aberto e o uso de fertilizantes químicos (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023). Um dos obstáculos encontrados é o crescimento de plantas oportunistas em conjunto com a plantação, competindo por nutrientes, água e luz solar, o que resulta em redução significativa da produtividade. Para contornar esse problema, o manejo convencional recorre ao uso de herbicidas e outros defensivos agrícolas. Entretanto, essa prática pode apresentar um impacto negativo na biodiversidade e na saúde humana (Kubiak *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, houve a busca de novos mecanismos para remoção desses poluentes e amenizar os danos ao meio ambiente. O Haloxyfop-R-metil (haloxyfop) é um herbicida utilizado para controlar *Spartina alterniflora*, conhecido como capim-marinho, em ecossistemas costeiros úmidos, como manguezais e estuários. Em amostras isoladas de uma área úmida costeira na Ilha de Chongming, em Xangai, China, foi observado que o haloxyfop reduz a diversidade da comunidade bacteriana rizosférica de *S. alterinflora* nos estágios iniciais do tratamento (dias 1, 3 e 7), acompanhado pelo aumento da abundância relativa de gêneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Shewanella*, que possivelmente estão envolvidos na biodegradação do herbicida no solo (Liang *et al.*, 2020). Esses microrganismos são reconhecidos por seu envolvimento em processos de biodegradação de xenobióticos, indicando que a exposição ao herbicida pode selecionar comunidades microbianas com potencial para biorremediação de compostos herbicidas em ambientes costeiros contaminados.

1.2.1.4 Outros poluentes

Além de derivados de petróleo, metais pesados e herbicidas, outros poluentes químicos também representam preocupação ambiental significativa. Algumas bactérias isoladas de manguezal também apresentam a propriedade de biodegradação de poliestireno, como bactérias pertencentes às famílias *Sphingomonadaceae*, *Rhodanobacteraceae*, *Rhizobiaceae*,

Dermacoccaceae, *Rhodocyclaceae*, *Hyphomicrobiaceae* e *Methyloligellaceae*. Além disso, isolados bacterianos dos gêneros *Novosphingobium*, *Gordonia*, *Stappia*, *Mesobacillus*, *Alcanivorax*, *Flexivirga*, *Cytobacillus*, *Thioclava* e *Thalassospira* demonstraram potencial para degradar amostras de poliestireno coletado de manguezal de Zhangzhou, China. A formação de grupos carbonila e éster sugerem a degradação por meio de caminho oxidativo e essa característica é avaliada para a remoção desse poluente plástico do ambiente marinho (Liu *et al.*, 2023).

Klebsiella pneumoniae RY10302, *Enterobacter* sp. RY10402, *Enterobacter* sp. RY11902 e *Enterobacter* sp. RY11903 isolados do manguezal de Phra Chedi Klang Nam na província de Rayong, Tailândia, foram capazes de degradar os corantes C.I. Reactive Red 195, C.I. Reactive Blue 194, C.I. Reactive Blue 19 e C.I. Reactive Black 1. A degradação ocorre por meio da produção de enzimas ligninolíticas, como lignina peroxidase e lacase, que promovem reações oxidativas responsáveis pela descoloração. Essa capacidade de produzir enzimas ligninolíticas ocorre devido à seleção de bactérias adaptadas ao solo rico em lignina encontrado em manguezais e em ecossistemas aquáticos relacionados (Chantarasiri, 2020).

Gordonia hongkongensis RL-LY01 isolado de solo contaminado por di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) no manguezal de Zhanjiang, China, mostrou alta capacidade desse plastificante. A atividade degradativa dessa cepa foi associada à presença do gene de hidrolase de mono-ftalato alquilado (*mehp*H), sugerindo um papel central desse gene no metabolismo do DEHP e indicando o potencial da cepa para aplicações em biorremediação de ambientes contaminados por plastificantes (Ren *et al.*, 2023). A capacidade degradativa da cepa RL-LY01 reflete uma adaptação evolutiva aos ecossistemas de manguezal, onde a pressão seletiva por compostos orgânicos complexos e potencialmente tóxicos pode ter favorecido a manutenção e otimização de genes como mehpH, conferindo à bactéria vantagem adaptativa.

Contaminantes cloroeteno, como tetracloroeteno, tricloroeteno e dicloroetano, são prevalentes em águas subterrâneas devido ao seu uso extensivo na indústria como solventes e desengraxantes. Devido à sua persistência e potencial cancerígeno, esses compostos são classificados como poluentes prioritários, exigindo monitoramento em diversos ambientes. A degradação microbiana via descloração redutiva, amplamente documentada em sistemas anaeróbicos de águas subterrâneas, constitui o principal mecanismo para a remoção desses poluentes, podendo mitigar seu impacto ambiental. Esse processo depende de bactérias que utilizam compostos organohaletos como aceitadores finais de elétrons para produção de energia. *Dehalogenimonas*, *Dehalococcoides*, *Anaeromyxobacter*, *Desulfuromonas*,

Geobacter, *Desulfomonile*, *Desulfovibrio*, *Shewanella* e *Desulfitobacterium* são bactérias respiradoras de organohaleto isoladas de sedimento de manguezal do Mar Vermelho, Arábia Saudita, que são capazes de sintetizar deshalogenases redutivas direcionadas a teracloroeteno e 3-cloro-4-hidroxifenilacetato, demonstrando potencial metabólico para biorremediação intrínseca de organohaletos através de vias de descloração redutiva (Alsharif *et al.*, 2024).

1.2.2 Biocontrole

Um obstáculo para a saúde humana e para a indústria agrícola é a presença de microrganismos oportunistas e patogênicos que, ao encontrar condições favoráveis, podem causar infecções, comprometendo a saúde do hospedeiro. O controle desses microrganismos tem sido realizado por meio de antibióticos, antifúngicos e pesticidas químicos (no caso da agricultura) que, apesar de eficazes a curto prazo, são limitados devido ao impacto ambiental e crescente resistência bacteriana a esses produtos. Desta forma, há uma demanda crescente por estratégias de controle de microrganismos oportunistas que sejam eficientes e apresentem menor impacto ambiental (Huemer *et al.*, 2020; Wend *et al.*, 2024).

O biocontrole, uma outra forma que pode ser bioprospectada em ambientes seletivos, explora agentes vivos (incluindo vírus) para combater organismos nocivos à saúde humana ou que gerem prejuízos econômicos, como microrganismos e plantas oportunistas (Stenberg *et al.*, 2021). A produção de bacteriocinas por microrganismos pode ser interpretada como uma estratégia evolutiva de competição, permitindo maior sucesso na colonização e manutenção de nichos em comunidades microbianas. Esse comportamento está sujeito a pressões seletivas do ambiente. Em condições de abundância de nutrientes, o investimento metabólico na produção de bacteriocinas tende a ser reduzido, no entanto, à medida que a competição por recursos se intensifica, a síntese dessas moléculas é favorecida, conferindo vantagem adaptativa às linhagens produtoras (Sermkaew *et al.*, 2025). Nesse contexto, microrganismos provenientes de ecossistemas extremos, como os manguezais, representam uma fonte promissora de novos agentes de biocontrole.

1.2.2.1 Fitopatógenos

Assim como as plantas oportunistas, algumas bactérias e fungos podem crescer em áreas agrícolas, tornando-se um desafio para a produção de alimentos. O controle de microrganismos

oportunistas que afetam o cultivo agrícola é um dos principais desafios à produtividade da agroindústria. As práticas agrícolas se apoiam no uso de pesticidas para reduzir este problema. Entretanto o uso intensivo desses produtos químico apresenta uma grande preocupação quanto à saúde humana, à integridade dos ecossistemas e à sustentabilidade das práticas agrícolas. Por isso, a busca de uma alternativa mais segura para o controle de microrganismos oportunistas deve ser priorizada (Pereira *et al.*, 2023).

Oito linhagens bacterianas isoladas de manguezal de Raposa, Maranhão, Brasil, demonstraram um potencial de biocontrole contra fungos fitopatógenos: *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus yunnanensis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus humi*, *Bacillus* sp. (B13 e B14) e *Bacillus cereus*. Dentre essas linhagens, *M. yunnanensis*, *S. marcescens* e *B. humi* demonstraram inibir fortemente o crescimento de *Rhizoctonia solani*, fungo causador da podridão radicular. A atividade antagonista observada em *S. marcescens* e *Bacillus* sp. foi atribuída a produção de quitinase, enzima hidrolítica responsável pela degradação da quitina, um polissacarídeo presente na parede celular de fungos (Pereira *et al.*, 2023). Bactérias isoladas de manguezal de Cochin, Kerala, India, também demonstraram a produção da quitinase, como a *Bacillus pumilus* MCB-7. O baixo teor de oxigênio e a alta salinidade do ecossistema de manguezais criam um ambiente favorável para a produção consistente de quitinases com propriedades únicas. Isso sugere que a presença de fontes naturais ricas em quitina no ambiente do manguezal poderia induzir a produção de quitinase em bactérias (Rishad *et al.*, 2017).

Além da produção de quitinases, a atividade antagonista de bactérias de manguezal pode envolver a expressão de moléculas inibidoras específicas, como bacteriocinas. A bacteriocina LCI de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de manguezal da Província de Guangdong, China foi descrita como antagonista de *Xanthomonas campestres* (Podridão negra) e foi parcialmente responsável pelo antagonismo contra *Ralstonia solanacearum* (Murcha bacteriana) (Hu; Li; He, 2010).

1.2.2.2 Bactérias multirresistentes a antibióticos

A resistência a antibióticos é uma ameaça global para o tratamento de doenças infecciosas. Esse problema é resultado do uso inadequado de medicamentos, regimes terapêuticos ineficazes e o consumo indiscriminado de antibióticos sem orientação médica. Com o aumento do número de bactérias multirresistentes, a Sociedade de Doenças Infecciosas

da América *(Infeccion Disease Society of America* em inglês) juntou, em um acrônimo conhecido como ESKAPE, as bactérias resistentes a antibióticos mais notórias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Masoud *et al.*, 2022). As bactérias resistentes podem apresentar essa característica devido a presença de genes específicos, como no caso do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), em que o gene *mecA* (ou *mecC*) codifica a proteína ligadora de penicilina PBP2a, uma proteína que apresenta baixa afinidade por penicilinas semissintéticas, tornando esses antibióticos ineficazes (Sermkaew *et al.*, 2025), ou de *erm*D e *spe*G que conferem resistência a eritromicina e clindamicina (Sermkaew *et al.*, 2024a).

Peptídeos antimicrobianos estão presentes em todos os reinos taxonômicos e são essenciais para o mecanismo de defesa do hospedeiro. Alguns desses peptídeos têm a habilidade de eliminar bactérias sem interferir na integridade da membrana, podendo entrar diretamente nas células, interrompendo funções celulares cruciais, como a replicação do DNA, a transcrição, a tradução, o dobramento de proteínas, e o processo de divisão celular (Sermkaew *et al.*, 2024a).

Paenibacillus thiaminolyticus NNS5-6 isolado de manguezal de Nakhon Si Thammarat, Tailândia, demonstrou atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Essa atividade foi promovida por um peptídeo que apresenta características estruturais compatíveis com peptídeos antimicrobianos hidrofílicos do tipo fusaricidina, com mecanismo possivelmente ligado à interação e desestabilização de membranas bacterianas (Sermkaew *et al.*, 2024b). *Virgibacillus chiguensis* FN33 isolado no mesmo manguezal, demonstrou a capacidade de realizar a biossíntese de um novo peptídeo antimicrobiano que exibe atividade anti-SARM (Sermkaew *et al.*, 2025). *Bacillus paralicheniformis* NNS4-3 isolada de manguezal do Distrito de Pak Banang, Nakhon Si Thammarat, Tailândia, é capaz de produzir compostos antimicrobianos, como peptídeo lasso, bacilibactina, lichenisina, bacitracina e fengicina (Qua. 3) (Sermkaew *et al.*, 2024a).

Quadro 3 – Genes envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos.

(continua)

Composto antimicrobiano	Genes	Função
Bacillibactina	*dhbACEBF*	Síntese de complexo multienzimático
Lichenisina	*licABCTE*	Síntese de lichenisina
Fengicina	fenA-E	Síntese de fengicina

(conclusão)

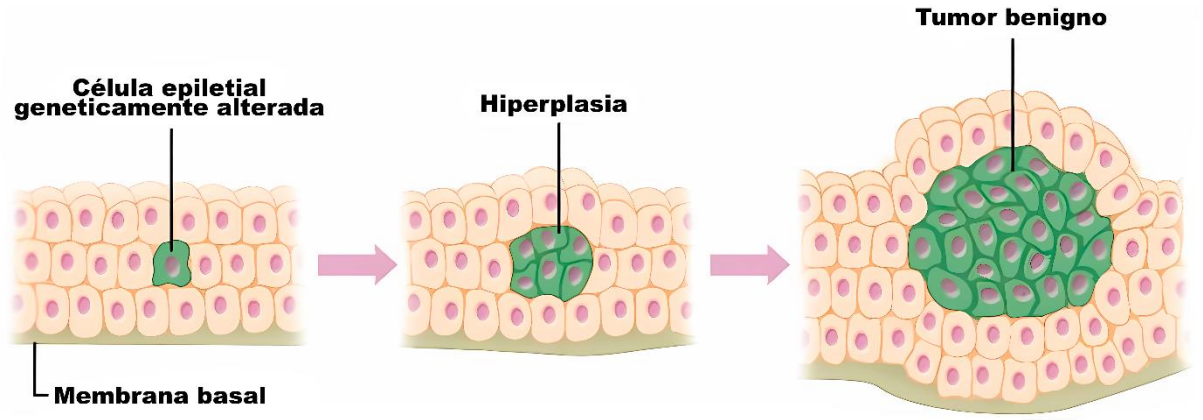
Composto antimicrobiano	Genes	Função
Bacitracina	*bacA, bacB, bacC*	Bacitracina sintetase
	bacT	Tioesterase
	bacR e *bacS*	Sistema regulatório de dois componentes
	bacE	Gene de transporte ABC

Fonte: Sermkaew *et al.*, 2024a

1.2.3 Potencial Antitumoral

O tumor, também conhecido como neoplasma, é uma massa anormal de células causada pela divisão descontrolada, sem que que haja a morte celular apropriada. Tumores podem ser classificados como benignos e malignos. Tumores benignos são tumores que se mantém no local primário sem que haja migração para outros tecidos, tendem a crescer de forma lenta e apresentam uma borda distinta (Fig. 1). Estes tumores normalmente não são problemáticos, porém podem crescer de tamanho e obstruir estruturas, como o tumor benigno de pulmão que pode comprimir a traqueia, causando dificuldades respiratórias (Patel, 2020).

Figura 1 – Desenvolvimento de tumor benigno.

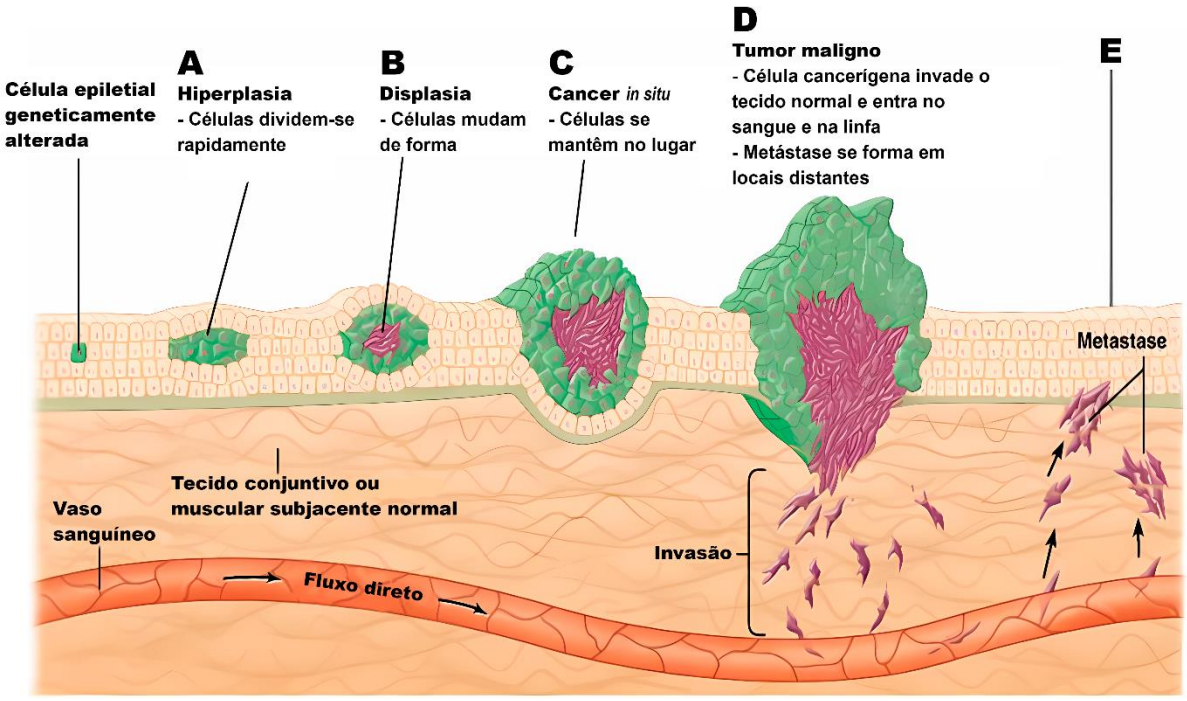


Legenda explicativa: Célula epitelial geneticamente alterada: Uma célula sofre mutação genética e passa a se comportar de forma anormal. Hiperplasia: A célula alterada começa a se dividir rapidamente, formando um pequeno agrupamento celular anormal, mas ainda contido dentro do epitélio; Tumor benigno: A proliferação celular continua, formando uma massa delimitada, que não invade tecidos vizinhos. O tumor permanece circunscrito pela membrana basal.

