



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANDERSON LUIZ PENA DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL
TECNOLÓGICO PARA O BIOCONTROLE DE BACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

**Macapá
2019**

ANDERSON LUIZ PENA DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL
TECNOLÓGICO PARA O BIOCONTROLE DE BACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Rafael Lima Resque

**Macapá
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Costa, Anderson Luiz Pena da

Caracterização de bacteriófagos com potencial tecnológico para o
biocontrole de bactérias de importância clínica / Anderson Luiz Pena da
Costa; Orientador, Rafael Lima Resque. – Macapá, 2019.

107 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Microbiologia médica. 2. Virologia. 3. Bacteriófagos. 4. Biocontrole.
5. Agente anti-infeccioso. 6. Antibiótico. I. Resque, Rafael Lima, orientador.
II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.321 C837c
CDD. 22 ed.

ANDERSON LUIZ PENA DA COSTA

BANCA EXAMINADORA

Aluno: Anderson Luiz Pena da Costa

Orientador: Rafael Lima Resque



Dr. Rafael Lima Resque / Presidente

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



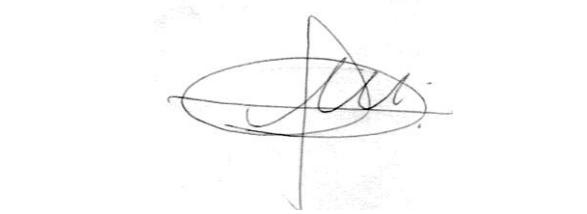
Dra. Silvia Maria Mathes Faustino / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Dr. Emerson Augusto Castilho Martins / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Medicina da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Dr. Irion Maciel Ferreira / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Aprovado em:
06/09/2019**

Pelos antibióticos:



K.626 Requiem em D menor, (MOZART, W.A., 1792-1792)

Dedico este trabalho a Deus, minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus pelo presente que é a vida.

Minha família pelo amor, compreensão e ajuda nos momentos que precisei, principalmente por parte de meu pai Nélio Luiz Ferreira da Costa, minha mãe Isis Pena do Couto, minha irmã Luisi Maria Pena da Costa e minhas tias Kátia Conceição Costa, Néia Costa e o tio Claumir.

Ao nível institucional, sou grato à Universidade Federal do Amapá e a equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e as seguintes pessoas que diretamente ou indiretamente me ajudaram: Dr. Moacir de Azevedo Monteiro Bentes Neto, Dr. Rafael Lima Reque, Dra. Mayara Amoras Teles Fujishima, Dra. Carolina Miranda de Souza Lima, Dr. Emerson Augusto Castilho Martins, Dra. Silvia Maria Mathes Faustino, Dra. Mayara Tânia Pinheiro.

Ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá e ao MSc. Antonio Carlos Souza Silva-Júnior por disponibilizar o laboratório de Microbiologia para a padronização dos experimentos.

Aos amigos Camila Tuma Ache, Mary Paes, Orlando Alves Rodrigues Neto, Ramon Diego Cunha Araújo, Gabriel de Oliveira Espindola, Tainá Lobato Vanzeler, Mayara de Fátima Brito e Brito e Yasmin Maria Nunes Cardoso por tornarem o cotidiano no laboratório e fora dele divertido.

Ao Instituto Evandro Chagas, e ao Dr. Hugo Reis Resque da seção de virologia e toda a equipe do laboratório de norovírus e outros vírus entéricos, em especial o Dr. Jones Anderson Monteiro Siqueira; ao Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior e o técnico Sanderson do laboratório de microscópia eletrônica; à Dra. Cintya de Oliveira Souza, à Dona Dolores e à Dona Socorro da Seção de Bacteriologia e Micologia por me possibilitarem ter realizado os cultivos virais para ensaios de microscopia eletrônica de transmissão e moleculares.

Aos acadêmicos do PET de enfermagem da Universidade Federal do Amapá pelo auxílio na clarificação de ideias referentes a problemática deste trabalho

E a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante o período do mestrado e que me ajudaram de alguma forma.

Muito Obrigado.

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 BACTERIÓFAGOS: BIOLOGIA, PRIMEIRAS DESCOBERTAS E APLICABILIDADE TECNOLÓGICAS.....	22
1.1.1 Biologia dos bacteriófagos.....	22
1.1.2 Histórico dos bacteriófagos como objeto de estudo e biotecnologia.....	24
1.1.3 Caracterização e classificação de bacteriófagos.....	27
1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA.....	35
1.3 ESTRATÉGIAS BACTERIANAS DE SOBREVIVÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS E IMPACTOS SOBRE A ANTIBIOTICOTERAPIA.....	37
1.3.1 Resistência bacteriana aos antibióticos.....	41
1.3.2 Persistência bacteriana aos antibióticos.....	42
1.3.3 Tolerância bacteriana aos antibióticos.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 ÁREA DE ESTUDOS.....	47
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	50
3.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	51
3.3.1 Prospecção de bacteriófagos.....	51
3.3.2 Isolamento e armazenamento de bacteriófagos.....	56
3.3.3 Determinação da amplitude de hospedeiros de bacteriófagos.....	56
3.3.4 Estabilidade de armazenamento.....	57
3.4 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E BIOLOGIA MOLECULAR.....	57
3.4.1 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.....	58
3.4.2 Caracterização molecular.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61

4.1	PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS.....	61
4.2	AMPLITUDE DE HOSPEDEIROS.....	68
4.3	ESTABILIDADE.....	72
4.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	74
4.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	83
5.	PERSPECTIVAS.....	85
5.1	APLICAÇÕES DOS BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES ANTI- INFECCIOSOS.....	86
5.2	APLICAÇÕES DE DERIVADOS DE BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES ANTI-INFECCIOSOS.....	88
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais critérios de classificação adotados pelo ICTV para a sistemática de bacteriófagos de acordo com o morfotipo.....	32
Tabela 2 -	Classificação por estrutura química, origem e mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados na prática clínica.....	38
Tabela 3 -	Características morfológicas do ensaio de placa.....	63
Tabela 4 -	Relação entre o diâmetro de placa e o tamanho de partícula viral citados.....	67
Tabela 5	Resultados dos ensaio de amplitude de hospedeiro para cada isolado viral.....	69
Tabela 6	Resultados dos ensaio de amplitude de hospedeiro para os filtrados P4CEc e P4CSa.....	70
Tabela 7	Resultados da amplitude de hospedeiros dos fagos descritos na discussão.....	72
Tabela 8	Resultados das dimensões das partículas virais dos isolados vB_EcS_IPC, vB_EcS_LMPC e vB_Sam_NLFC, e dos cinco <i>Myoviridae</i> detectados no filtrado P4CEc.....	80
Tabela 9	Resultados desritos na literatura que apontam que os fagos isolados neste trabalho possuem partículas virais muito maiores que o comum, apresentando similaridade apenas a dimensão do fagos da família <i>Siphoviridae</i> descrito por Aprea et al. (2015) e entre 2 fagos <i>Myoviridae</i> reportados por Jurczak-Kurek et al. (2016) com o isolado vB_SaM_NLFC.....	81
Tabela 10	Descrição do tamanho de partícula viral e tamanho de genoma de fagos Jumbo amplamente caracterizados presentes na literatura.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de replicação dos bacteriófagos.....	23
Figura 2	Mecanismos moleculares da resistência bacteriana aos antibióticos. 1) Modificação da permeabilidade celular, 2) bombas de efluxo, 3) modificação do alvo farmacológico, 4) degradação enzimática do antibiótico.....	42
Figura 3	Esquema da persistência bacteriana.....	43
Figura 4	Mecanismos de tolerância mediados por densidades populacionais: A) Morte altruísta, B) Interações sociais, C) Inibição biestável da maquinaria celular, e D) Biofilmes.....	45
Figura 5	Área adjacente ao ponto de coleta demonstrado a grande produtividade ecológica em decorrência de elevados níveis e fluxo de matéria orgânica, energia solar, temperatura, umidade e níveis hidricos (Latitude: 0,004812, N 0°0'17,32356", Longitude: -51,070926, W 51°4'15,33432")...	48
Figura 6	Foto do canal das pedrinhas demonstrando o fluxo fluvial, ocupação inadequada, e instalações comerciais de madeira, havendo também nas redondezas a comercialização de outros materiais de construção civil, e poluição decorrente da localização em área urbana (Latitude: 0,004812, N 0°0'17,32356", Longitude: -51,070926, W 51°4'15,33432").....	49
Figura 7	Um dos pontos de contaminação química e microbiológica na área do canal das pedrinhas (Latitude: 0,006458, N 0°0'23,247", Longitude: -51,072009, W 51°4'19,23168").....	50
Figura 8	Grandes disparidades sociais relacionadas a urbanização que contribuem para a ausência de saneamento básico inadequado no canal das pedrinhas e áreas adjacentes (Latitude: 0,008940, N 0°0'32,18472", Longitude: -51,070704, W 51°4'14,53584").....	50
Figura 9	Ponto de coleta das amostras.....	51
Figura 10	Cultivo de enriquecimento viral contendo 50 mL amostras em 40 mL de caldo Müller Hinton acrescido de 10 mL de cultura ATCC em fase exponencial de crescimento a 37°C por 24 h.....	53
Figura 11	Preparo dos filtrados de bacteriófagos. A esquerda, cultivo bacteriano após centrifugação com clorofórmio a 4000 g por 15 minutos, e a direita, filtragem da fase aquosa em membrana de 0,45 µm.....	53
Figura 12	Placas ou zonas de lise resultantes da atividade lítica de bacteriófagos sobre o crescimento bacteriano.....	54