Adaptado de Kanwal, 2013.

Assim como o tumor benigno, o tumor maligno é uma massa anormal de células, porém com crescimento rápido e com bordas irregulares (Patel, 2020). O câncer é um tipo de tumor maligno com crescimento anormal e potencial de invadir ou se espalhar de seu local de origem para outras regiões do corpo (Schwartz, 2024). Os tumores adquirem esse potencial de disseminação ou invasão ao adquirir múltiplos fenótipos malignos por meio de alterações gênicas e epigenéticas como, por exemplo, os danos no DNA (Fig. 2) (Schwartz, 2024).

Figura 2 – Estágios de desenvolvimento tumoral e metástase.



Legenda explicativa: A. Hiperplasia: As células geneticamente alteradas dividem-se rapidamente, formando uma lesão inicial. B. Displasia: As células passam a apresentar alterações morfológicas, mudando de forma e organização. C. Câncer *in situ*: O tumor está presente, mas ainda restrito ao epitélio, sem invadir tecidos mais profundos. D. Tumor maligno: As células cancerígenas ultrapassam a membrana basal e invadem o tecido conjuntivo ou muscular subjacente, alcançando vasos sanguíneos e linfáticos. E. Metástase: Células malignas se desprendem do tumor primário, viajam pelo sangue ou linfa e se instalam em órgãos distantes, formando novos focos tumorais.

Adaptado de Kanwal, 2013.

O câncer é um dos principais problemas de saúde no mundo (Siegel *et al.*, 2023). De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência global de câncer em 2022 foi de aproximadamente 20 milhões de casos, enquanto a mortalidade alcançou cerca de 9,7 milhões de óbitos (International Agency For Research On Cancer, 2022).

As abordagens terapêuticas tradicionais consistem em cirurgia, quimioterapia, e radioterapia utilizando raio-x. A cirurgia é a forma mais efetiva para tratar o câncer, porém apenas quando diagnosticado em estágio inicial. Entretanto, as resseções cirúrgicas podem agravar a situação da doença por eliminarem parcialmente os tumores. Nesse contexto, a quimioterapia sistêmica é uma das etapas fundamentais do pós-operatório para o controle de células remanescentes e para a melhoraria da qualidade de vida do paciente. No entanto, a quimioterapia e a radioterapia podem causar danos a células saudáveis, gerando efeitos colaterais significativos que limitam a tolerância e a eficácia do tratamento (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023).

Os agentes quimioterápicos podem ser divididos de acordo com seu mecanismo de ação. Os agentes alquilantes podem induzir fragmentação do DNA, pareamentos incorretos nas bases do DNA e consequentemente apoptose (Lehmann; Wennerberg, 2021). Os antimetabólitos afetam as vias biossintéticas essenciais, prejudicam a síntese de DNA/RNA ou causam a quebra da fita de DNA (Cavalcanti; Soares, 2021). No caso dos inibidores de topoisomerase, estes compostos causam quebra nas fitas de DNA por meio da inibição desta enzima, levando à morte celular (Yakkala *et al.*, 2023). Os agentes antitubulina interferem nas dinâmicas do microtúbulo, impedindo a divisão nuclear, promovendo a morte celular (Nussbaumer *et al.*, 2011). Outros agentes quimioterápicos possuem mecanismos de ação não-homogêneos, como a l-asparaginase que prejudica o metabolismo celular normal por meio da clivagem de aminoácido l-asparagina, o bortezomibe induz a morte celular apoptótica, e o imatinibe e o erlotinibe provocam disfunção celular por meio da inibição de vias intracelulares associadas ao sinal de crescimento (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020).

Algumas bactérias isoladas de manguezais apresentam potencial relevante para atividade antitumoral. Um exemplo é o gênero *Streptomyces*, que demonstrou efeitos anticancerígenos em linhagens celulares de carcinoma pulmonar humano (A549), carcinoma cervical humano (HeLa) e leucemia promielocítica humana (HL-60) (Law *et al.*, 2020). Além disso, o extrato de *Streptomyces colonosanans* MUSC 93J isolado de solo de manguezal de Kuching, estado de Sarawak, Malásia, demonstrou atividade citotóxica em células de câncer de cólon (SW480) (Law *et al.*, 2017).

Os extratos de *Microbacterium mangrovi* MUSC 115T e *Monashia flava* MUSC 78T, isolados de manguezal de Tanjung Lumpur, Malásia Peninsular, que apresentaram efeitos anticancerígenos em linhagem de carcinoma cervical humano (Ca Ski), por meio da redução da viabilidade celular. Ao analisar o perfilamento químico dos extratos, foi observada a presença

de 2,4-di-terc-butilfenol (2,4 DTBP), Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, pirazinas (compostos 19, 21, 22, 23 e 24), 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil biciclo[4.3.0]nonano e 3-benzil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo[4.3.0]nonano (BDDB), que são substâncias relacionadas a atividades anticancerígenas (Azman *et al.*, 2017). Uma abordagem inovadora neste tema é a busca de novos tratamentos que causem menos danos as células saudáveis, incluindo este trabalho.

1.2.4 Desafios e Avanços na Literatura

As bactérias isoladas de manguezal demonstram potencial de biorremediação de derivados de petróleo, metais pesados, herbicidas e outros poluentes, por meio da ação de genes como *alkB* (que codifica a alquano monooxigenase) e *ndo* (responsável pela naftaleno dioxigenase), envolvidos na degradação de hidrocarbonetos (Machado *et al.*, 2019), além de operons associados à resistência e tolerância a metais pesados, como o *mer* (para mercúrio) e *czc* (para cádmio, zinco e cobalto) (Das; Ghosh; Banerjee, 2022).

Essas bactérias também produzem enzimas antimicrobianas, como quitinases, proteases e bacteriocinas, que podem ser exploradas no biocontrole de fitopatógenos e bactérias resistentes a antibióticos (Pereira *et al.*, 2023). A presença de fitopatógenos, como *Ralstonia* sp. BPH (Wongwongsee; Chareanpat; Pinyakong, 2013) e bactérias do ESKAPE, como *P. aeruginosa* (Anna; Parthasarathi, 2014), *K. pneumoniae* RY10302 e *Enterobacter* sp. (RY10402, RY11902 e RY11903) (Chantarasiri, 2020) em manguezal pode ser o motivo da seleção de mecanismos antimicrobianos encontrados em bactérias isoladas de manguezal. Essas capacidades sugerem que as bactérias apresentam características adaptativas que refletem as pressões seletivas desse ambiente, marcado pela presença de contaminantes, variações de salinidade e intensa competição microbiana.

Apesar dos artigos analisados elaborarem informações importantes para a bioprospecção, observou-se a falta de detalhamento na identificação de espécies de bactérias responsáveis por esse processo, mantendo as análises restritas a nível de filo ou gênero. Essa limitação reduz a compreensão de características específicas de espécies que são cruciais para aplicações biotecnológicas, além de dificultar a descoberta de novos compostos bioativos, já que espécies diferentes dentro do mesmo gênero podem apresentar capacidades metabólicas distintas.

Para uma melhor discussão, é recomendado a identificação da espécie das bactérias por meio de sequenciamento de DNA. As técnicas tradicionais baseiam-se em métodos fenotípicos e bioquímicos, que incluem análise morfológica, teste de coloração, uso de meios seletivos, além de ensaios enzimáticos e metabólicos. No entanto, devido à alta similaridade fenotípica entre algumas espécies e subespécies, essas abordagens apresentam limitações quanto à precisão e, então, é necessário combinar diferentes técnicas para a identificação conclusiva das espécies (Rocha *et al.*, 2023).

Em contrapartida, os resultados de técnicas modernas são mais rápidos, confiáveis e precisos. O *DNA barcoding* é uma poderosa ferramenta utilizada para identificar espécies, que utiliza um ou mais fragmentos curtos e padronizados de regiões de DNA para a identificação de táxon. O gene 16S rRNA é um marcador universal para as bactérias, apresentando regiões conservadas que permitem a amplificação por primers universais, assim como regiões variáveis que possibilitam a discriminação entre diferentes gêneros (Antil *et al.*, 2023). Portanto, a incorporação de métodos modernos aos tradicionais de identificação bacteriana poderia enriquecer significativamente a discussão dos artigos analisados, proporcionando uma compreensão mais detalhada das espécies envolvidas na biodegradação de HPAs e fortalecendo as conclusões sobre os mecanismos microbianos em ação.

Houve um maior número de estudos, com maior detalhamento metodológico e mais diversidade de abordagens, sobre a biorremediação de derivados de petróleo e metais pesados, em comparação aos outros tópicos como biorremediação de herbicidas e outros poluentes, além do biocontrole de fitopatógenos e bactérias resistentes a antibióticos. A hipótese levantada por esta pesquisa é que a escolha de um organismo para um estudo sobre bioprospecção está fortemente relacionada ao local de isolamento e seu histórico de atividade antropogênica. Desta forma, artigos sobre biorremediação de herbicidas e biocontrole de fitopatógenos deveriam ter como foco o estudo de bactérias isoladas de solo agrícola, pois este tipo de microbioma está em contato direto com esses poluentes e organismos oportunistas.

Um fator que pode estar relacionado a seleção do local de isolamento é a eficiência da atividade de bioprospecção. Foi observado que bactérias isoladas de solo de arrozal e sedimentos do rio apresentam maior atividade de biodegradação de pretilachlor e fenclorim, principais componentes encontrados de uma grande variedade de herbicidas, em comparação às bactérias isoladas de manguezal. Provavelmente isso ocorra devido ao solo de arrozal e sedimentos de rios estarem em áreas de aplicação direta de herbicidas ou de escoamento superficial de resíduos, enquanto os manguezais, em condições gerais, não recebem essa

pressão seletiva, resultando em taxas de biodegradação significativamente mais baixas (Duc *et al.*, 2024). Esse fator também explicaria o motivo do estudo de Liang *et al.*, 2020, que avaliou os efeitos de haloxyfop na diversidade bacteriana na rizosfera de solo de *S. alterniflora*, uma planta considerada oportunista em ambientes costeiros, justamente porque o solo analisado estava submetido à aplicação direta desse xenobiótico. Nesse estudo, observou-se uma redução significativa da diversidade bacteriana, acompanhado pelo aumento da abundância relativa de *Pseudomonas, Acinetobacter* e *Shewanella*, que possivelmente estão envolvidos na biodegradação do herbicida no solo.

Também foi observado que há poucos artigos publicados sobre biorremediação de herbicidas por bactérias isoladas de manguezal. Bactérias são capazes de degradar herbicidas e seus mecanismos envolvidos estão demonstrados no Qua. 4. Uma sugestão para próximos estudos é avaliar a presença desses mecanismos em bactérias isoladas de manguezal.

Quadro 4 – Mecanismos envolvidos na biodegradação de herbicidas por bactérias.

Herbicida	Espécie	Mecanismo	Referências
Glifosato	*Bacillus cereus*	Oxidorredutase do glifosato, C-P liases	Souza *et al.*, 2025
	Ochrobactrum pituitosum	C-P liases, glicina oxidorredutase	
	Pseudomonas sp.	C-P liases	
2,4-D	*Novosphingobium* DY4	Dioxigenase dependente de α-cetoglutarato	Dai *et al.*, 2015
Atrazina	*Arthrobacter* sp. C2	Enzimas AtzA/B/C/DEF	Abd Rani *et al.*, 2021
	Arthrobacter sp. ZXY-2		
	Pseudomonas sp. A02		
	Citricoccus sp. TT3		
	Shewanella sp. YJY4		
	Ensifer sp. CX-T		
Paraquat	*Pseudomonas putida*	Desmetilação	Nguyen *et al.*, 2023
Diuron	*Acinetobacter baumannii* DU	Catecol 1,2-dioxigenase	Duc *et al.*, 2022
	Pseudomonas fuorescens		
	Bacillus subtilis DU	Catecol 2,3-dioxigenase	

Legenda explicativa: 2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

As bactérias isoladas de manguezais demonstraram elevado potencial biotecnológico, abrangendo áreas como biorremediação, biocontrole e atividade antitumoral. A elevada

diversidade microbiana e as condições seletivas características dos manguezais, como a presença recorrente de contaminantes, variações de salinidade e intensa competição microbiana, podem explicar a ampla gama de adaptações observadas nesses isolados, reforçando sua relevância como fonte de compostos e mecanismos de interesse biotecnológico.

No entanto, algumas dessas áreas ainda apresentam número limitado de estudos. Pesquisas mais aprofundadas foram realizadas em biorremediação de metais pesados e petróleo, enquanto estudos sobre biorremediação de herbicidas e biocontrole de fitopatógenos e bactérias resistentes a antibióticos ainda são mais superficiais, sugerindo que o interesse em investigar esses microrganismos pode estar relacionado ao nível de exposição do ambiente a determinados poluentes.

Além disso, a ausência de identificação específica em alguns estudos evidencia a necessidade de utilização tanto de técnicas tradicionais quanto de abordagens moleculares modernas para uma correta especiação bacteriana. Por fim, foram também sugeridas a investigação de genes identificados na bibliografia como direcionamento para futuros estudos sobre a bioprospecção de bactérias de manguezal.

REFERÊNCIAS

ABD RANI, N. F. *et al.* Atrazine-degrading bacteria for bioremediation strategy: A review. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, n. 4, p. 233–247, 4 jul. 2022.

AFONSO, F. *et al.* Community perceptions about mangrove ecosystem services and threats. **Regional Studies in Marine Science**, v. 49, p. 102114, jan. 2022.

AKRAM, H. *et al.* Mangrove Health: A Review of Functions, Threats, and Challenges Associated with Mangrove Management Practices. **Forests**, v. 14, n. 9, p. 1698, 23 ago. 2023.

ALSHARIF, S. M. *et al.* Metagenomic 16S rRNA analysis and predictive functional profiling revealed intrinsic organohalides respiration and bioremediation potential in mangrove sediment. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 176, 22 maio 2024.

ANNA, J, P.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa PBSC1 isolated from mangrove ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 33, p. 3394–3401, 13 ago. 2014.

ANTIL, S. *et al.* DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 1, p. 761–775, 2023.

AYILARA, M. S.; ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Bioprospecting and Challenges of Plant Microbiome Research for Sustainable Agriculture, a Review on Soybean Endophytic Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 85, n. 3, p. 1113–1135, 2023.

BIRANIA, S. *et al.* Advances in development of biodegradable food packaging material from agricultural and AGRO-INDUSTRY waste. **Journal of Food Process Engineering**, v. 45, n. 1, p. e13930, 2022.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

CAVALCANTI, I. D. L.; SOARES, J. C. S. Conventional Cancer Treatment. Em: CAVALCANTI, I. D. L.; SOARES, J. C. S. (Eds.). **Advances in Cancer Treatment**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 29–56.

CHANTARASIRI, A. Klebsiella and Enterobacter Isolated from Mangrove Wetland Soils in Thailand and Their Application in Biological Decolorization of Textile Reactive Dyes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 20, p. 7531, 16 out. 2020.

CECCON, D. M. *et al.* Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranaguá Bay, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133609, 1 dez. 2019.

DAI, Y. *et al.* Bioremediation using Novosphingobium strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. **Biodegradation**, v. 26, n. 2, p. 161–170, 2015.

DAS, D.; GHOSH, S.; BANERJEE, S. A review of metal resistance mechanisms by mangrove bacteria. **Research Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 209–215, 25 fev. 2022.

DE ALMEIDA, F. F. *et al.* Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical and key parameter profiles. Marine Pollution Bulletin, v. 169, p. 112553, 2021.

DUC, H. D. *et al.* Degradation of pretilachlor and fenclorim and effects of these compounds on bacterial communities under anaerobic condition. **Biodegradation**, v. 35, n. 5, p. 583–599, 2024.

DUC, H. D. *et al.* Degradation of Diuron by a Bacterial Mixture and Shifts in the Bacterial Community During Bioremediation of Contaminated Soil. **Current Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 11, 2022.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. *et al.* Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 432, 17 jan. 2023.

HU, H. Q; LI, X. S; HE, H. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated Bacillus amyloliquefaciens from mangrove for biocontrol of Capsicum bacterial wilt. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 359–365, 2010.

HUEMER, M. *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 3 dez. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 20 jan. 2025.

KANWAL, S. **Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells**. *[S.l.]*: Tese - Université Paris Descartes, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/278644130_Effect_of_O-GlcNAcylation_on_tamoxifen_sensitivity_in_breast_cancer_derived_MCF-7_cells.

KAUR, R.; BHARDWAJ, A.; GUPTA, S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 11, p. 9663–9676, 1 nov. 2023.

KERAMEA, P. *et al.* Oil Spill Modeling: A Critical Review on Current Trends, Perspectives, and Challenges. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 9, n. 2, p. 181, 10 fev. 2021.

KUBIAK, A. *et al.* The Problem of Weed Infestation of Agricultural Plantations vs. the Assumptions of the European Biodiversity Strategy. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1808, 30 jul. 2022.

LAW, J. W.-F. *et al.* Anticancer Drug Discovery from Microbial Sources: The Unique Mangrove Streptomycetes. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5365, jan. 2020.

LEHMANN, F.; WENNERBERG, J. Evolution of Nitrogen-Based Alkylating Anticancer Agents. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 377, 19 fev. 2021.

LIANG, Q.; YAN, Z.; LI, X. Influence of the herbicide haloxyfop-R-methyl on bacterial diversity in rhizosphere soil of Spartina alterniflora. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110366, 2020.

LIU, R. *et al.* Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130056, jan. 2023.