Figura 13	Desenho esquemático da metodologia de prospecção de bacteriófagos: 1) procedimento da coleta ao cultivo de enriquecimento, 2) preparo de filtrados virais, 3) ensaio para a formação de placas de lise.....	55
Figura 14	Desenho esquemático da metodologia de isolamento de bacteriófagos.....	56
Figura 15	Preparo das placas de cobre revestidas com formvar para visualização das amostras por microscopia eletrônica de transmissão a esquerda, e microscópio eletrônico de transmissão a direita.....	58
Figura 16	Ensaio de restrição enzimática. A esquerda, acima, preparo do mix reacional, a baixo o aparato de eletroforese; e a direita, padronização da técnica de digestão com Hind III e DNA comercial do fago λ	60
Figura 17	Ensaio de prospecção de bacteriófagos. Filtados de culturas de enriquecimento com <i>Enterococcus faecalis</i> (P4CEf), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P4CPa) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (P4CKp), <i>Staphylococcus aureus</i> (P4CSa) e com <i>Escherichia coli</i> (P4CEc)	62
Figura 18	Fago vB_EcS_IPC obtido com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e isolado com de <i>Escherichia coli</i>	63
Figura 19	Fago vB_EcS_LMPC obtido com <i>Klebsiella pneumoniae</i> e isolado com <i>Escherichia coli</i>	64
Figura 20	Fago vB_SaM_NLFC obtido com <i>Enterococcus faecalis</i> e isolado com <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Figura 21	Filtrado P4CEc obtido com <i>Escherichia coli</i>	65
Figura 22	Filtrado P4CSa obtido com <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Figura 23	Isolado vB_EcS_IPC tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.	75
Figura 24	Isolado vB_EcS_LMPC tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	75
Figura 25	Isolado vB_EcM_NLFC tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	76
Figura 26	Filtrado P4CEC fago 1 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	77
Figura 27	Filtrado P4CEC fago 2 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	77
Figura 28	Filtrado P4CEC fago 3 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	78
Figura 29	Filtrado P4CEC fago 4 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	78

Figura 30	Filtrado P4CEC fago 5 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.....	80
Figura 31	Eletroforese do material de restrição das amostras P4CEc e P4CSa. No poço 3 λ +EcoRI, no poço 4 λ +HindIII, no poço 5 P4CEc + EcoRI, o poço 6 P4CEc+HindIII, no poco 7 P4CSa+EcoRi, no poço 8 P4CSa+HindIII, e nos poços 11 e 12 P4CEc e P4CSa genômico respectivamente.....	84

APÊNDICES

Apêndice 1	Modelo SIR (Apêndice matemático).....	104
Apêndice 2	Caldo Müller Hinton.....	107
Apêndice 3	Ágar Müller Hinton.....	107
Apêndice 4	Ágar Müller Hinton Semissólido.....	107
Apêndice 5	Tampão SM.....	107
Apêndice 6	Adição de NaCl e PEG 4000 para precipitação viral.....	107

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
Å	Ångström
ATCC	<i>American type culture collection</i>
Ca ²⁺	Íon Cálcio
Cd	Cauda
Cp	Capsídeo
Cl ⁻	Íon Cloro
CRISPR-Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Endonuclease Cas (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas – Endonuclease Cas)
CYP 450	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ds DNA	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
ds RNA	Ácido ribonucleico de fita dupla
h	Hora
ICTV	International Committee on taxonomy of viruses
Kbp	Kilo pares de base
M	Molar
mm	Milímetro
Na ⁺	Íon Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
N.D.	Não disponível
nm	Nanômetro
P ₃₂	Fósforo 32
P4CEc	Pedrinhas 4° coleta <i>Escherichia coli</i>
P4CEf	Pedrinhas 4° coleta <i>Enterococcus faecalis</i>
P4CKp	Pedrinhas 4° coleta <i>Klebsiella pneumoniae</i>
P4CPa	Pedrinhas 4° coleta <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P4CSa	Pedrinhas 4° coleta <i>Staphylococcus aureus</i>
PEG	Polietilenoglicol
PFU x mL ⁻¹	Unidade formadora de placa por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de comprimento de fragmento)
RPM	Rotações por minuto
S ₃₂	Enxofre 32
SIR	Suscetíveis/Infectados/Recuperados
ss DNA	Ácido desoxirribonucleico de fita simples
ss RNA	Ácido ribonucleico de fita dupla
STIV	<i>Sulfolobus turreted icosahedral virus</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris – Acetato –	(Hidroximetil)aminometano – Acetado - Ácido etilenodiamino tetraacético
EDTA	
U x mL ⁻¹	Unidade por mL
UV	Ultravioleta

v/v	Volume por volume
VB_EcoM_VR20	Vírus bacteriano isolado em <i>Escherichia coli</i> morfologia tipo Myovírus nome VR20
VB_EcS_IPC	Vírus bacteriano isolado em <i>Escherichia coli</i> morfologia tipo Siphovírus nome IPC
VB_EcS_LMPC	Vírus bacteriano isolado em <i>Escherichia coli</i> morfologia tipo Siphovírus nome LMPC
VB_KleM_Rak2	Vírus bacteriano isolado em espécie de <i>Klebsiella</i> morfologia tipo Myovírus nome Rak2
VB_PcaM_CCB	Vírus bacteriano isolado em <i>Pectobacterium carotovorum</i> morfologia tipo Myovírus nome CCB
VB_SaM_NLFC	Vírus bacteriano isolado em <i>Staphylococcus aureus</i> morfologia tipo Myovírus nome IPC
λ	Fago lambda
μL	Microlitro