MACHADO, L. F. *et al.* Tracking Mangrove Oil Bioremediation Approaches and Bacterial Diversity at Different Depths in an in situ Mesocosms System. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2107, 13 set. 2019.

MARCOS, M. S. *et al.* Tide as Steering Factor in Structuring Archaeal and Bacterial Ammonia-Oxidizing Communities in Mangrove Forest Soils Dominated by Avicennia germinans and Rhizophora mangle. **Microbial Ecology**, v. 75, n. 4, p. 997–1008, 2018.

MASOUD, S. S. *et al.* Extent and Resistance Patterns of ESKAPE Pathogens Isolated in Pus Swabs from Hospitalized Patients. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2022, p. 1–7, 31 out. 2022.

MUÑOZ-GARCÍA, A. *et al.* Metagenomic and genomic characterization of heavy metal tolerance and resistance genes in the rhizosphere microbiome of Avicennia germinans in a semi-arid mangrove forest in the tropics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 184, p. 114204, 2022.

NGUYEN, C. T. *et al.* Paraquat removal by free and immobilized cells of Pseudomonas putida on corn cob biochar. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 8, p. 100376, 2023.

NNAJI, N. D. *et al.* Bioaccumulation for heavy metal removal: a review. **SN Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 125, 2023.

NUSSBAUMER, S. *et al.* Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, out. 2011.

PALIT, K. *et al.* Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 22, p. 32467–32512, 1 maio 2022.

PATEL, Aisha. Benign vs Malignant Tumors. **JAMA Oncology**, v. 6, n. 9, p. 1488, 1 set. 2020.

PEREIRA, É. J. M. C. *et al.* Biocontrol Potential of Serratia Marcescens (B8) and Bacillus sp. (B13) Isolated from Urban Mangroves in Raposa, Brazil. **Life**, v. 13, n. 10, p. 2036, 11 out. 2023.

PRIMAVERA, J. H. *et al.* The Mangrove Ecosystem. Em: **World Seas: An Environmental Evaluation**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–34.

REN, L. *et al.* Bioremediation of PAEs-contaminated saline soil: The application of a marine bacterial strain isolated from mangrove sediment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. 115071, 2023.

RISHAD, K. S. *et al.* Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel Bacillus Pumilus MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 36–41, 2017.

ROCHA, G. T. *et al.* Morphological and biochemical characterization of bacterial species of Bacillus, Lysinibacillus and Brevibacillus. **Revista Ceres**, v. 70, n. 3, p. 91–104, 2023.

SAHA, B.; SEN, A. Effects of Plant Growth Promoting Halotolerant Pseudomonas Aeruginosa JCM 5962 with Hydrocarbon Degradation Ability, Isolated from Sundarbans Mangrove Area in West Bengal, on Abelmoschus esculentus (Okra) Plant Growth. **Current Agriculture Research Journal**, v. 12, n. 2, p. 786–802, 10 set. 2024.

SCHWARTZ, S. M. Epidemiology of Cancer. **Clinical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 140–149, 4 jan. 2024.

SERMKAEW, N. *et al.* A Novel Bacitracin-like Peptide from Mangrove-Isolated Bacillus paralicheniformis NNS4-3 against MRSA and Its Genomic Insights. **Antibiotics**, v. 13, n. 8, p. 716, 30 jul. 2024a.

SERMKAEW, N. *et al.* Unveiling a New Antimicrobial Peptide with Efficacy against P. aeruginosa and K. pneumoniae from Mangrove-Derived Paenibacillus thiaminolyticus NNS5-6 and Genomic Analysis. **Antibiotics**, v. 13, n. 9, p. 846, 5 set. 2024b.

SERMKAEW, N. *et al.* Novel Anti-MRSA Peptide from Mangrove-Derived Virgibacillus chiguensis FN33 Supported by Genomics and Molecular Dynamics. **Marine Drugs**, v. 23, n. 5, p. 209, 14 maio 2025.

SEVAK, P. I.; PUSHKAR, B. K.; KAPADNE, P. N. Lead pollution and bacterial bioremediation: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 4463–4488, 1 dez. 2021.

SIDDIQUE, A. *et al.* Diversity of hydrocarbon-degrading bacteria in mangroves rhizosphere as an indicator of oil-pollution bioremediation in mangrove forests. **Marine Pollution Bulletin**, v. 205, p. 116620, 2024.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023.

SONI, N. *et al.* Biodegradation and Bioremediation Efficiency of Mangrove-Associated Actinobacteria. *In*: MUTHUSAMY, Sanjivkumar; MANIKKAM, Radhakrishnan; VENUGOPAL, Gopikrishnan (Orgs.). **Mangrove Microbiome: Diversity and Bioprospecting**. Singapore: Springer Nature, 2025. p. 223–247.

SONIA *et al.* Bioprospecting and Biodiscovery for Sustainable Development. *In*: SOBTI, Ranbir Chander (Ed.). **Biotechnological Innovations for Sustainable Biodiversity and Development**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2025. p. 189–201.

SOUZA, K. S. *et al.* Biodegradation Potential of Glyphosate by Bacteria: A Systematic Review on Metabolic Mechanisms and Application Strategies. **Agronomy**, v. 15, n. 5, p. 1247, 21 maio 2025.

STENBERG, J. A. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665–676, 1 jun. 2021.

SURABHI, A. *et al.* Multi-metal Tolerance Efficiency and Bioremediation Capabilities of *Bacillus aerius* from Mangrove Rhizosphere. **Geomicrobiology Journal**, v. 42, n. 8, p. 737–744, 14 set. 2025.

TIRALERDPANICH, P. *et al.* Variation of the mangrove sediment microbiomes and their phenanthrene biodegradation rates during the dry and wet seasons. **Environmental Pollution**, v. 289, p. 117849, 2021.

TRAN, T. V.; REEF, R.; ZHU, X. A Review of Spectral Indices for Mangrove Remote Sensing. **Remote Sensing**, v. 14, n. 19, p. 4868, 29 set. 2022.

UR RAHMAN, S. *et al.* Adaptation and remediation strategies of mangroves against heavy metal contamination in global coastal ecosystems: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 441, p. 140868, 2024.

WAFHA, K. A; GAYATHRI, S. B; BABY, D. Heavy Metal Bioremediation Potential of Mangrove Rhizobacteria from Cochin Backwaters, Kerala. 13 maio 2023.

WEND, K. *et al.* Microbial pesticides – challenges and future perspectives for testing and safety assessment with respect to human health. **Environmental Health**, v. 23, n. 1, p. 49, 29 maio 2024.

WONGWONGSEE, W.; CHAREANPAT, P.; PINYAKONG, O. Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 95–104, 2013.

WU, Y. *et al.* Influence of bacterial community diversity, functionality, and soil factors on polycyclic aromatic hydrocarbons under various vegetation types in mangrove wetlands. **Environmental Pollution**, v. 308, p. 119622, 2022.

YAKKALA, P. A. *et al.* Prospects of Topoisomerase Inhibitors as Promising Anti-Cancer Agents. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, p. 1456, 13 out. 2023.

ZHANG, T. *et al.* Spatial distribution, source identification, and risk assessment of heavy metals in riparian soils of the Tibetan plateau. **Environmental Research**, v. 237, p. 116977, 2023.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DE MANGUEZAL COM ÊNFASE EM BIORREMEDIAÇÃO E BIOCONTROLE

2.1 RESUMO

Bactérias isoladas de manguezais demonstram notável capacidade de biorremediação e biocontrole, refletindo a adaptabilidade e o potencial biotecnológico desses microrganismos em ambientes extremos. Diante disso, esse estudo avaliou a capacidade de crescimento em meio com glifosato como única fonte de carbono e a atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e bactérias associadas a infecções hospitalares por bactérias isoladas de manguezal. Ensaios de crescimento em meio mineral M9 contendo glifosato como única fonte de carbono mostraram que todos os isolados são capazes de crescimento, sugerindo a presença de mecanismos metabólicos alternativos e adaptativos. Nos testes de antagonismo, os isolados inibiram *Ralstonia* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto *Klebsiella pneumoniae* não foi afetada. A formação de halos de inibição sugere que os isolados podem secretar compostos antibacterianos, como peptídeos antimicrobianos, enzimas líticas e compostos voláteis. Estes resultados evidenciam o potencial biotecnológico de bactérias de manguezal na biorremediação de herbicidas e no controle biológico de patógenos agrícolas e clínicos.

Palavras-chave: Supressão bacteriana, fitopatógeno, glifosato.

2.2 INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros tropicais e subtropicais altamente produtivos, caracterizados por solos ricos em matéria orgânica e sedimentos, cuja disponibilidade de nutrientes varia conforme as condições locais (Ceccon et al., 2019). Esses ambientes abrigam ampla diversidade microbiana, incluindo bactérias, arqueias, fungos e protozoários, que precisam se adaptar a variações extremas de salinidade e maré, além da influência das espécies vegetais presentes (Marcos et al., 2018; Palit et al., 2022).

Entre esses organismos, as bactérias têm despertado interesse crescente devido ao seu potencial biotecnológico (Soni *et al.*, 2025). Bactérias isoladas de manguezal demonstraram ser capazes de degradar herbicidas (Soni *et al.*, 2025) e derivados do petróleo, como o diesel (Saha; Sen, 2024), além de inibir o crescimento de fitopatógenos (Pereira *et al.*, 2023) e bactérias resistentes a antibióticos (Sermkaew *et al.*, 2024b). Com isso, bactérias isoladas de manguezal apresentam um grande potencial para uso como biorremediação de poluentes e biocontrole de agentes na agricultura e saúde humana.

Apesar do potencial biotecnológico reconhecido, existem poucos estudos que investigam a capacidade de bactérias isoladas de manguezais degradarem glifosato ou

exercerem mecanismos antagônicos contra fitopatógenos como a *Ralstonia* sp. e bactérias associadas a infecções hospitalares, incluindo o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A hipótese desse trabalho é que esses isolados de manguezal possam apresentar tanto mecanismos de degradação de glifosato e quanto atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e bactérias associadas a infecções hospitalares. Diante disso, esse trabalho avalia o crescimento das bactérias em meio contendo glifosato e o potencial antagônico contra *Ralstonia* sp., *S. aureus, P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Coleta e Isolamento Bacteriano

Amostras de sedimento de manguezal foram obtidas em Paranaguá, Paraná, Brasil. Autorização para atividades com finalidade científica junto ao SISBIO: 88354. Após a coleta, 1 g de amostra foi pesada e diluída em 4 mL da solução PBS estéril, a partir desta solução homogeneizada foram realizadas diluições seriadas (10^{-4}), o produto foi semeado em meio de cultura sólido Lúria Bertani (LA: NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L e Ágar 15 g/L) à 37 °C por 24 h. 100 colônias foram separadas e mantidas em estoque de glicerol 50% a -80 ºC. Para os ensaios, foram selecionados de forma aleatória os isolados 2.3.A, 3.2.A, 3.2.B e M.H.2.

2.3.2 Meios de Cultura e Condições de Crescimento

O pré-inóculo dos isolados do manguezal e das linhagens oportunistas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Ralstonia* sp., foram cultivadas em meio de cultura LB à 37 °C por 24 h.

Para o ensaio comparativo de crescimento bacteriano em meios com diferentes fontes de carbono, foram preparados o meio de cultura mineral M9, utilizando como base a solução de sais M9 (M9: KH_2PO_4 15 g/L; NaCl 2,5 g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 64 g/L e NH_4Cl 5 g/L). A partir desta solução, foram preparados o meio de cultura mineral M9 sólido com glicose (M9GLIC: 200 mL de M9, 20 mL de Glicose 1M, 2 mL de $MgSO_4$ 1M e 0,1 mL de $CaCl_2$ 1M e q.s.p 1000 mL de Água destilada) e meio de cultura mineral M9 sólido com glifosato comercial (M9GLIF:

200 ml/L de M9, 67 µL de Glifosato, 2 mL de $MgSO_4$ 1M e 0,1 ml de $CaCl_2$ 1M e q.s.p 1000 ml de Água destilada).

Para o ensaio de antagonismo contra *Ralstonia* sp. foi utilizado o meio sólido *Brain Heart Infusion* (BHI: Ágar 15 g/L, Extrato de Cérebro 7,8 g/L, Dextrose 2,0 g/L, Fosfato Dissódico 2,5 g/L, Extrato de Coração 9,7 g/L, Peptona de Proteose 10,0 g/L e Cloreto de Sódio, 5,0 g/L). Para o ensaio de antagonismo contra foi utilizado o meio sólido Mueller-Hinton (MH: Ágar 17,0 g/L, Sólidos de Infusão de Carne 2,0 g/L, Hidrolisado de Caseína 17,5 g/L e Amido 1,5 g/L).

2.3.3 Análises Físico-Químicas do Solo

Amostras de solo foram coletadas do manguezal de Paranaguá e foram analisadas pelo Interpartner, Laboratório de Análises Ambientais (Ponta Grossa, Paraná). Para determinar o enxofre, fósforo, boro, cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, molibdênio, níquel, potássio e zinco total, foi utilizado o método EPA SW-846 Method 3050B / EPA 7471-B:2007 - 73. A determinação dos teores totais de arsênio e selênio foi conduzida conforme o US EPA Method 7061A – 141.

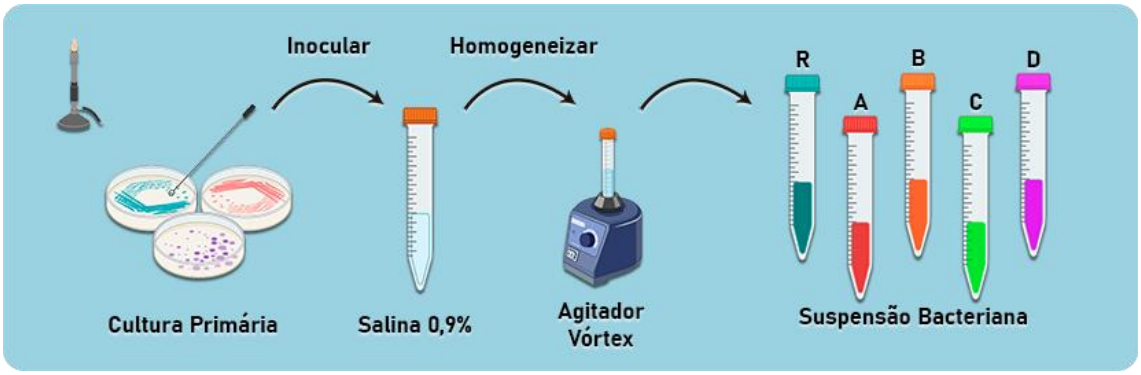
2.3.4 Ensaio Comparativo de Crescimento Bacteriano em Glifosato e Glicose

Para o ensaio comparativo de crescimento bacteriano, foram preparadas doze placas com M9GLIC e doze placas de M9GLIF como fonte de carbono. Nas placas com M9GLIC, as bactérias de manguezal 2.3.A, 3.2.B e M.H.2 foram inoculadas individualmente. De maneira similar, nas placas com M9GLIF, os mesmos isolados (2.3.A, 3.2.B e M.H.2) foram inoculados individualmente. Todas as condições experimentais foram incubadas à 37 °C por 24h e realizadas em triplicata. Após o período de incubação, o raio e o diâmetro dos halos formados pelas bactérias foram medidos com o auxílio de uma régua. As medidas foram coletadas em três ângulos: 45°, 90° e 180° e então foi feito uma média entre os valores.

2.3.5 Ensaio de Antagonismo Contra Fitopatógenos

Para o ensaio de antagonismo, foram preparadas soluções de bactérias em salina seguindo a escala McFarland 0,5: A = 2.3.A, B = 3.2.A, C = 3.2.B, D = M.H.2. e R = *Ralstonia* sp. (Fig. 3). Para isso, foi preparado um pré-inóculo dos isolados em meio LA.

Figura 3 – Preparo das suspensões bacterianas R, A, B, C e D.

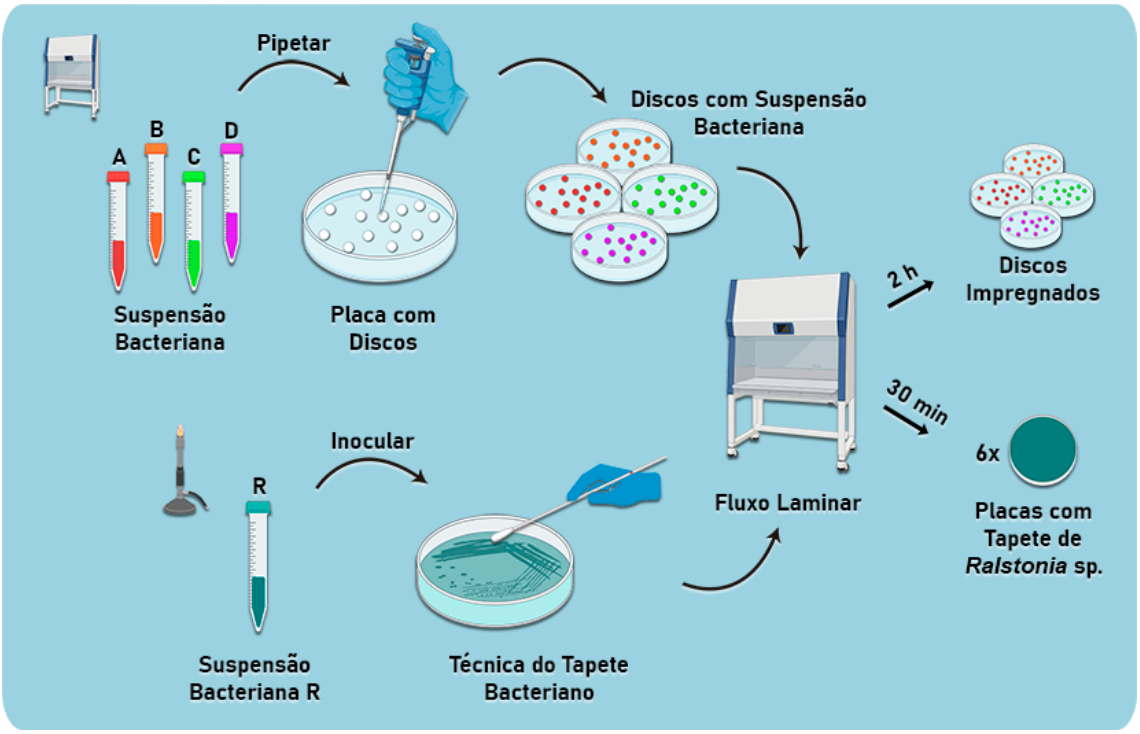


Fonte: O autor.