RESUMO

A evolução biológica das bactérias aos antibióticos representa uma condição que implica um período de vida útil para estes fármacos, por serem moléculas estáticas e desprovidas da capacidade evolutiva. Frente a este contexto, bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) são predadores naturais de bactérias, com potencial terapêutico e biotecnológico para o controle bacteriano, com a vantagem de co-evoluirem com as bactérias. Nesse sentido, um dos primeiros estágios para o uso desses vírus para o controle biotecnológico e medicinal de bactérias nocivas é caracterizá-los. Portanto, usando testes microbiológicos de enriquecimento e isolamento viral, análise da amplitude de hospedeiros, avaliação qualitativa da estabilidade de filtrados virais obtidos ao armazenamento a 4°C, classificação viral por microscopia eletrônica de transmissão e diferenciação molecular por RFLP usando restrição enzimática com EcoRI e HindIII, este estudo buscou prospectar bacteriófagos a partir de amostras de esgoto da cidade de Macapá. Dois bacteriófagos da família Siphoviridae (vB_EcS_LMPC e vB_EcS_IPC) e um da família Myoviridae (vB_SaM_NLFC) com amplitude de hospedeiros do tipo polivalente foram isolados e mantiveram-se estáveis ao armazenamento como filtrados a 4°C por mais de seis meses. Em uma amostra amostra enriquecida com *Escherichia coli*, foram detectados cinco fagos, e o filtrado desta amostra foi efetivo contra cinco espécies bacterianas, enquanto que em outra amostra, enriquecida com *Staphylococcus aures* foi efetiva contra 3 espécies bacterianas, também mantevesse estável às mesmas condições de armazenamento, mas não foi possível a detecção de partículas virais por microscopia eletrônica de transmissão nesta amostra. No entanto, os ensaios de RFLP demonstraram a presença de dsDNA, que sugere a presença de fago(s) caudados em seu filtrado viral. Os fagos obtidos parecem ser do tipo jumbo com base na análise e comparação dos resultados com aqueles reportados na literatura. Embora investigações adicionais de caracterização e testes de aplicação devam ser conduzidos para viabilizar o desenvolvimento de produtos biotecnológicos. Os isolados e filtrados obtidos têm potencial aplicações para o biocontrole bacteriano.

Palavras-Chave: Bacteriófagos; Agente anti-infeccioso; Antibacteriano.

Agradecimentos: UNIFAP, PPGCF, IEC

ABSTRACT

Since antibiotics are static chemicals without the ability to evolve, the biological adaptation of bacteria to these medications suggests that they will have a useful life in clinical practice. In this context, bacteriophages, which are viruses that infect bacteria, are naturally occurring predators of bacteria that have the potential to be used therapeutically and biotechnologically to control bacteria. They also have the advantage of co-evolving with bacteria. In this sense, one of the first stages towards using these viruses for the biotechnological and medicinal control of harmful bacteria is characterizing them. Therefore, using microbiological tests of enrichment and viral isolation, host range analysis, qualitative assessment of the stability of viral filtrates obtained to storage at 4°C, viral classification by transmission electron microscopy, and molecular differentiation by RFLP using enzyme restriction with EcoRI and HindIII, this study sought to prospect bacteriophages from sewage samples from the city of Macapá. Two bacteriophages of the *Siphoviridae* family (vB_EcS_LMPC and vB_EcS_IPC) and one of the *Myoviridae* family (vB_SaM_NLFC) with a polyvalent host range were isolated and remained stable upon storage as filtrates at 4°C for more than six months. In one sample enriched with *Escherichia coli*, five phages were detected. The filtrate of this sample was effective against five bacterial species, while in another sample, enriched with *Staphylococcus aureus*, it was effective against three bacterial species, and also remained stable under the same storage conditions, but it was not possible to detect viral particles by transmission electron microscopy in this sample. However, RFLP assays demonstrated the presence of dsDNA, which suggests the presence of caudate phage(s) in their viral filtrate. The phages obtained appear to be of the jumbo type based on the analysis and comparison of the results with those reported in the literature. Although additional characterization investigations and application tests must be conducted to enable the development of biotechnological products, the isolates and filtrates obtained have potential applications for bacterial biocontrol.

Keywords: Bacteriophages; Anti-infective agent; Antibacterial

Acknowledgements: UNIFAP, PPGCF, IEC

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública global que limita as opções terapêuticas efetivas contra infecções bacterianas, contribui para eventos de emergência e reemergência de determinados patógenos, e ameaça seriamente a qualidade de vida e longevidades conquistadas pela humanidade em decorrência dos avanços na medicina e produção de alimentos que só se tornaram possíveis por meio dos antibióticos.

Sendo que a resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno evolutivo natural, mas que tem sido intensificado pelo uso errado e abusivo destes fármacos; implicando perda da eficácia destes medicamentos em função destes não conseguirem acompanhar a evolução biológica das bactérias. O que torna a pesquisa por novos antimicrobianos essencial para a manutenção do estado da arte atual na medicina humana e veterinária, assim como no setor agropecuário.

Neste contexto, bacteriófagos são vírus predadores naturais de bactérias, que apresentam várias vantagens como antibacterianos por acompanharem a evolução bacteriana, possuírem grande abundância e diversidade em ambientes com elevada densidade bacteriana, não causarem impactos ambientais, se auto replicarem, e serem altamente seletivos em relação às bactérias que são designados a combater; diferentemente dos antibióticos químicos que são moléculas estáticas, de mecanismos farmacodinâmicos específicos e toxicidade variável tanto ao homem quanto para o meio ambiente.