Legenda explicativa: As culturas primárias das bactérias isoladas do manguezal foram inoculadas em solução salina a 0,9 % sob condições estéreis, utilizando-se a chama de Bico de Bunsen. As suspensões bacterianas resultantes foram homogeneizadas em agitador vórtex para assegurar a uniformidade celular. R = Suspensão de *Ralstonia* sp.; A = Suspensão de 2.3.A; B = suspensão de 3.2.A; C = Suspensão de 3.2.B; D = Suspensão de M.H.2.

Cada bactéria foi transferida para um tubo de salina 0,9 % com auxílio de uma alça de inoculação estéril, e homogeneizada em agitador vórtex. As soluções A, B, C e D foram pipetadas em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro estéreis e deixadas em fluxo laminar por 2 h até secar completamente. A solução R foi inoculada em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio BHI com auxílio de swabs estéreis para a formação de um “tapete” no fundo da placa e foram deixadas brevemente em fluxo laminar para secar (Fig. 4).

Figura 4 – Inoculação das bactérias do manguezal em discos de papel filtro e placas.

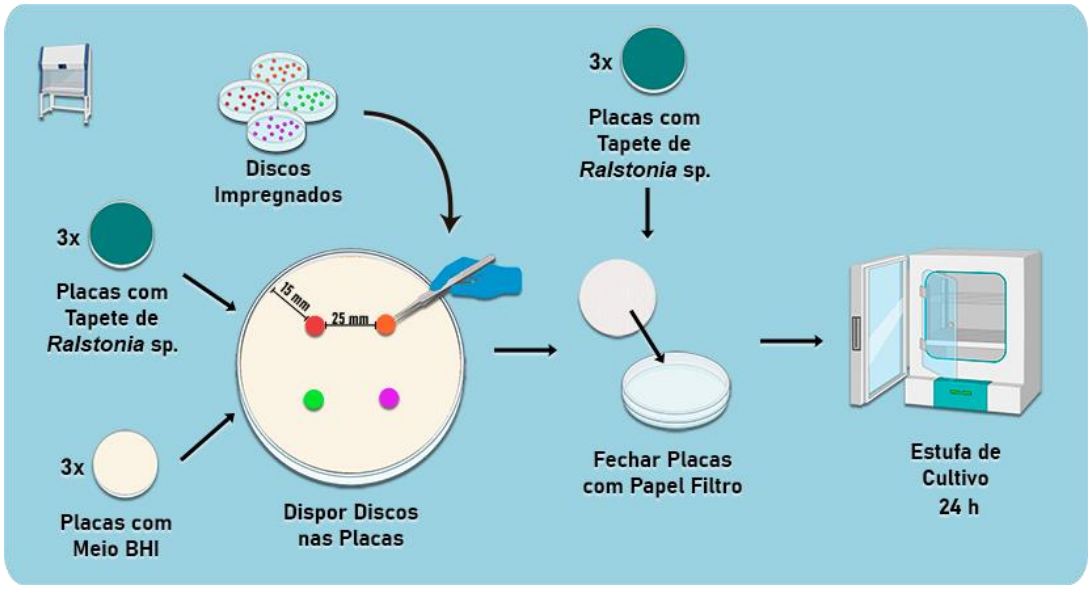


Fonte: O autor.

Legenda explicativa: Sob condições estéreis em fluxo laminar, as suspensões bacterianas A, B, C e D foram pipetadas em discos de papel filtro estéreis, que foram deixados para secagem no fluxo por 2 horas, formando os discos impregnados com bactérias. Em condições estéreis sob chama de Bico de Bunsen, a suspensão bacteriana R foi inoculada em placas contendo meio BHI utilizando um swab estéril e a técnica de tapete bacteriano. As placas foram mantidas em fluxo laminar por 30 minutos para secagem, resultando em seis placas preparadas.

As bactérias do manguezal foram dispostas na placa em distâncias de 25 mm de centro a centro dos discos, além de 15 a 20 mm distantes das bordas. Então, as placas foram vedadas com papel filtro de 100 mm de diâmetro, para reduzir a umidade interior da placa, e transferidas para estufa à 37 °C por 24 h. Além do ensaio de antagonismo, foram preparadas placas contendo exclusivamente os discos com as bactérias do manguezal, para servir como controle de crescimento bacteriano. O controle de crescimento da *Ralstonia* sp. também foi realizado, utilizando placas que continham apenas o inóculo dessa bactéria (Fig. 5).

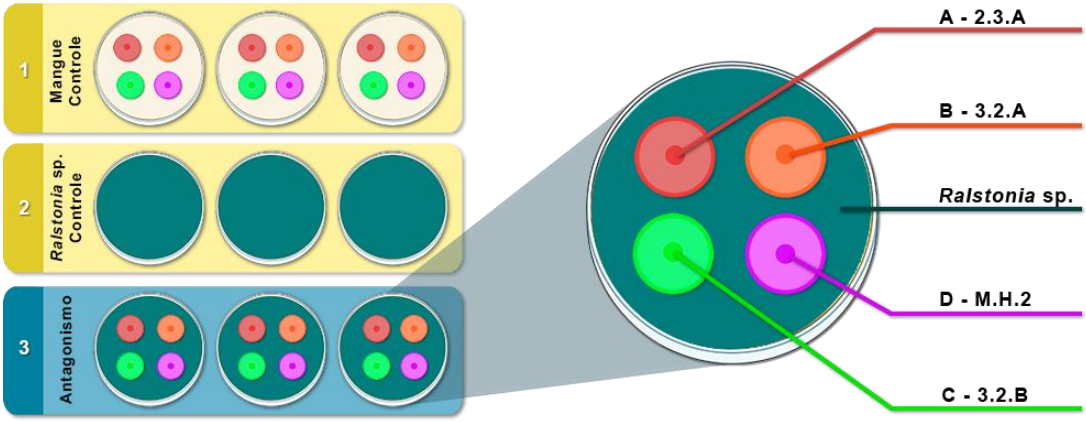
Figura 5 – Ensaio de Antagonismo.



Fonte: O autor.

Legenda explicativa: Sob condições estéreis em fluxo laminar, os discos impregnados com bactérias foram posicionados, com auxílio de uma pinça estéril, em três placas contendo o tapete bacteriano de *Ralstonia* sp. e em três placas contendo apenas meio BHI. Os discos foram distribuídos a uma distância de 15 mm da borda da placa e 25 mm entre si. Para controlar a umidade, um papel filtro foi inserido entre a tampa e as placas. Adicionalmente, três placas com o tapete de *Ralstonia* sp. também foram cobertas com papel filtro. Todas as placas foram incubadas em estufa de cultivo por 24 horas.

Figura 6 – Inoculação das placas.



Fonte: O autor.

Legenda explicativa: 1 corresponde ao controle do crescimento das bactérias do manguezal em triplicata, onde foram dispostos discos contendo a bactéria do manguezal em meio BHI. 2 corresponde ao controle do crescimento bacteriano da *Ralstonia* sp., onde a bactéria foi inoculada para formar um “tapete” na placa. 3 corresponde ao ensaio de antagonismo. Cada círculo colorido indicado nas placas corresponde a uma das bactérias do manguezal, onde a região central corresponde ao disco de papel filtro contendo a bactéria e a área ao redor corresponde a possível formação de halo.

O ensaio foi feito em triplicatas, assim como o controle contendo apenas a *Ralstonia* sp. e o controle contendo apenas as bactérias do manguezal. As placas finalizadas ficaram de acordo com a Fig. 6. Após o período de incubação, o raio e o diâmetro dos halos formados pelas bactérias foram medidos com o auxílio de uma régua. As medidas foram coletadas em três ângulos: 45°, 90° e 180° e então foi feito uma média entre os valores.

2.3.6 Ensaio de Antagonismo Contra Bactérias Resistentes a Antibióticos

As bactérias foram testadas quanto à atividade antagonista em meio MH. Os isolados bacterianos provenientes do manguezal utilizados nos ensaios foram: 2.3.A, 3.2.A, 3.2.B e M.H.2. As cepas antagonistas testadas foram: *K. pneumoniae* ATCC 13883; *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923.

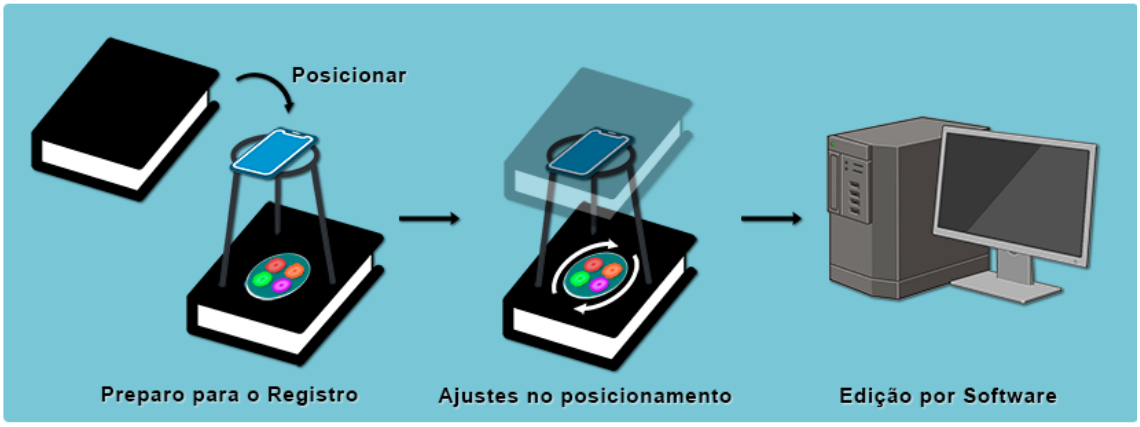
Para cada microrganismo antagonista, foram preparadas três placas de Petri contendo meio MH, nas quais os patógenos foram cultivados. Cada placa foi subdividida em quatro quadrantes, sendo inoculado em cada um deles, individualmente, aproximadamente 0,5 cm de uma das bactérias do manguezal. Adicionalmente, foram preparadas três placas contendo apenas o microrganismo antagonista correspondente, utilizadas como controle. Também foram cultivadas três placas específicas para cada bactéria do manguezal, sem presença dos patógenos, com o objetivo de servir como controle negativo do experimento. As placas foram cultivadas à 37 °C por 24h.

Após o período de incubação, o raio e o diâmetro dos halos formados pelas bactérias foram medidos com o auxílio de uma régua. As medidas foram coletadas em três ângulos: 45°, 90° e 180° e então foi feito uma média entre os valores.

2.3.7 Captura de Imagem

A aquisição das imagens do ensaio foi feita com auxílio de uma câmera de telefone móvel. Após a captura, as imagens foram editadas utilizando o Adobe Photoshop. O contraste foi aumentado para 60 e o fundo original foi substituído por um fundo preto, isolando a imagem da placa (Fig. 7).

Figura 7 – Captura de imagem dos resultados.



Fonte: O autor.

Legenda explicativa: As placas foram posicionadas sobre um fundo preto (um livro) para melhorar o contraste e fotografadas utilizando a câmera de um telefone celular. Um segundo livro foi colocado sobre o telefone para reduzir o reflexo da tampa da placa. Para capturar imagens individuais de cada halo de inibição, as placas foram rotacionadas após cada fotografia. As imagens capturadas foram posteriormente editadas em software de processamento de imagem.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Características Físico-Químicas do Manguezal

As análises das amostras indicaram um pH levemente alcalino de 7,68. Entre os nutrientes, destacam-se as médias de enxofre (443,5 mg/kg), fósforo total (158,3 mg/kg), cálcio (5.695,7 mg/kg), magnésio (1.025,3 mg/kg) e potássio (308,5 mg/kg). Quanto aos metais traço – metais presentes em baixas concentrações no solo – os valores médios foram baixos, com arsênio (0,70 mg/kg), cádmio (<1,00 mg/kg), chumbo (7,80 mg/kg), cobre (2,20 mg/kg), cromo (5,80 mg/kg), ferro (2.912,4 mg/kg), manganês (37,50 mg/kg), níquel (2,45 mg/kg), selênio (<0,050 mg/kg) e zinco (26,65 mg/kg), sugerindo condições químicas típicas para sedimentos de manguezal.

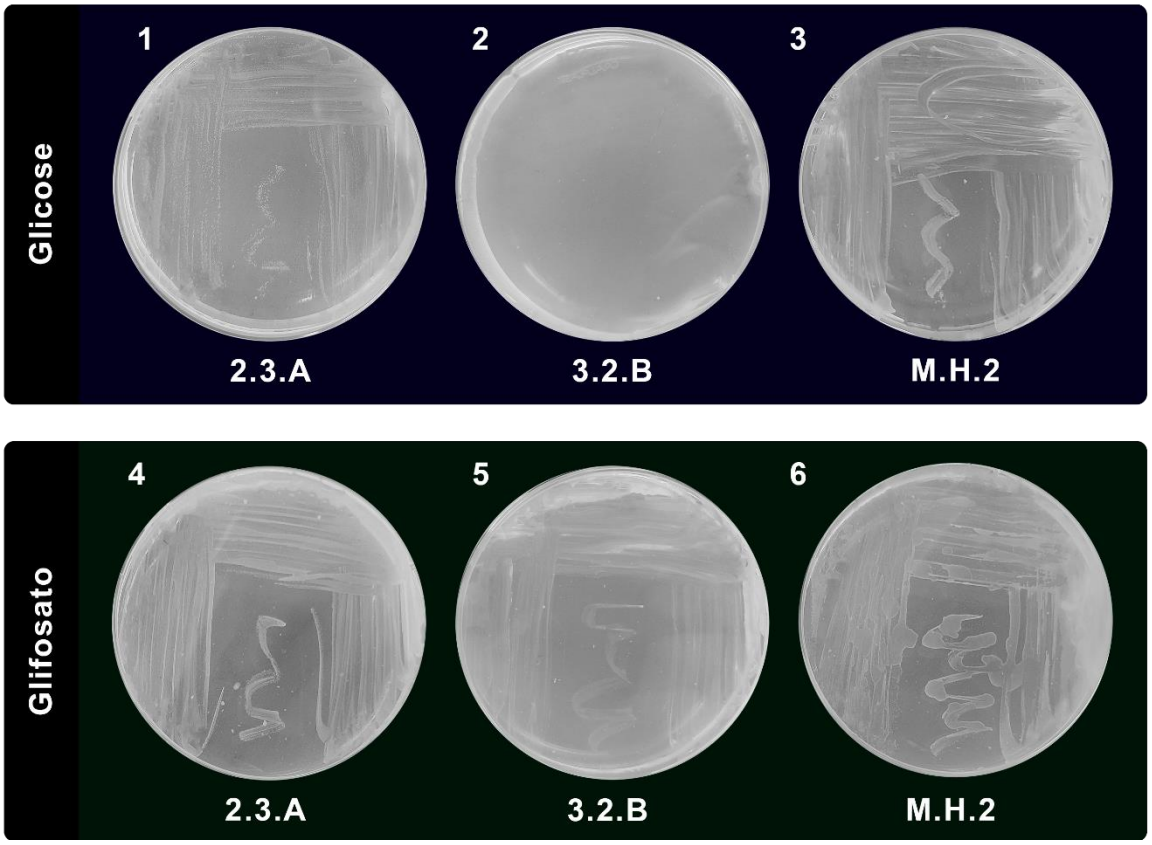
O elevado teor de matéria orgânica, associado à disponibilidade limitada de oxigênio, favorece o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que desempenham papel central na decomposição de compostos orgânicos e na ciclagem de nutrientes. Além disso, a presença de baixos teores de metais traço, como arsênio e cádmio, sugere que os microrganismos encontrados nestes sedimentos estão adaptados a condições naturais do manguezal, podendo contribuir para processos de biorremediação e biocontrole de poluentes, alinhando-se ao

potencial biotecnológico observado em bactérias isoladas deste ecossistema (Booth *et al*., 2023).

2.4.2 Seleção de Isolados em Meios de Cultura Contendo Glifosato como Única Fonte de Carbono

Considerando o crescimento das bactérias em meio mineral M9 com glicose como controle, houve um resultado relevante em relação ao crescimento dos isolados em meio mineral M9 contendo glifosato como fonte de carbono (Fig. 8).

Figura 8 – Resultado do ensaio comparativo de crescimento bacteriano em glifosato e glicose.



Fonte: O autor.

Legenda explicativa: 1, 2 e 3 representam as bactérias do manguezal (2.3.A, 3.2.B e M.H.2) em meio mineral M9 com glicose. 4, 5, 6 representam as mesmas linhagens de bactérias, porém em meio M9 contendo glifosato como substituto da glicose. No meio contendo glicose, houve o crescimento dos isolados 2.3.A e M.H.2, porém não houve crescimento aparente do isolado 3.2.A.

2.4.2.1 Glicose como fonte de carbono

Os isolados 2.3.A e M.H.2 foram capazes de crescer em meio contendo glicose como fonte de carbono. A hipótese é que esses isolados apresentam genes e mecanismo que utilizam a glicose como fonte de carbono, já que fornece energia e recursos necessários para seu crescimento (Chen; Wang; Su, 2023). Em Gram-positivas como *B. subtilis*, o fator de transcrição CcpA regula o catabolismo de carbono, ativado pela fosforilação da proteína HPr em resposta ao aumento de frutose-1,6-bisfosfato. Outros fatores de transcrição, como CcpC, CcpN, CggR e GlcT, também respondem à glicose. Em *Escherichia coli*, a proteína CAP, antes vista apenas como um regulador transcricional relacionado à glicose, também pode atuar como uma proteína associada ao nucleoide (NAP). As proteínas NAPs, funcionais como histonas em bactérias, têm papéis na transcrição, recombinação, condensação e manutenção cromossômica (Ogura; Sato; Abe, 2019).

O sistema fosfoenolpiruvato-dependente de fosfotransferase (FDF) é essencial no transporte de glicose em bactérias, promovendo a fosforilação de açúcares e permitindo a captação de glicose por sistemas específicos e não específicos. Além disso, o FDF detecta variações nos níveis de nutrientes, ajustando as respostas celulares a essas mudanças (Chen; Wang; Su, 2023). Essas informações sugerem que os isolados 2.3.A e M.H.2 possuem regulação metabólica eficiente para a utilização da glicose, refletindo uma adaptação a condições ambientais em que esse açúcar está disponível.

2.4.2.2 Glifosato como fonte de carbono

Apesar da ausência da glicose no meio, houve o crescimento dos três isolados testados em meio contendo glifosato. A hipótese é que os isolados utilizaram o glifosato como fonte de carbono em meio a ausência de glicose. Além disso, apesar de crescer em glifosato, não foi observado o crescimento de isolado 3.2.B em meio mineral M9 contendo glicose em concentração padrão para o meio. A hipótese é que o isolado bacteriano apresenta capacidade de utilizar o glifosato como fonte alternativa de carbono, enquanto não consegue metabolizar a glicose presente no meio M9 em sua concentração padrão, possivelmente devido a limitações metabólicas específicas ou à presença de mecanismos enzimáticos voltados para o aproveitamento do herbicida.

Geralmente, a fonte de carbono em um ambiente tende a ser composta por açucares e a fonte mais favorável é selecionada para um crescimento bacteriano mais eficiente. O mecanismo regulatório que permite a utilização exclusivamente de fontes de carbono sobre outros açúcares é o catabolismo de carbono (CC) (Wen *et al.*, 2021).

A repressão do CC (RCC) regula a preferência microbiana por fontes de carbono mais favoráveis, como glicose, em detrimento de outras. Em *Bacillus subtilis*, o CC é mediado pelo regulador CcpA, que em complexo com HPr-Ser46~P controla a transcrição de genes relacionados ao metabolismo de carbono. O RCC ocorre via intermediários glicolíticos, como FBP, que ativam a fosforilação de HPr. Este processo também está associado ao transporte de carboidratos pelo sistema FDF (Wen *et al.*, 2021).

Bactérias podem utilizar vias alternativas para a degradação do glifosato. A cepa *Acidovorax* sp. CNI26 utilizou especificamente a via da C–P liase, enquanto *Agrobacterium tumefaciens* CNI28, *Novosphingobium* sp. CNI35 e *Ochrobactrum pituitosum* CNI52 demonstraram capacidade de degradar o glifosato por meio da via da C–P liase e/ou da glifosato oxidase (Rossi *et al.*, 2021).

Uma concentração reduzida de glicose pode prejudicar o crescimento bacteriano (Chen; Wang; Su, 2023). A surfactina é uma molécula sinalizadora que regula o Quorum sensing e adaptações metabólicas em *Bacillus* spp.. Em *Bacillus amyloliquefaciens*, a mutação no gene *srfA* (ΔsrfA), que sintetiza surfactina, reduziu a capacidade de utilizar fontes de carbono não preferenciais e causou lise celular após o esgotamento da glicose, revertida com a adição de surfactina ou glicose. Sugere-se que a surfactina alivia a repressão do CCR e regula o metabolismo de fontes alternativas de carbono. Análises multiômicas revelaram que a surfactina influencia globalmente o metabolismo de carbono, incluindo sistemas dependentes e independentes de CcpA, e intermediários metabólicos em *B. amyloliquefaciens* (Wen *et al.*, 2021).

O ácido propiônico, conhecido pela sua capacidade inibitória de crescimento bacteriano, se acumula em meios de cultura com baixas concentrações de glicose (1 g/L e 0,2 g/L). A presença de β-glicosidase (UnBgl1A) permite à bactéria tolerar até 0,9 M de glicose (Chen; Wang; Su, 2023).

Os pequenos RNAs regulatórios bacterianos (sRNAs), com 50 a 500 nucleotídeos, regulam a expressão gênica pós-transcricional em resposta a estresses ambientais. Eles interagem com regiões não traduzidas de mRNAs-alvo, regulando sua estabilidade e tradução, frequentemente com auxílio da chaperona Hfq. Esses sRNAs participam de redes regulatórias

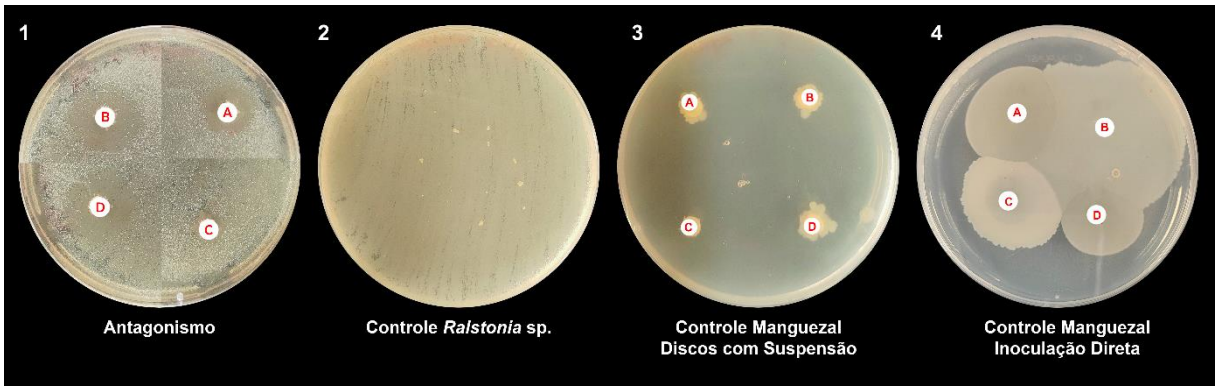
complexas, sendo identificados em diversas bactérias, como *E. coli* e *S. aureus*, onde desempenham papéis na adaptação ao estresse e virulência (Chen; Wang; Su, 2023).

B. subtilis BS-G1 é capaz de adaptar-se a diferentes concentrações de glicose por meio da regulação positiva de proteínas transportadoras e do aumento da atividade de transporte de substâncias. Sete mRNAs e três sRNAs foram associados à adaptação em ambientes com baixos níveis de açúcar, incluindo transportadores ABC de aminoácidos, proteínas do FDF e transportadores ABC de glutaminase. A alta expressão dos transportadores FDF (*mtlA* e *celB*) foi mediada por sRNAs, aumentando a captação de glicose. Além disso, o metabolismo da histidina em ácido glutâmico gera α-cetoglutarato, que entra no ciclo do TCA e na gliconeogênese, fornecendo carbono para o crescimento bacteriano (Chen; Wang; Su, 2023). Esses dados sugerem que a capacidade dos isolados de crescer em meio contendo apenas glifosato pode estar relacionada à presença de mecanismos regulatórios e metabólicos alternativos, capazes de compensar a ausência de glicose e sustentar o crescimento bacteriano.

2.4.3 Antagonismo de Isolados de Manguezal Contra o Fitopatógeno *Ralstonia* sp.

O tamanho médio do diâmetro do halo formado foi: 2.3.A = 11,0 mm; 3.2.A = 21,2 mm; 3.2.B = 11,5 mm; e M.H.2 = 10,3 mm. Também foi possível observar que no controle feito com discos de suspensão bacteriana dos isolados de manguezal, todos os isolados mantiveram seu crescimento nos discos, enquanto no controle com inoculação direta dos isolados, foi observado o crescimento bacteriano além da área de inoculação (Fig. 9). A hipótese é que os isolados secretaram alguns compostos que fizeram o controle do crescimento de *Ralstonia* sp. No entanto, essas análises são preliminares, pois não permitem identificar os metabolitos envolvidos nem detalhar os mecanismos de ação. Dessa forma, os resultados apresentados foram interpretados com cautela, e estudos futuros poderão investigar de maneira mais aprofundada os compostos responsáveis e seus efeitos específicos sobre o crescimento de *Ralstonia* sp.

Figura 9 – Ensaio de antagonismo com fitopatógeno.



Fonte: o autor.

Legenda explicativa: Os discos de A à D correspondem às bactérias do manguezal: A = 2.3.A, B = 3.2.A, C = 3.2.B e D = M.H.2. A placa 1 corresponde ao resultado do ensaio de antagonismo das bactérias do manguezal contra a *Ralstonia* sp. A 2 corresponde ao controle do crescimento da *Ralstonia* sp.. A 3 e a 4 correspondem ao controle do crescimento dos isolados de manguezal feito com discos com suspensão bacteriana e com inoculação direta na placa, respectivamente. Todas as bactérias do manguezal formaram um halo.

Há uma escassez de estudos que avaliam o comportamento antagônico por bactérias isoladas de manguezal contra *Ralstonia* sp. No entanto, o antagonismo contra *Ralstonia* sp. foi observado em bactérias de rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum*), no qual *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. promoveram a inibição do fitopatógeno (Gashaw; Sitotaw; Yilma, 2022).

Tabela 1 – Valores de raio e diâmetro do halo formado no antagonismo (em mm).

Bactéria do Manguezal	I		II		III		Média	
	r	d	r	d	r	d	r	d
2.3.A	6,7	13,5	4,5	9,0	5,0	10,5	5,4	11,0
3.2.A	10,0	20,0	10,7	21,5	11,0	22,0	10,6	21,2
3.2.B	4,5	9,0	9,7	19,5	3,0	6,0	5,7	11,5
M.H.2	4,5	9,0	6,5	13,0	4,5	9,0	5,2	10,3

Legenda explicativa: r = raio; d = diâmetro; I, II, III = triplicatas.

A formação de halos translúcidos pode ser resultado da supressão bacteriana, ou seja, em vez de haver a morte celular das bactérias, pode ter havido uma redução na taxa de crescimento, densidade e de virulência. Esse fenômeno pode ser decorrente de compostos orgânicos voláteis (COV), pequenas moléculas de diferentes classes químicas, como alcenos,

álcoois, cetonas, ácidos orgânicos, terpenos, benzenoides e pirazinas, que podem causar uma variedade de efeitos quando interagem com outros organismos (Sidorova *et al.*, 2021).

Os COVs emitidos por *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram efeitos sobre os fatores de virulência do fitopatógeno *R. solanacearum*. Os COVs produzidos reduziram de forma significativa a expressão dos genes associados à atividade antioxidante (*katG* e *sodB*), bem como do regulador transcricional PhcA, com diminuição superior a duas vezes. Esse regulador, dependente da densidade celular, é responsável por controlar a expressão de fatores de virulência, incluindo substâncias poliméricas extracelulares (EPS), enzimas degradadoras da parede celular, como as endoglucanases, além da motilidade bacteriana (Almeida *et al.*, 2023).

Bacillus cereus HRT7.7, *Enterobacter hormaechei* SRU4.4, *Paenibacillus polymyxa* SRT9.1 e *Serratia marcescens* SGT5.3 apresentaram atividade antagônica contra *R. solanacearum* decorrente a produção de enzimas líticas (como celulase e protease), sideróforos e a solubilização de fosfato. No entanto, a capacidade máxima de atividade antimicrobiana dessas cepas foi observada apenas sob condições ambientais específicas (por exemplo, fontes disponíveis de carbono e nitrogênio, pH e temperatura) (Mamphogoro *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos demonstram que os isolados de manguezal apresentaram atividade antagônica contra *Ralstonia* sp., evidenciada pela formação de halos de inibição já reportados em rizobactérias de tomate. Esses achados sugerem que os isolados podem secretar compostos antimicrobianos, possivelmente COVs ou enzimas líticas, capazes de interferir no crescimento e na virulência do fitopatógeno. Considerando a escassez de estudos que abordam o potencial de bactérias de manguezal contra *Ralstonia* sp., este trabalho reforça a relevância desse ambiente como fonte promissora de microrganismos com aplicação biotecnológica no controle biológico. Como perspectivas, há a necessidade de realizar a caracterização química dos compostos envolvidos, a avaliação da atividade antagônica frente a diferentes fitopatógenos e na análise da eficácia desses isolados em conjunto com a planta hospedeira, o que permitirá validar seu potencial como agentes de biocontrole em sistemas agrícolas.

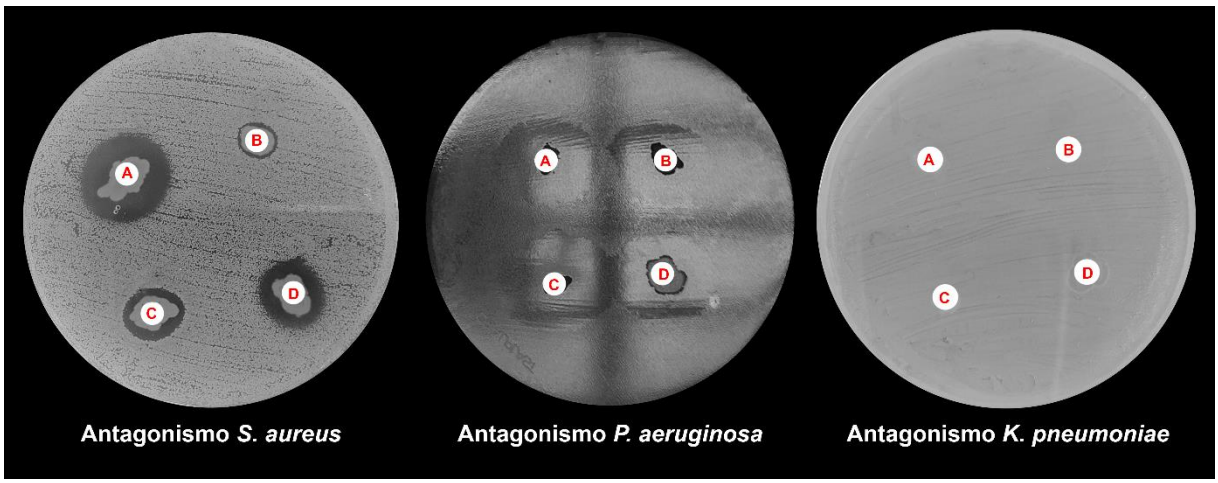
2.4.4 Antagonismo de Isolados Bacterianos de Manguezal Contra Bactérias Modelos Resistentes a Antibióticos

No ensaio de antagonismo contra *S. aureus* houve a formação de halo de inibição dos isolados 2.3.A, 3.2.B e M.H.2, enquanto o isolado 3.2.A não formou halo visivelmente significativo. O diâmetro médio dos halos foi 2.3.A = 2,01 cm, 3.2.B = 1,34 cm e M.H.2 = 1,47

cm. No ensaio de antagonismo contra *P. aeruginosa*, houve a formação de halo em todos os isolados. O diâmetro médio dos halos foi 2.3.A = 3,00 cm, 3.2.A = 2,27 cm, 3.2.B = 2,81 cm e M.H.2 = 2,83 cm. Não houve formação de halo no ensaio de antagonismo contra *K. pneumoniae*, sugerindo que não houve inibição desse antagonista (Fig. 10). Os comprimentos do raio e do diâmetro dos halos foram dispostos na Tab. 2.

A hipótese para a inibição de *S. aureus* e *P. aeruginosa* pelos isolados de manguezal é que esses são capazes de produzir e secretar compostos antibacterianos que fizeram a inibição do crescimento dos antagonistas. Esse comportamento foi observado no extrato de *Microbacterium mangrovi* MUSC 115T, *Sinomonas humi* MUSC 117T e *Monashia flava* MUSC 78T, que apresentam atividade inibitória contra o crescimento de algumas bactérias resistentes a antibióticos. Os extratos de *M. mangrovi* MUSC 115T e *S. humi* MUSC 117T inibiram completamente o crescimento de *P. aeruginosa* NRBC 112582, *S. typhi* ATCC 19430 e *E. coli* ATCC 25922. Ao realizar o perfilamento químico dos extratos, foi observado que os compostos pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)- do extrato de *S. humi* MUSC 117T e pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)- do extrato de *M. flava* MUSC 78T demonstram efeito bactericida contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (Azman *et al.*, 2017).

Figura 10 – Resultado de antagonismo contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.



Fonte: o autor.

Legenda explicativa: A = 2.3.A, B = 3.2.A, C = 3.2.B e D = M.H.2. No ensaio de antagonismo contra *S. aureus*, os isolados 2.3.A, 3.2.B e M.H.2 formaram halo de inibição. No ensaio de antagonismo contra *P. aeruginosa*, houve a formação de um halo de supressão bacteriana. Não foi observado inibição do crescimento no antagonismo contra *K. pneumoniae*.

Tabela 2 – Valores do raio e do diâmetro do halo formado no teste de antagonismo (em cm).