Sendo o objetivo deste trabalho caracterizar bacteriófagos isolados de um esgoto na cidade de Macapá com potencial aplicabilidade no tratamento de infecções bacterianas e biocontrole bacterianos em processos industriais. Tendo sido empregado neste estudo ensaios microbiológicos para enriquecimento e isolamento viral, análise de amplitude de hospedeiros, ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, biologia molecular e de estabilidade de armazenamento, com o intuito de obter isolados virais e descrições de algumas de suas propriedades biológicas relevantes para estudos futuros com o intuito de desenvolver formulações farmacêuticas e formas de aplicação biotecnológica.

Nos próximos elementos textuais serão apresentadas as características biológicas dos bacteriófagos, histórico como objeto de estudo em virologia e em biotecnologia, classificação e aplicabilidade, os fatores que influenciam o surgimento da resistência

bacteriana e suas consequências como problema de saúde pública; materiais e métodos, resultados obtidos e discussão com outros trabalhos.

1.1 BACTERIÓFAGOS: BIOLOGIA, PRIMEIRAS DESCOBERTAS E APLICABILIDADES TECNOLÓGICAS

1.1.1 Biologia dos Bacteriófagos

Bacteriófagos ou fagos, são vírus que infectam bactérias e utilizam de seu maquinário celular para a biossíntese de macromoléculas que constituirão as estruturas de novos fagos, que são montados no citosol bacteriano, e resultam no lise das células infectadas após a densidade de vírions ativos no meio intracelular ultrapassar o volume citoplasmático máximo que a membrana e a parede celular bacteriana são capazes de conter. Representando o lise bacteriano, o estágio final do ciclo de replicação dos bacteriófagos (HARADA et al., 2018).

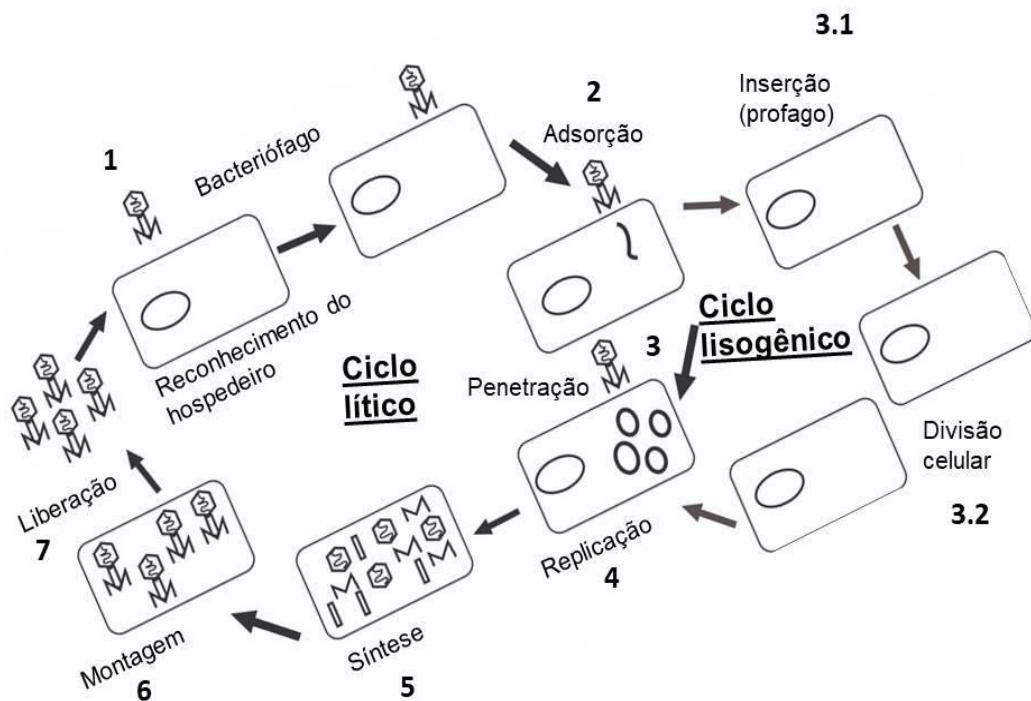
Entre estes vírus, há a ocorrência de dois tipos de ciclo de replicação (figura 4), que são intrínsecos da biologia de cada bacteriófago, que podem se replicar por meio do ciclo 1) lisogênico, também conhecido como temperado, na qual os bacteriófagos, após infectarem a célula hospedeira, mantém-se em um estado de dormência na forma de prófago (genoma viral integrado ao genoma bacteriano) por inúmeras gerações, até que um determinado estresse fisiológico ative o prófago e seja iniciado o processo de replicação, que resultará no lise bacteriano; ou do ciclo 2) lítico, na qual após a infecção da célula hospedeira, o processo de replicação se inicia imediatamente, e inevitavelmente ocorre o lise bacteriano (GREGORACCI, 2006).

Estes seres acelulares podem ser encontrados em todos os ecossistemas onde há a presença de procariontes, constituindo o táxon de maior abundância no planeta, cuja diversidade ainda não é conhecida completamente. E são responsáveis por importantes funções ecológicas de manutenção da biosfera, por meio do controle que exercem sobre as populações bacterianas responsáveis pela mineralização da matéria orgânica; assim como também da disponibilização de nutrientes para diferentes níveis tróficos (CHIBANI-CHENNOUFI, 2004).

Tal papel ecológico pode ser observado em ambientes marinhos, onde os bacteriófagos controlam as densidades populacionais de fitoplâncton e zooplâncton, e influenciam diretamente nas suas taxas de produção de biomassa e oxigênio por meio da fixação de carbono e nitrogênio por mecanismos transdutivos e também por promoverem

a liberação de nutrientes no ambiente pelo lise de células procariontes, cujos nutrientes são utilizados por diferentes comunidades microbianas e também por outros organismos dependentes da atividade microbiana (KEEN, 2016).

Figura 1 - Ciclo de replicação dos bacteriófagos.



Fonte: O autor

Além de seu papel ecológico sobre a cadeia trófica, os bacteriófagos são ativos promotores da evolução biológica entre os procariontes e consequentemente de taxa (grupos biológicos) mais complexos que são interdependentes da atividade bacteriana em seus nichos ecológicos. Sendo reportado em literatura a presença de genes que codificam proteínas envolvidas no processo da fotossíntese, que podem vir a ser expressos por bactérias; demonstrando a capacidade destes seres acelulares de promoverem a evolução entre as bactérias, e transformarem ecossistemas a partir de suas interferências sobre o metabolismo bacteriano, além de serem capazes de co-evoluir com as bactérias (SALMOND; FINEREN, 2015).

Em termos generalistas, a dinâmica evolutiva dos bacteriófagos e das bactérias pode ser descrita como um processo na qual a seleção natural impele os bacteriófagos mais virulentos a se tornarem cada vez melhores em infectar bactérias, simultaneamente impelindo as bactérias mais preparadas a se tornarem cada vez melhores em escapar dos bacteriófagos, onde ambos apostam em uma corrida armamentista evolucionária na

qual os dois correm o mais rápido o possível para não saírem da mesma posição evolutiva que ocupam (DAWKINS, 2009), sendo empregado para tal, mecanismos moleculares de ataque e de defesa, respectivamente por parte dos vírus e das bactérias.

Entre os mecanismos de defesa que os bacteriófagos induzem as bactérias a desenvolverem para se protegerem das infecções fágicas, são conhecidos até o presente momento cinco mecanismos, que são: 1) inibição da adsorção viral por meio de modificações estruturais em proteínas receptoras da superfície celular; 2) expressão do sistema restrição-modificação, onde endonucleases de restrição são capazes de reconhecer e clivar DNA exógeno não metilado; 3) processo de infecção abortiva, na qual diferentes etapas do processo de replicação são inibidas pelas células bacterianas quando o sistema restrição-modificação não é operacional; e 4) o mecanismo *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic* (CRISPR-Cas) de imunidade adaptativa, na qual as células bacterianas adquirem resistência contra certos bacteriófagos por meio de sequências curtas de 40 pares de bases separadas por sequências espaçadoras de DNA exógeno, que após serem clivadas pela endoribonuclease Cas, são reduzidas e traduzidas como um único precursor longo (ELBREKI et al., 2014).

E os bacteriófagos são capazes de acompanhar a evolução bacteriana e evadirem seus mecanismos de resistência por meio dos seguintes mecanismos: 1) produção de inibidores das endonucleases; 2) hidrólise de co-fatores do sistema restrição-modificação; 3) expressão de genes anti- CRISPR; 4) mutações que lhes conferem a capacidade de interagir com diferentes proteínas da superfície celular; e 5) expressão de despolimerases que mascaram receptores alvo “escondidos” por biomoléculas (KHAL, 2016).

1.1.2 Histórico dos bacteriófagos como objeto de estudo e biotecnologia

A atividade biológica dos bacteriófagos é conhecida há milhares de anos, havendo inúmeros relatos literários de cura de doenças bacterianas como a cólera e a hanseníase após banhos nas águas de determinados rios, como por exemplo, o rio Jordão e o rio Gandes (GOLKAR et al., 2014; KHAIRNAR, 2016), das quais, entre os relatos existentes, cuja atividade biológica descrita possivelmente esteja associada aos bacteriófagos, está a cura do general Naamã de lepra depois de se lavar no rio Jordão sete vezes conforme instruído pelo mensageiro do profeta Eliseu, de acordo com o livro de Reis II no Antigo Testamento (GOLKAR et al., 2014).

Já na literatura científica, a atividade biológica dos bacteriófagos é descrita pela primeira vez por Ernest Hankins, que em 1896, reportou a atividade antimicrobiana de

amostras de água do rio Gandes frente a bactéria *Vibrio cholera*, seguido do relato do microbiologista russo Nikolay Gamaleya, que dois anos depois reportou atividade antimicrobiana similar em amostras das águas dos rios Gandes e Jummar; vindo ambos os cientistas a atribuir tal fenômeno a uma substância química desconhecida (SULAKVELIDZE et al., 2001).