Antagonista	Bactéria do Manguezal	I		II		III		Média	
		r	d	r	d	r	d	r	d
S. aureus	2.3.A	1,20	2,30	0,85	1,70	1,03	2,03	1,03	2,01
	3.2.A	0,60	1,30	0,53	1,10	0,50	0,73	0,54	1,04
	3.2.B	0,73	1,33	0,75	1,50	0,60	1,20	0,69	1,34
	M.H.2	0,75	1,50	1,73	1,50	0,70	1,40	1,06	1,47
P. aeruginosa	2.3.A	1,20	2,50	1,06	2,06	2,25	4,50	1,50	3,02
	3.2.A	1,10	2,00	1,06	1,80	1,50	3,00	1,22	2,27
	3.2.B	1,53	3,00	1,26	2,23	1,60	3,20	1,46	2,81
	M.H.2	1,50	3,00	1,06	2,20	1,65	3,30	1,40	2,83

Legenda explicativa: r = raio; d = diâmetro; I, II, III = triplicatas.

Entre os diferentes tipos de compostos antimicrobianos, destacam-se também os peptídeos antimicrobianos, que estão presentes em todos os reinos taxonômicos e são essenciais para o mecanismo de defesa do hospedeiro. Alguns desses peptídeos têm a habilidade de eliminar bactérias sem interferir na integridade da membrana, podendo entrar diretamente nas células, interrompendo funções celulares cruciais, como a replicação do DNA, a transcrição, a tradução, o dobramento de proteínas e o processo de divisão celular (Sermkaew *et al.*, 2024a).

Paenibacillus thiaminolyticus NNS5-6 isolado de manguezal de Nakhon Si Thammarat, Tailândia, demonstrou atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Essa atividade foi promovida por um peptídeo que apresenta características estruturais compatíveis com peptídeos antimicrobianos hidrofílicos do tipo fusaricidina, com mecanismo possivelmente ligado à interação e desestabilização de membranas bacterianas (Sermkaew *et al.*, 2024b). *Virgibacillus chiguensis* FN33 isolado no mesmo manguezal, demonstrou a capacidade de realizar a biossíntese de um novo peptídeo antimicrobiano que exibe atividade anti-SARM (Sermkaew *et al.*, 2025). *Bacillus paralicheniformis* NNS4-3 isolada de manguezal do Distrito de Pak Banang, Nakhon Si Thammarat, Tailândia, é capaz de produzir compostos antimicrobianos, como peptídeo lasso, bacilibactina, lichenisina, bacitracina e fengicina (Sermkaew *et al.*, 2024a).

Nos resultados obtidos nesse trabalho, o ensaio de antagonismo contra *P. aeruginosa* revelou a formação de halo em todos os isolados, no entanto, esses halos apresentaram aspecto translúcido e baixa nitidez, de modo que sua visualização só foi possível com o auxílio da iluminação em contraste. A hipótese para esse fenômeno é que não houve inibição e sim, uma

supressão bacteriana. Esse resultado indica que os halos observados não corresponderam a uma inibição completa, mas sim a uma redução na densidade de crescimento de *P. aeruginosa*, sugerindo que os isolados secretaram compostos capazes de suprimir a multiplicação bacteriana sem exercer um efeito bactericida direto.

No estudo de Boopathi *et al*. (2022), o *Bacillus subtilis* BR4 isolado de manguezal de Pichavaram, Tamil Nadu, India, produz estigmatelina Y, um análogo estrutural do sinal PQS de *P. aeruginosa*, que pode se ligar de forma competitiva ao receptor PqsR e inibir o sistema de quorum sensing (QS) de desta bactéria. Além disso, o extrato de acetato de etila de *B. subtilis* BR4 contendo estigmatelina Y inibiu a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. As bactérias estabelecem comunicação entre si através de moléculas sinalizadoras do QS ajustando a expressão gênica de acordo com a densidade populacional. Ao inibir o QS podem ser interrompidos processos cooperativos essenciais para a adaptação ambiental e a colonização do hospedeiro, como secreção de enzimas degradadoras de tecidos, produção de toxinas e estabelecimento de biofilmes estruturados (Boopathi *et al.*, 2022). Dessa forma, a inibição do QS sugere que o crescimento e a virulência de *P. aeruginosa* podem ser suprimidos de maneira notável.

2.5 CONCLUSÕES

Os isolados do manguezal de Paranaguá, Paraná, Brasil demonstraram um potencial para o desenvolvimento biotecnológico. Todos os isolados foram capazes de crescer em meio mineral M9 contendo glifosato como única fonte de carbono, sugerindo a presença de mecanismos metabólicos alternativos capazes de sustentar o crescimento bacteriano na ausência de glicose.

Em relação à atividade antimicrobiana, os isolados demonstraram antagonismo contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia* sp. e contra as bactérias de infecções hospitalares *S. aureus* e *P. aeruginosa*, embora não tenham inibido *K. pneumoniae*. Os halos de inibição observados indicam que os isolados podem secretar compostos antibacterianos, incluindo pequenas moléculas voláteis, enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos, capazes de reduzir a taxa de crescimento ou a virulência dos microrganismos testados. Além disso, a supressão observada em *P. aeruginosa*, sugere que os isolados podem modular a expressão gênica de bactérias competidoras, interferindo em processos cooperativos essenciais para colonização e sobrevivência.

Dessa forma, este estudo destaca o potencial biotecnológico dos isolados de manguezal, demonstrando que estes microrganismos não apenas possuem capacidade de metabolizar glifosato, mas também podem atuar como agentes de controle biológico de patógenos agrícolas e clínicos. Futuros estudos envolvendo análise genômica e proteômica poderão esclarecer os genes, vias metabólicas e compostos responsáveis por essas atividades, ampliando o conhecimento sobre a bioprospecção de bactérias de ambientes manguezais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O. A. C. *et al.* The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 951130, 4 jan. 2023.

AZMAN, A.-S. *et al.* Antibacterial, Anticancer and Neuroprotective Activities of Rare Actinobacteria from Mangrove Forest Soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 177–187, 2017.

BOOPATHI, S. *et al. Bacillus subtilis* BR4 derived stigmatellin Y interferes Pqs-PqsR mediated quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 801–814, 2022.

BOOTH, Jenny M. *et al.* The microbial landscape in bioturbated mangrove sediment: A resource for promoting nature-based solutions for mangroves. **Microbial Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 1584–1602, 2023.

CECCON, D. M. *et al.* Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranaguá Bay, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133609, 1 dez. 2019.

CHEN, L.; WANG, C.; SU, J. Understanding the Effect of Different Glucose Concentrations in the Oligotrophic Bacterium Bacillus subtilis BS-G1 through Transcriptomics Analysis. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, p. 2401, 26 set. 2023.

GASHAW, T.; SITOTAW, B.; YILMA, S. Evaluation of Rhizosphere Bacterial Antagonists against Ralstonia solanacearum Causing Tomato (Lycopersicon esculentum) Wilt in Central Ethiopia. **International Journal of Agronomy**, v. 2022, p. 1–9, 11 abr. 2022.

MAMPHOGORO, T. P. *et al.* Epiphytic Bacteria from Sweet Pepper Antagonistic In Vitro to Ralstonia solanacearum BD 261, a Causative Agent of Bacterial Wilt. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1947, 14 set. 2021.

MARCOS, M. S. *et al.* Tide as Steering Factor in Structuring Archaeal and Bacterial Ammonia-Oxidizing Communities in Mangrove Forest Soils Dominated by Avicennia germinans and Rhizophora mangle. **Microbial Ecology**, v. 75, n. 4, p. 997–1008, 2018.

OGURA, M.; SATO, T.; ABE, K. Bacillus subtilis YlxR, Which Is Involved in Glucose-Responsive Metabolic Changes, Regulates Expression of tsaD for Protein Quality Control of Pyruvate Dehydrogenase. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 923, 1 maio 2019.

PALIT, K. *et al.* Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 22, p. 32467–32512, 1 maio 2022.

PEREIRA, É. J. M. C. *et al.* Biocontrol Potential of Serratia Marcescens (B8) and Bacillus sp. (B13) Isolated from Urban Mangroves in Raposa, Brazil. **Life**, v. 13, n. 10, p. 2036, 11 out. 2023.

ROSSI, F. *et al.* Glyphosate-degrading behavior of five bacterial strains isolated from stream biofilms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 420, p. 126651, 2021.

SAHA, B.; SEN, A. Effects of Plant Growth Promoting Halotolerant Pseudomonas Aeruginosa JCM 5962 with Hydrocarbon Degradation Ability, Isolated from Sundarbans Mangrove Area in West Bengal, on Abelmoschus esculentus (Okra) Plant Growth. **Current Agriculture Research Journal**, v. 12, n. 2, p. 786–802, 10 set. 2024.

SERMKAEW, N. *et al.* A Novel Bacitracin-like Peptide from Mangrove-Isolated Bacillus paralicheniformis NNS4-3 against MRSA and Its Genomic Insights. **Antibiotics**, v. 13, n. 8, p. 716, 30 jul. 2024a.

SERMKAEW, N. *et al.* Unveiling a New Antimicrobial Peptide with Efficacy against P. aeruginosa and K. pneumoniae from Mangrove-Derived Paenibacillus thiaminolyticus NNS5-6 and Genomic Analysis. **Antibiotics**, v. 13, n. 9, p. 846, 5 set. 2024b.

SERMKAEW, N. *et al.* Novel Anti-MRSA Peptide from Mangrove-Derived Virgibacillus chiguensis FN33 Supported by Genomics and Molecular Dynamics. **Marine Drugs**, v. 23, n. 5, p. 209, 14 maio 2025.

SIDOROVA, D. E. *et al.* The Effect of Volatile Organic Compounds on Different Organisms: Agrobacteria, Plants and Insects. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 69, 30 dez. 2021.

SONI, N. *et al.* Biodegradation and Bioremediation Efficiency of Mangrove-Associated Actinobacteria. *In*: MUTHUSAMY, Sanjivkumar; MANIKKAM, Radhakrishnan; VENUGOPAL, Gopikrishnan (Orgs.). **Mangrove Microbiome: Diversity and Bioprospecting**. Singapore: Springer Nature, 2025. p. 223–247.

WEN, J. *et al.* Surfactin, a quorum sensing signal molecule, globally affects the carbon metabolism in Bacillus amyloliquefaciens. **Metabolic Engineering Communications**, v. 12, p. e00174, 2021.

CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTITUMORAL DE BACTÉRIAS DO MANGUEZAL

3.1 RESUMO

O câncer é um tumor maligno que vem causando preocupação mundial devido à sua alta incidência e mortalidade, e os tratamentos tradicionais nem sempre apresentam eficácia plena ou ausência de efeitos adversos. Neste estudo, avaliou-se a atividade antitumoral de metabólitos produzidos por quatro isolados bacterianos de manguezal utilizando as linhagens de carcinoma pulmonar humano e adenocarcinoma mamário como modelos biológicos. Ensaios de viabilidade celular (MTT e cristal violeta) demonstraram redução significativa da viabilidade para a maioria dos isolados, com efeitos dependentes do volume de extrato aplicado. O ensaio de migração celular revelou que alguns extratos também inibiram significativamente a migração das células de carcinoma pulmonar. Os resultados sugerem que os metabólitos bacterianos podem interferir na atividade metabólica, sobrevivência celular e motilidade, possivelmente por meio de peptídeos bioativos ou compostos secundários com propriedades anticancerígenas. A escolha de bactérias de manguezal se justifica pela elevada diversidade microbiana e pelas condições ambientais seletivas desses ecossistemas, que favorecem a seleção de linhagens competidoras com capacidade de produção de moléculas bioativas raras, tornando esses microrganismos uma fonte promissora para estudos de aplicação antitumoral. Comparações com a literatura indicam que bactérias de ambientes naturais, como manguezais, são fontes promissoras de moléculas com potencial aplicação antitumoral, justificando estudos futuros de caracterização química dos metabólitos, identificação de compostos bioativos específicos e investigação dos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos observados sobre viabilidade e migração celular.

Palavras-chave: Compostos secundários, atividade citotóxica, biotecnologia.

3.2 INTRODUÇÃO

O câncer é um tipo de tumor maligno com crescimento anormal e potencial de invadir ou se espalhar de seu local de origem para outras regiões do corpo. Os tumores adquirem esse potencial de disseminação ou invasão ao adquirir múltiplos fenótipos malignos por meio de alterações gênicas e epigenéticas como, por exemplo, os danos no DNA (Schwartz, 2024). O câncer é um dos principais problemas de saúde no mundo (Siegel *et al.*, 2023). De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência global de câncer em 2022 foi de aproximadamente 20 milhões de casos, enquanto a mortalidade alcançou cerca de 9,7 milhões de óbitos (International Agency For Research On Cancer, 2022). Alguns fatores associados ao elevado risco de câncer são o uso do tabaco, o consumo de álcool, padrões alimentares inadequados, a inatividade física, a poluição do ar e infecções crônicas (World Health Organization, 2022).

Algumas terapias se tornaram tradicionais para o tratamento do tumor maligno, como é o caso da sua remoção por meio de cirurgia, da quimioterapia por meio de agentes quimioterápicos que interferem no metabolismo e na divisão celular, e radioterapia utilizando raios-X. A cirurgia é a forma mais efetiva para tratar o câncer, porém apenas quando diagnosticado em estágio inicial. Entretanto, as resseções cirúrgicas, que eliminam parcialmente os tumores, podem agravar a situação da doença uma vez que podem causar resistência a medicamentos (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023). A quimioterapia sistêmica é uma das etapas mais importantes do pós-operatório para melhorar a qualidade de vida do paciente. A quimioterapia e a radioterapia podem causar danos a células saudáveis, entretanto, a quimioterapia apresenta mortalidade mais baixa que a radioterapia (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023).

Outro aspecto da quimioterapia é que células tumorais podem adquirir resistência aos componentes quimioterápicos, resultado da diminuição da absorção dos medicamentos e efluxo de fármacos. Além disso, o tratamento por meio de quimioterápicos convencionais podem trazer complicações na escolha da dose, declínio na seletividade, metabolismo rápido dos medicamentos e efeitos colaterais. Visto isso, há uma necessidade de desenvolver terapias que não apenas reduzam a mortalidade, mas também melhorem a qualidade de vida do indivíduo (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023).

A natureza apresenta uma variedade de recursos com potencial de desenvolvimento de novos e eficientes compostos para os tratamentos de doenças. Pesquisadores vêm explorando novas alternativas por meio de plantas e microrganismos de diferentes ecossistemas e observaram o potencial para o uso humano (Atanasov *et al.*, 2021).

Bactérias isoladas de manguezais demonstraram capacidade de promover atividade citotóxica em células tumorais, como no caso do *Streptomyces colonosanans* MUSC 93J, cujo extrato afetou a viabilidade celular da linhagem tumoral de cólon SW480 (Law *et al.*, 2017). O *Streptomyces* sp. MUM265 demonstrou atividade anticancerígena contra a linhagem tumoral de cólon Caco-2, evidenciada pela indução de fragmentação de DNA, um marcador característico de apoptose (Tan *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços no tratamento do câncer, a resistência aos quimioterápicos e os efeitos colaterais reforçam a necessidade de novas abordagens terapêuticas. O potencial de microrganismos como fonte de bioativos vem sendo amplamente explorado, principalmente de fontes de ecossistemas extremos, como os manguezais. No entanto, há lacunas no entendimento sobre os mecanismos dos efeitos antitumorais e na viabilidade e segurança de seus metabólitos

como agentes terapêuticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral de extratos celulares de linhagens bacterianas isoladas de manguezal e discutir os efeitos observados à luz da literatura existente.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Coleta e Isolamento Bacteriano

Amostras de sedimento de manguezal foram obtidas de Paranaguá, Paraná, Brasil. Autorização para atividades com finalidade científica junto ao SISBIO: 88354. Após a coleta, 1 g de amostra foi pesada e diluída em 4 mL da solução PBS estéril, a partir desta solução homogeneizada foram realizadas diluições seriadas, sendo que o produto foi semeado em meio sólido Lúria Bertani (LB: NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L e Ágar 15 g/L) à 37 °C por 24 h. 100 colônias foram separadas e mantidas em estoque de glicerol 50% a -80 ºC.

3.3.2 Cultivo das Linhagens Tumorais

As linhagens celulares tumorais selecionadas foram linhagens de carcinoma pulmonar humano (A549) e adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231). As linhagens foram pré-cultivadas em meio Dullbeco Modified Eagle's Medium (DMEM), alta glicose (Anexo A), 10% de soro fetal bovino (SFB), em estufa de cultivo 5% CO_2. As linhagens foram cultivadas por um período de 15 dias antecedentes aos ensaios. Houve troca do meio a cada três dias e foi realizado o subcultivo quando a confluência alcançava entre 70% a 90%.

3.3.3 Preparo do Extrato dos Isolados do Manguezal

Os isolados 2.3.A, 3.2.A, 3.2.B e M.H.2 foram selecionados para os ensaios devido seu potencial de bioprospecção. Os isolados foram cultivados em caldo Lúria Bertani (LA: NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L e Extrato de Levedura 5 g/L). Após o crescimento bacteriano dos isolados, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm à 4 °C por 5 minutos para a formação de pellet. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0,57

g/L e o KH_2PO_4 0,2 g/L) para separar as células do meio original, concentrá-las e padronizar a suspensão para os ensaios subsequentes. Então, para a aquisição do extrato dos isolados, foi feita a lise da membrana das bactérias com o auxílio do sonicador. Para não sobreaquecer a suspensão, o tubo foi mantido em banho maria invertido e o processo de sonicação foi realizado em 10 ciclos de 5 segundos de ativação alternados com 5 segundos de pausa.