Entretanto, apesar destas, e diversas outras observações da atividade antimicrobiana em amostras de águas de determinados rios, a natureza do agente responsável e suas propriedades eram completamente desconhecidas até 1915, quando Frederick Twort observou contaminações em seus ensaios de propagação do vírus da vaccinia, e em meio a contaminação também observou zonas translúcidas, que o induziu a formular hipóteses de que tais zonas poderiam ser resultado de: 1) uma manifestação anormal do ciclo de vida das bactérias, 2) catálise enzimática de alguma reação promovida pelo metabolismo bacteriano, ou 3) efeito citopático causado por algum vírus “ultramicroscópico”; vindo a natureza viral e infecciosa do fenômeno observado, assertivamente deduzido e descrito por Twort (SALMOND; FINERAN, 2015).

Intrigado com as zonas translúcidas em seus experimentos, Twort realizou vários ensaios microbiológicos com filtrados das zonas translúcidas em diferentes cepas de bactérias, que lhe confirmaram sua terceira hipótese em função da ocorrência de infectividade entre bactérias; e além dos ensaios microbiológicos, Twort descreveu minuciosamente as características morfológicas e de formação das placas de lise, e também realizou ensaios com coelhos, nas quais aplicou os postulados de Koch para avaliar patogenicidade frente cobaias, porém não detectou a ocorrência de manifestações clínicas que demonstrassem algum sinal de patogenicidade, demonstrando seletividade parasitária dos vírus estudado por bactérias (TWORT, 1936).

E no mesmo ano da publicação de Twort, Schlesinger (1936) analisou a composição química de filtrados de lisados bacterianos promovidos por bacteriófagos, e identificou a presença de 50% de proteínas e 50% de ácido nucleico, vindo tal resultado a ser reafirmado 16 anos depois por Hershey e Chase (1952), que por meio de radiomarcação de ácido nucleico com P_{32} e de proteínas com S_{35} , encontraram a mesma proporção entre essas macromoléculas nestes vírus.

Enquanto que em 1919, Felix d'Hérelle idealizou e colocou em prática o primeiro processo biotecnológico envolvendo bacteriófagos - denominado terapia fágica -, que consistia na elaboração de coquetéis contendo bacteriófagos, que foram administrados por via oral em crianças hospitalizadas no *Hôpital des Enfantes Malade*, em Paris; obtendo um grande sucesso terapêutico com seu tratamento inovador (FRUCIANO;

BOURNE, 2007), que rapidamente atraiu o interesse científico de vários outros países europeus como a Rússia, a Polônia e a antiga União Soviética (atual Geórgia), também despertando o interesse de profissionais do novo mundo, onde pesquisadores estadunidenses obtiveram grande êxito terapêutico no tratamento de diversas infecções bacterianas em feridas abertas, feridas pós cirúrgicas, infecções crônicas e agudas do trato urinário e disenteria (ABEDON et al., 2011).

Porém, após a descoberta dos antibióticos, dentro de um contexto pós segunda guerra mundial, o foco sobre os bacteriófagos como ferramenta terapêutica foi desviado para sua utilização como organismo modelo em biologia molecular; o que possibilitou a obtenção de novas perspectivas a respeito do dogma central da biologia molecular, e tornou realidade a tecnologia do DNA recombinante e clonagem, respectivamente por intermédio da descoberta das enzimas de restrição e pela utilização de vírus lisogênicos como vetores para a clonagem de genes (KEEN, 2016)

E no âmbito da biologia molecular, os bacteriófagos também tornaram possível a descoberta do sistema de edição de genes CRISPR, que apesar de incipiente, desperta com grande vivacidade o interesse da comunidade médico científica quanto a sua aplicação na cura de doenças genéticas, e quanto a questões éticas sobre sua potencialidade de transformar a natureza conforme os interesses humanos (KEEN, 2016).

Outra tecnologia molecular que emprega bacteriófagos e que permite o estudo de moléculas que interagem com proteínas, é a tecnologia do display fágico, que foi desenvolvida em 1985 por Georgy Smith, e consiste na utilização de bacteriófagos filamentosos cujos genes que expressam os anexos estruturais de aderência à célula bacteriana são substituídos por fragmentos peptídicos de proteínas alvo, sem, no entanto comprometer a infectividade e replicação viral, possibilitando a produção de uma considerável quantidade de fragmentos peptídicos, conservando sua funcionalidade interativa com outras proteínas como receptores, anticorpos, enzimas, proteínas reguladoras, hormônios e outras biomoléculas (ARAP, 2005).

Sendo a tecnologia desenvolvida por Smith, alguns anos depois aperfeiçoada por Gregory Winter, que focou na sua utilização para a produção de anticorpos de alta especificidade para o fragmento de determinadas proteínas alvo, como por exemplo, fragmentos do fator de necrose tumoral (TNF- α), expressos por bactérias infectadas por bacteriófagos geneticamente modificados, seguida de sua exposição ao sistema imunológico de mamíferos. Vindo a viabilizar a descoberta, desenvolvimento e produção de imunofármacos de grande seletividade e eficácia para inúmeras doenças autoimunes como a artrite reumatóide, a psoríase, a doença inflamatória intestinal e processos

oncológicos, que inclusive se encontram disponíveis no mercado ou estão em fase de testes clínicos (SERVICE, 2018).