3.3.4 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular

Para o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi feito o subcultivo das linhagens tumorais em placa de 96 poços, 8 x 10^3 células por poço, em meio DMEM alta glicose 10% de SFB e então foram mantidas em estufa de cultivo com CO_2 a 5%. Após 24 horas, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados diferentes volumes (10 µL, 25 µL e 50 µL) de extrato bacteriano dos isolados do manguezal e o controle, conforme a Tab. 3. O ensaio foi feito em triplicatas. A placa foi mantida em estufa de cultivo com CO_2 à 5% por 24 horas.

Tabela 3 – Tratamentos do ensaio de viabilidade e proliferação celular. Volume por poço equivale a 200 µL.

Composto\Tratamento	Controle 1	1	2	3
Extrato Bacteriano	0 µL	10 µL	25 µL	50 µL
Meio DMEM + Streptomicina (1%)	190 µL	180 µL	165 µL	140 µL
SFB (5%)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Fonte: O autor.

Após o período de incubação, o meio com o tratamento foi retirado dos poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL de MTT (0,5 mg/ml) em cada poço e a placa foi retornada à estufa 5% CO_2. Após 2,5 horas, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Então foi feito a leitura da placa em espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific) à 550 nm.

3.3.5 Cristal Violeta

Para o ensaio de cristal violeta foi feito o subcultivo das linhagens tumorais em placa de 96 poços, 8 x 10^3 células por poço, em meio DMEM alta glicose 10% de SFB e então foram

mantidas em estufa de cultivo com CO_2 a 5%. Após 24 horas, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados diferentes volumes (10 µL, 25 µL e 50 µL) de extrato bacteriano dos isolados do manguezal e o controle, conforme a Tab. 3. O ensaio foi feito em duplicatas. A placa foi mantida em estufa de cultivo com CO_2 à 5% por 24 horas.

Após o período de incubação, o tratamento foi descartado e as células foram lavadas com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados 50 µL de metanol e mantidas em estufa 5% de CO_2. Após 13 minutos, o metanol foi descartado, foram adicionados 50 µL de cristal violeta 0,2% e a placa foi retornada para a estufa por 3 minutos. Então, a placa foi lavada com PBS 1x até a remoção do cristal violeta. Por fim, foram adicionados 200 µL de tampão acetato de sódio (CH_3COONa 2,762 g/L e CH_3CO_2H 0,98 g/L) 50 mM e foi feita a leitura da placa em espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific) 545 nm.

3.3.6 Ensaio de Migração Celular (*Scratch Assay*)

Para o ensaio de migração, foram inoculadas 5 x 10^4 células em cada poço em meio DMEM alta glicose 10% de SFB e então foram mantidas em estufa de cultivo com CO_2 a 5%. Após 24 horas o meio foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMEM com mitomicina 10 µg/ml e a placa retornou à estufa. Após 2 horas, foi feito um risco com o auxílio de uma ponteira (10 µL) de micropipeta no sentido vertical em cada poço da placa. Em seguida, o meio foi descartado e diferentes volumes de extrato bacteriano (10 µL, 25 µL e 50 µL) foram adicionados nos poços e dois controles com concentrações diferentes de SFB também foram incluídos, conforme a Tab. 4. O ensaio foi feito em duplicatas.

Tabela 4 – Tratamentos do ensaio de migração celular. Volume por poço equivale a 200 µL.

Composto\Tratamento	Controle 1	Controle 2	1	2	3
Extrato Bacteriano	0 µL	0 µL	10 µL	25 µL	50 µL
Meio DMEM + Streptomicina (1%)	196 µL	180 µL	186 µL	171 µL	146 µL
SFB	4 µL	20 µL	4 µL	4 µL	4 µL

Fonte: O autor.

Após adicionar o tratamento, foram capturadas imagens dos poços com o microscópio Olympus IX71 and Sony Cyber-shot DSC-W35 nos tempos 5 h e 24 h.

3.3.7 Análise Estatística

Para a análise dos resultados obtidos nos ensaios, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey no software Graph Prism 10.3.1.509. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. Para determinar a porcentagem da área que as células migraram, aplicamos os dados na seguinte fórmula:

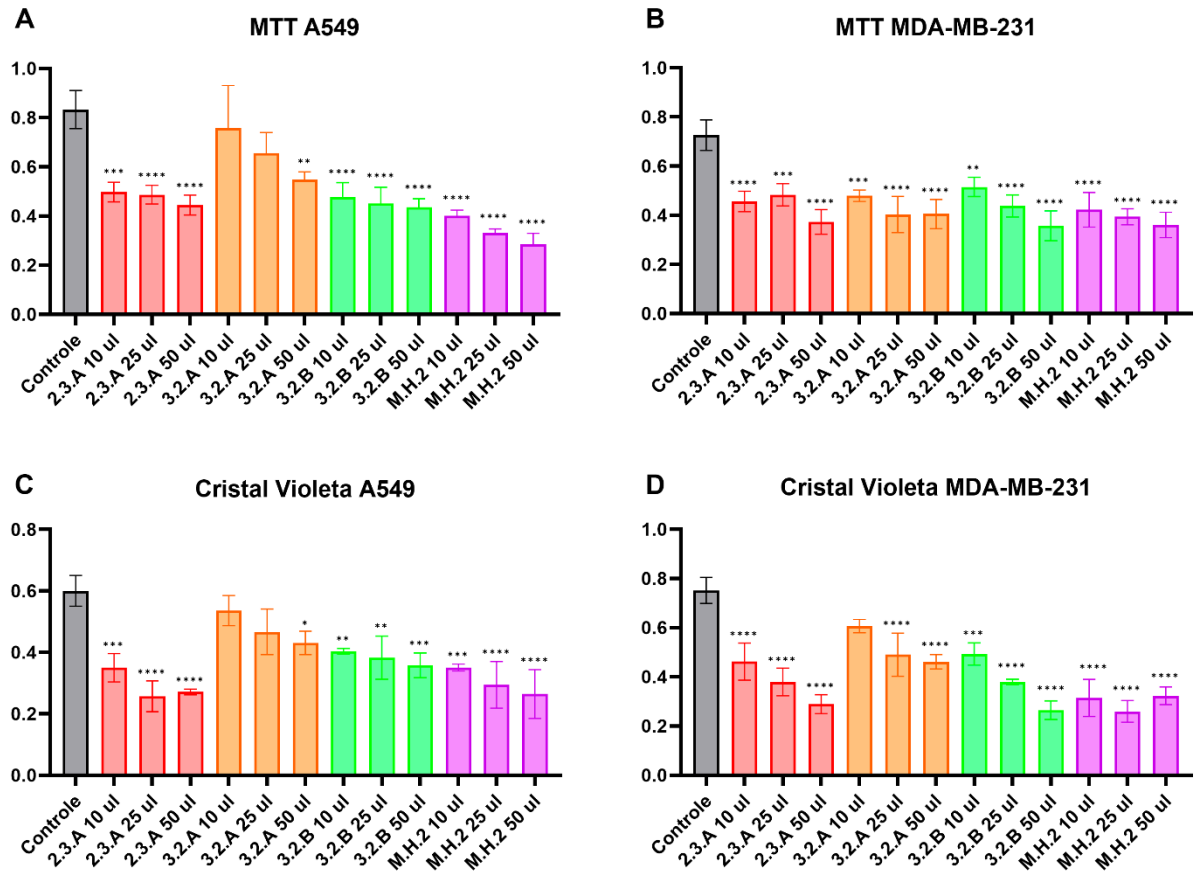
$$\%\ área\ migrada = \%\ da\ área\ de\ 0h - \%\ da\ área\ de\ 24h$$

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens de carcinoma pulmonar humano A549 e adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 foram usadas como modelo biológico para mensurar a atividade antitumoral dos metabólitos produzidos por quatro linhagens bacterianas (M.H.2; 3.2.A; 3.2.B e 2.3.A).

3.4.1 Redução da viabilidade celular dos extratos de bactérias de manguezal

Figura 11 – Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem A549 e MDA-MB-231.



Legenda explicativa: A = Resultados do ensaio de MTT em linhagem A549; B = Resultados do ensaio de MTT em linhagem MDA-MB-231; C = Resultados do ensaio de cristal violeta em linhagem A549; D = Resultados do ensaio de cristal violeta em linhagem MDA-MB-231.
Fonte: O autor.

O ensaio de MTT avalia a capacidade atividade metabólica celular, baseada na capacidade das mitocôndrias de células metabolicamente ativas em reduzir o reagente MTT, originando cristais de formazana (Ghasemi et al., 2021). O resultado do ensaio de MTT para a linhagem A549 mostra que os isolados 2.3.A, 3.2.B e M.H.2 em todos os volumes de extrato (10 µL, 25 µL e 50 µL) demonstraram uma diminuição na viabilidade celular (VC) significativa em comparação ao controle. Para o isolado 3.2.A, a queda de VC significativa foi observada apenas em volume de 50 µL. Já na linhagem MDA-MB-231, todos os isolados testados reduziram significativamente a VC em todos os volumes dos extratos testados (Fig. 11A e 11B) (Anexo B).

Já o ensaio de cristal violeta avalia a viabilidade celular por meio da quantificação de células aderidas nas placas de cultivo (Feoktistova; Geserick; Leverkus, 2016). Um resultado semelhante ao ensaio de MTT foi observado no de cristal violeta, no qual a linhagem A549 mostra que os isolados 2.3.A, 3.2.B e M.H.2, em todos os volumes de extrato demonstraram

uma diminuição na VC significativa em comparação ao controle. Para o isolado 3.2.A, a queda de VC significativa foi observada apenas em volume 50 µl. O resultado do ensaio de MTT com a linhagem MDA-MB-231 mostrou redução na VC significativa em todos os volumes dos extratos dos isolados testados (Fig. 11C e 11D) (Anexo C). Os dois ensaios apresentaram resultados consistentes, com significância estatística nos mesmos volumes de cada isolado, sugerindo que a redução na atividade metabólica observada está acompanhada pela diminuição no número de células viáveis aderidas. Esse achado indica que o tratamento exerceu efeito consistente tanto sobre a funcionalidade metabólica quanto sobre a sobrevivência celular.

A importância dos metabólitos proteicos na atividade antitumoral tem sido evidenciada em diferentes estudos. Um inibidor de serino protease recombinante do veneno da aranha marrom foi capaz de inibir a migração de células tumorais (Schemczssen-Graeff *et al.*, 2021), e a proteína D1 isolada de *Boletus bicolor* (boleto bicolor) foi capaz de inibir a proliferação da linhagem tumoral de células epiteliais de carcinoma pulmonar A549 (Zhang *et al*., 2023). Baseado nisso é possível inferir que outros organismos como as bactérias também possam ter metabólitos proteicos com atividade biológica nas vias tumorais.

Nesse sentido, a fração proteica eluída de *Streptomyces tauricus* reduziu a viabilidade celular de células PC-3 (linhagem celular de cancro da próstata humano) de forma dose dependente, sendo 87% de viabilidade celular para 50 µg de proteína, 79% para 100 µg, 71% para 150 µg e 62% para 200 µg. As concentrações da proteína foram comparadas com o tratamento com o fármaco padrão cisplatina na concentração 5 µg, que resultou em 53% de viabilidade celular (Karthik *et al.*, 2023). Neste mesmo estudo, foi encontrada a presença de peptídeos com peso molecular inferior a 1 kDa (Triprostatina B, Fumonisina B1, Microcistina LR e Surfactina C) no extrato intracelular purificado de *S. tauricus*. A presença desses compostos bioativos foi obtida a partir da cromatografia gasosa-espectrometria de massas. Esses peptídeos apresentaram efeitos anticancerígenos: a triprostatina B apresenta efeito antimitótico; a fumonisina B1 promove apoptose por meio da inibição da enzima ceramida sintetase; a microcistina LR liga-se à proteínas fosfatase/treonina, enzimas responsáveis pela remoção de fosfato de proteínas em diversas vias metabólicas; e a surfactina C pode se integrar a bicamada fosfolipídica, causando permeabilização e perturbação nas células (Karthik *et al.*, 2023). Esse achado não é apresentado como comparação direta, mas como evidência de que microrganismos, incluindo bactérias do manguezal avaliadas neste estudo, podem produzir metabólitos proteicos com efeitos semelhantes sobre a viabilidade celular tumoral. Para testar essa hipótese, uma análise com auxílio de cromatografia gasosa-espectrometria de massas será realizada.

Alguns efeitos antitumorais foram observados em uma análise sobre a interferência da combinação das cepas de *Lactobacillus sporogenes* e *Clostridium butyricum* na viabilidade celular de A549. Entretanto, as cepas de probióticos demonstraram atividade citotóxica significante contra a linhagem de adenocarcinoma de cólon HT29. *L. sporogenes* e *C. butyricum* promoveram um aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bid, Bad e Bak em células HT29, assim como a inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (Budu *et al.*, 2022). Embora se trate de microrganismos distintos dos isolados de manguezal, esse achado reforça que metabólitos bacterianos podem modular vias apoptóticas associadas à sobrevivência celular, o que pode explicar, ao menos em parte, a redução da viabilidade observada neste trabalho nas linhagens A549 e MDA-MB-231.

Algumas bactérias isoladas de manguezal também foram capazes de afetar aviabilidade celular de células tumorais, como o extrato de *Streptomyces colonosanans* MUSC 93J isolado de solo de manguezal de Kuching, estado de Sarawak, Malásia, demonstrou atividade citotóxica em células de câncer de cólon SW480, com viabilidade celular registrada em 63,6 ± 3,0% quando testadas na concentração de 400 µg/mL de extrato. Este extrato foi testado em outras linhagens de câncer de cólon (HCT-116, HT-29, Caco-2), porém não foram obtidos resultados significativos (Law *et al.*, 2017).

Os extratos de *Microbacterium mangrovi* MUSC 115T e *Monashia flava* MUSC 78T, isolados de manguezal de Tanjung Lumpur, Malásia Peninsular, que apresentaram efeitos anticancerígenos em linhagem de carcinoma cervical humano (Ca Ski). A viabilidade celular de Ca Ski foi de cerca de 60% para o tratamento com ambos os extratos à 200 µg/mL. Ao analisar o perfilamento químico dos extratos, foi observada a presença de 2,4-di-terc-butilfenol (2,4 DTBP), Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, pirazinas (compostos 19, 21, 22, 23 e 24), 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil biciclo[4.3.0]nonano e 3-benzil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo[4.3.0]nonano (BDDB), que são substâncias relacionadas a atividades anticancerígenas (Azman *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que os extratos das bactérias isoladas do manguezal apresentam efeito antitumoral significativo (Anexos B e C), evidenciado tanto pela redução da viabilidade celular quanto pela inibição da migração celular das linhagens A549 e MDA-MB-231. Observou-se que determinados isolados, como 2.3.A, 3.2.B e M.H.2, exerceram efeitos consistentes em diferentes volumes de extrato, sugerindo atividade dose-dependente e potencial relevância biológica dos metabólitos produzidos. Esses achados são consistentes com estudos prévios, como de Azman *et al.* (2017) e Law *et al*. (2017), que

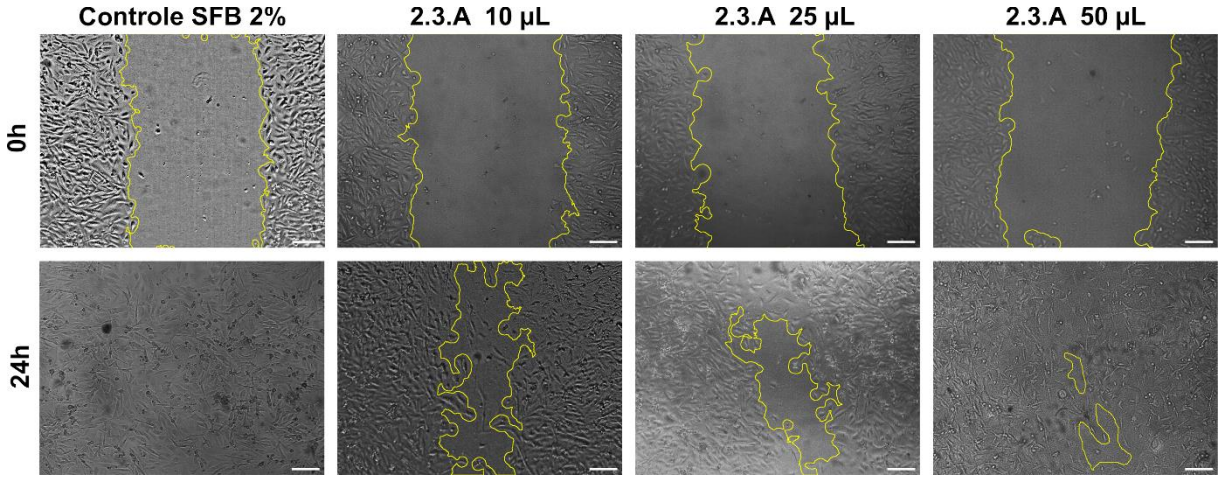
demonstraram a presença de peptídeos bioativos e compostos secundários bacterianos capazes de modular vias de apoptose, interferir na divisão celular e afetar a permeabilidade da membrana plasmática. A similaridade entre os resultados obtidos nos ensaios de MTT e cristal violeta reforça que a diminuição da viabilidade está associada tanto à redução da atividade metabólica quanto à diminuição no número de células aderidas. Assim, os dados sugerem que as bactérias de manguezal constituem uma fonte promissora de compostos bioativos com potencial aplicação antitumoral, justificando investigações futuras envolvendo a caracterização química e molecular dos metabólitos responsáveis por esses efeitos.

3.4.2 Redução da migração celular induzida pelos extratos de bactérias do manguezal

Não foi realizado o registro da migração celular na hora 0; portanto, a análise da área de migração começou a partir da hora 5 de incubação, considerada como ponto inicial. Devido à ausência da medida inicial, não foi possível realizar a análise estatística tradicional comparando a progressão da migração ao longo do tempo. No entanto, foi possível realizar uma análise qualitativa. Após 24 horas de cultivo, o grupo controle apresentou fechamento completo da área de migração. Em contraste, todos os volumes testados dos isolados 2.3.A, 3.2.A e 3.2.B não promoveram o fechamento total da área. Para o isolado M.H.2, apenas o tratamento com 10 µL resultou em fechamento completo, enquanto os volumes de 25 µL e 50 µL não atingiram esse efeito. Os resultados observados sugerem que os metabólitos produzidos pelos isolados de bactérias do manguezal (2.3.A, 3.2.A, 3.2.B e M.H.2) podem inibir a migração de células tumorais A549, indicando que esses compostos bioativos são capazes de modular mecanismos de motilidade celular e interferir em processos relacionados à invasão tumoral.

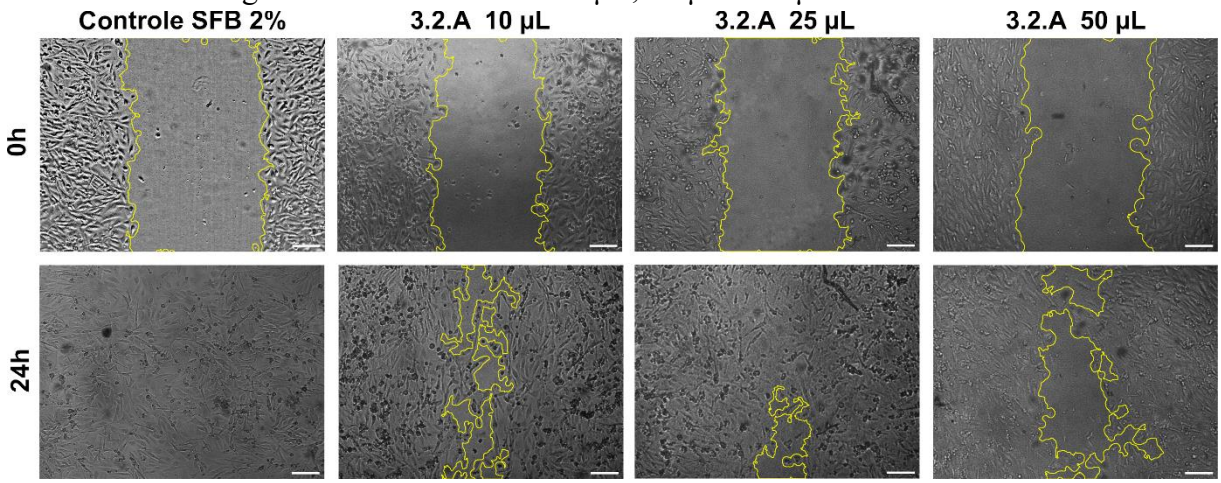
Esses resultados qualitativos de migração corroboram os achados obtidos nos ensaios de viabilidade celular (MTT e cristal violeta), nos quais os extratos bacterianos reduziram significativamente a sobrevivência e a atividade metabólica das células A549. A inibição da migração pode estar relacionada à presença de metabólitos bioativos produzidos pelos isolados, possivelmente incluindo peptídeos proteicos, que afetam a adesão celular e a motilidade, como sugerido em estudos prévios com bactérias e outros organismos. Entretanto, não foram encontrados trabalhos que abordassem especificamente o efeito de metabólitos bacterianos sobre a migração celular, o que representa uma perspectiva relevante a ser investigada em estudos futuros.

Figura 12 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 2.3.A nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL.



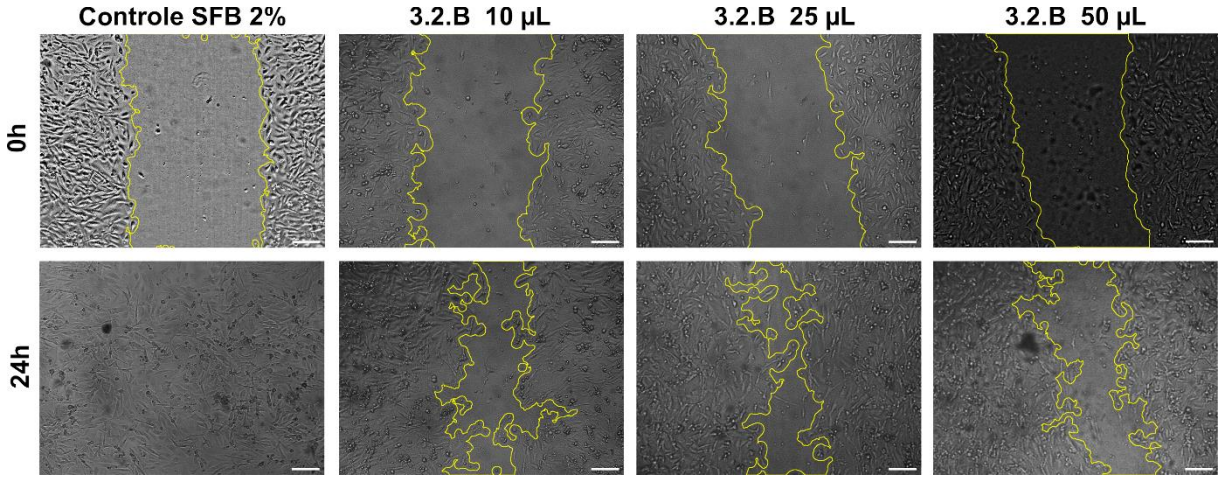
Fonte: O autor.
Escala: As imagens foram capturadas no aumento 200 X.

Figura 13 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.A nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL.



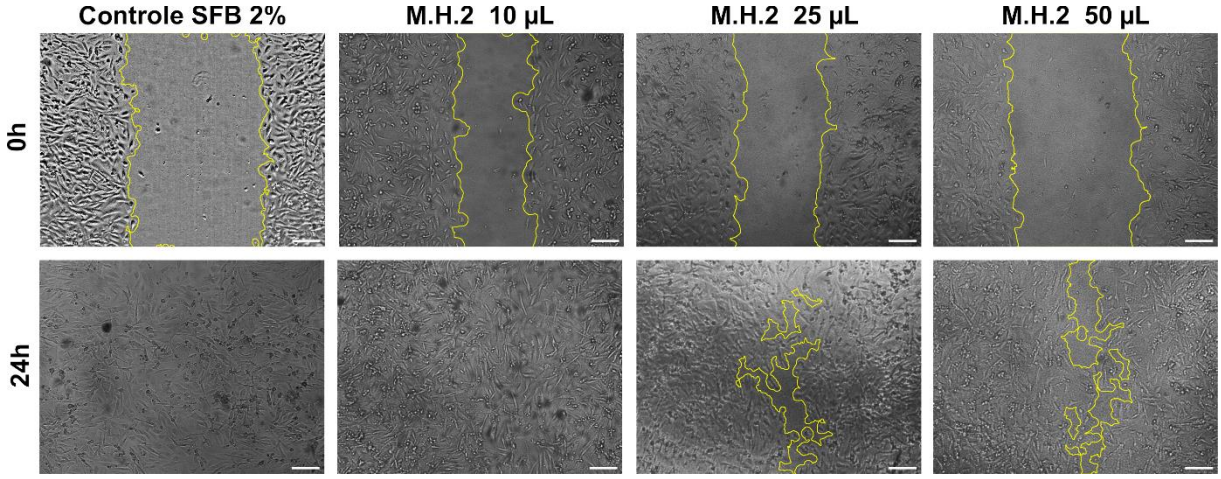
Fonte: O autor.
Escala: As imagens foram capturadas no aumento 200 X.

Figura 14 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.B nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL.



Fonte: O autor.
Escala: As imagens foram capturadas no aumento 200 X.

Figura 15 – Resultado do ensaio de migração das células A549 tratadas com os extratos da linhagem 3.2.B nos volumes 10 µL, 25 µL e 50 µL.



Fonte: O autor.
Escala: As imagens foram capturadas no aumento 200 X.

3.5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a capacidade das bactérias do manguezal em reduzir a viabilidade das linhagens tumorais A549 e MDA-MB-231, além de reduzir a migração de A549. Os resultados obtidos nos ensaios de MTT, cristal violeta e migração celular mostraram-se consistentes entre si, sugerindo que a diminuição da atividade metabólica, da adesão celular e da motilidade estão interligadas e podem corroborar um efeito antitumoral dos extratos bacterianos. Os efeitos antitumorais podem ser resultado da expressão de proteínas que

promovem atividade antimitótica e apoptose nas células, conforme descrito em estudos anteriores com metabólitos bioativos de diferentes organismos. Entretanto, há a necessidade de realizar ensaios para a determinação das proteínas com efeitos antitumorais e o sequenciamento genético para estabelecer o gênero das bactérias. Desta forma será possível identificar os metabólitos ativos produzidos, compreender seus alvos celulares e estudar com mais profundidade os mecanismos envolvidos nos efeitos antitumorais observados.

REFERÊNCIAS

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, mar. 2021.

AZMAN, A.-S. *et al.* Antibacterial, Anticancer and Neuroprotective Activities of Rare Actinobacteria from Mangrove Forest Soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 177–187, jun. 2017.

BUDU, O. *et al.* A Combination of Two Probiotics, Lactobacillus sporogenes and Clostridium butyricum, Inhibits Colon Cancer Development: An In Vitro Study. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1692, 23 ago. 2022.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb.prot087379, 2016.

GHASEMI, M. *et al.* The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 20 jan. 2025.

KARTHIK, Y. *et al.* Promising bioactive metabolites of mangrove inhabitant Streptomyces tauricus and prostate cancer PC3 cell inhibition by antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 16 jun. 2023.

KAUR, R.; BHARDWAJ, A.; GUPTA, S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 11, p. 9663–9676, 1 nov. 2023.

LAW, J. W.-F. *et al.* Streptomyces colonosanans sp. nov., A Novel Actinobacterium Isolated from Malaysia Mangrove Soil Exhibiting Antioxidative Activity and Cytotoxic Potential against Human Colon Cancer Cell Lines. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 16 maio 2017.

LIU, X.; ZHAO, H.; WONG, A. Accounting for the health risk of probiotics. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. e27908, 2024.

SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z. *et al.* Description of a serpin toxin in Loxosceles (Brown spider) venoms: Cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1607–1620, 2021.

SCHWARTZ, S. M. Epidemiology of Cancer. **Clinical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 140–149, 4 jan. 2024.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023.

TAN, L. T.-H. *et al.* Mangrove derived Streptomyces sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 38, 13 fev. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 1 fev. 2025.

ZHANG, M.-H. *et al.* Fungal antitumor protein D1 is internalized via endocytosis and inhibits non-small cell lung cancer proliferation through MAPK signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 45–57, 2023.

ANEXO A: COMPOSIÇÃO DE MEIO DULLBECO MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM) ALTA GLICOSE

A composição de DMEM alta glicose consiste em uma formulação completa contendo sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes essenciais para o crescimento celular. A preparação do meio inclui os seguintes componentes:

Para os sais inorgânicos, são adicionados $CaCl_2$ (0,2 g/L), $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (0,0001 g/L), $MgSO_4$ (0,09767 g/L), KCl (0,4 g/L), $NaHCO_3$ (3,7 g/L), NaCl (6,4 g/L) e NaH_2PO_4 (0,109 g/L). A formulação também contém aminoácidos, incluindo L-arginina • HCl (0,084 g/L), glicina (0,03 g/L), L-histidina • HCl • H_2O (0,042 g/L), L-isoleucina (0,105 g/L), L-leucina (0,105 g/L), L-lisina • HCl (1,46 g/L), L-fenilalanina (0,066 g/L), L-serina (0,042 g/L), L-treonina (0,095 g/L), L-triptofano (0,016 g/L), L-tirosina • 2Na • $2H_2O$ (0,12037 g/L) e L-valina (0,094 g/L). As vitaminas incluídas são cloreto de colina (0,004 g/L), ácido fólico (0,004 g/L), mio-inositol (0,0072 g/L), niacinamida (0,004 g/L), ácido D-pantotênico hemicalcium (0,004 g/L), piridoxina • HCl (0,004 g/L), riboflavina (0,0004 g/L) e tiamina • HCl (0,004 g/L). Como outros nutrientes, o meio contém D-glicose (4,5 g/L) e L-glutamina (0,584 g/L).

ANEXO B: ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ENSAIO DE MTT NAS LINHAGENS TUMORAIS A549 E MDA-MB-231

Análise estatística do ensaio de MTT na linhagem tumoral A549:

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,8930	12	0,07441	F (12, 26) = 16,02	P<0,0001
Residual (within columns)	0,1208	26	0,004646		
Total	1,014	38			

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
Controle vs. 2.3.A 10 ul	0,3355	0,1333 to 0,5377	***	0,0001
Controle vs. 2.3.A 25 ul	0,3462	0,1439 to 0,5484	****	<0,0001
Controle vs. 2.3.A 50 ul	0,3888	0,1866 to 0,5910	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 10 ul	0,07520	-0,1270 to 0,2774	ns	0,9728
Controle vs. 3.2.A 25 ul	0,1777	-0,02457 to 0,3799	ns	0,1264
Controle vs. 3.2.A 50 ul	0,2853	0,08306 to 0,4875	**	0,0014
Controle vs. 3.2.B 10 ul	0,3549	0,1526 to 0,5571	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 25 ul	0,3820	0,1798 to 0,5843	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 50 ul	0,3976	0,1954 to 0,5999	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 10 ul	0,4321	0,2298 to 0,6343	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 25 ul	0,5018	0,2996 to 0,7040	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 50 ul	0,5477	0,3454 to 0,7499	****	<0,0001

Análise estatística do ensaio de MTT na linhagem tumoral MDA-MB-231:

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,3397	12	0,02831	F (12, 26) = 10,30	P<0,0001
Residual (within columns)	0,07147	26	0,002749		
Total	0,4112	38			

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
Controle vs. 2.3.A 10 ul	0,2696	0,1140 to 0,4251	****	<0,0001
Controle vs. 2.3.A 25 ul	0,2427	0,08710 to 0,3982	***	0,0004
Controle vs. 2.3.A 50 ul	0,3532	0,1976 to 0,5087	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 10 ul	0,2461	0,09056 to 0,4017	***	0,0003
Controle vs. 3.2.A 25 ul	0,3225	0,1670 to 0,4781	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 50 ul	0,3208	0,1652 to 0,4764	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 10 ul	0,2103	0,05476 to 0,3659	**	0,0023
Controle vs. 3.2.B 25 ul	0,2877	0,1322 to 0,4433	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 50 ul	0,3689	0,2133 to 0,5245	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 10 ul	0,3032	0,1477 to 0,4588	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 25 ul	0,3323	0,1768 to 0,4879	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 50 ul	0,3654	0,2098 to 0,5209	****	<0,0001

ANEXO C: ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA NAS LINHAGENS TUMORAIS A549 E MDA-MB-231

Análise estatística do ensaio de cristal violeta na linhagem tumoral A549:

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,4003	12	0,03336	F (12, 26) = 12,24	P<0,0001
Residual (within columns)	0,07086	26	0,002725		
Total	0,4712	38			

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
Controle vs. 2.3.A 10 ul	0,2498	0,09490 to 0,4047	***	0,0002
Controle vs. 2.3.A 25 ul	0,3431	0,1882 to 0,4980	****	<0,0001
Controle vs. 2.3.A 50 ul	0,3290	0,1741 to 0,4839	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 10 ul	0,06397	-0,09094 to 0,2189	ns	0,9432
Controle vs. 3.2.A 25 ul	0,1333	-0,02164 to 0,2882	ns	0,1439
Controle vs. 3.2.A 50 ul	0,1694	0,01450 to 0,3243	*	0,0231
Controle vs. 3.2.B 10 ul	0,1965	0,04156 to 0,3514	**	0,0050
Controle vs. 3.2.B 25 ul	0,2176	0,06266 to 0,3725	**	0,0015
Controle vs. 3.2.B 50 ul	0,2421	0,08716 to 0,3970	***	0,0003
Controle vs. M.H.2 10 ul	0,2498	0,09486 to 0,4047	***	0,0002
Controle vs. M.H.2 25 ul	0,3058	0,1509 to 0,4607	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 50 ul	0,3358	0,1809 to 0,4907	****	<0,0001

Análise estatística do ensaio de cristal violeta na linhagem tumoral MDA-MB-231:

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,7494	12	0,06245	F (12, 26) = 23,29	P<0,0001
Residual (within columns)	0,06971	26	0,002681		
Total	0,8191	38			

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
Controle vs. 2.3.A 10 ul	0,2899	0,1363 to 0,4436	****	<0,0001
Controle vs. 2.3.A 25 ul	0,3725	0,2189 to 0,5262	****	<0,0001
Controle vs. 2.3.A 50 ul	0,4631	0,3095 to 0,6168	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 10 ul	0,1451	-0,008507 to 0,2988	ns	0,0773
Controle vs. 3.2.A 25 ul	0,2614	0,1078 to 0,4150	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.A 50 ul	0,2904	0,1368 to 0,4440	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 10 ul	0,2586	0,1049 to 0,4122	***	0,0001
Controle vs. 3.2.B 25 ul	0,3730	0,2193 to 0,5266	****	<0,0001
Controle vs. 3.2.B 50 ul	0,4875	0,3339 to 0,6411	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 10 ul	0,4376	0,2840 to 0,5913	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 25 ul	0,4919	0,3382 to 0,6455	****	<0,0001
Controle vs. M.H.2 50 ul	0,4289	0,2753 to 0,5826	****	<0,0001