Em 2018, Smith e Winter foram reconhecidos pela importância de seus trabalhos e dividiram o prêmio Nobel pelo potencial de suas descobertas para o desenvolvimento de anticorpos humanizados e seu impacto na medicina (GIBNEY et al., 2018).

Na atualidade, com o surgimento e disseminação da resistência bacteriana pelo mundo e seu ônus para a saúde pública tornou a busca por novos antimicrobianos e estratégias para prolongar a vida útil dos antibióticos existentes no mercado um tema de grande importância. O que contribuiu para a “redescoberta” dos bacteriófagos como agentes terapêuticos, além de possibilitar a descoberta da aplicabilidade de seus derivados (endolisinhas) como agentes antibacterianos, vindo a biologia de fagos e suas aplicações receber atenção de vários centros de pesquisa renomados, como o Instituto Pauster na França e o Center for Disease Control nos Estados Unidos, e também tornando-se assunto de discussão entre agências regulatórias como o Food and Drug Administration nos Estados Unidos e a European Medicine Agency no continente europeu para delimitar padrões de utilização na terapêutica e biocontrole bacteriano em diversos ambientes, contemplando hospitais e diferentes indústrias (PELFRENE et al., 2016).

1.1.3 Caracterização e Classificação de Bacteriófagos

A classificação dos vírus é um processo analítico, cuja finalidade é generalizar e simplificar as propriedades biológicas comuns destes organismos, para facilitar comparações que possibilitem sua devida identificação para as mais variadas finalidades, como por exemplo, acadêmicas, diagnóstica, terapêutica, controle bacteriano em processos fermentativos de escala industrial, e o correto preenchimento de registros de patentes (ACKERMANN, 2011).

Em relação aos vírus, é possível observar, que com o passar dos anos, os critérios e esquemas de classificação/taxonomia tem passado por inúmeras transformações, ajustes e reajustes.

No início dos trabalhos de sistemática de vírus, o primeiro critério de classificação adotado foi a diferença e/ou especificidade de hospedeiro entre estes vírus, tendo este critério sido amplamente utilizado entre 1920-1930; até o advento da microscopia eletrônica, que durante 1940-1950, possibilitou o emprego dos caracteres morfológicos como critério de classificação e taxonomia; mas a partir da década de 1960, quando grandes avanços nos métodos bioquímicos tornaram possível a obtenção e análise de

ácidos nucleicos, informações como composição, tamanho e arquitetura dos genomas virais se tornaram outra possibilidade para a classificação e taxonomia destes seres acelulares (NELSON, 2004).

Porém, com uma grande variedade de critérios de classificação e ausência de um esquema que uniformiza-se coerentemente todos os atributos classificatórios dos vírus em um sistema universal, gerou muitos conflitos entre os microbiologistas que estudavam estes organismos. Vindo esta problemática a apresentar uma solução oficial somente em 1966, quando foi criado o *International Committee on Taxonomy of Viruse* (ICTV) durante o congresso mundial de microbiologia, que foi citado em Moscou (ROHWER; EDWARD, 2002; NELSON, 2004).

Atualmente, o ICTV é responsável por atualizar com regularidade as definições e guias de taxonomia viral, sendo esta constituída de vários subcomitês especializados, das quais o que é responsável pela classificação e taxonomia de bacteriófagos, é o subcomitê de vírus de bactérias e archeas (ADRIAENSENS; BRISTER, 2017).

O esquema de classificação mais recente do ICTV considera hierarquicamente a existência de atributos comuns entre os vírus, como morfologia, natureza dos ácidos nucleicos, propriedades bioquímicas estruturais (presença de lipídeos) e dados genômicos para a devida classificação destes seres em determinado taxa, na qual o de maior valor taxonômico é ao nível de família, visto que entre os 20-30 conceitos de espécie utilizados em biologia, o de espécie política é o de maior conveniência para os vírus, em função de estes frequentemente possuírem atributos que se analisados estritamente, permitem a classificação em mais de uma espécie (SIMMONDS; AIEWSAKUN, 2018). Sendo, por tanto, necessário o emprego de um certo grau de flexibilidade na classificação e sistemática dos vírus.

Já o esquema de nomenclatura adotado pelo ICTV, é latinizado aos níveis de ordem, família, subfamília e gênero, sendo os dois primeiros taxa caracterizados respectivamente pelos sufixos –virales e –viridae (ACKERMANN, 2011), não existindo regra definida para a elaboração do nome que designará o epíteto específico.

Entre os bacteriófagos, em função da ausência de regras para sua taxonomia ao nível de espécie, há a possibilidade de escolha entre 1) a abordagem trinomial (mais utilizada), que é constituída pelo gênero bacteriano na qual o vírus foi isolado, seguido da palavra fago, e por último o descritor de identificação, que deve ser único, como por exemplo, *Escherichia fago T4*; ou 2) a abordagem descritiva, que é constituída por um sistema de siglas que descrevem atributos como hospedeiro e morfologia, como por

exemplo, VB_EcoM_VR20, que designa um vírus bacteriano de *E. coli*, com morfologia de Myovírus, de nome VR20 (ADRIAENSSES; BRISTER, 2017).

Atualmente, o ICTV considera para bacteriófagos, a existência de 18 famílias e 3 grupos diferentes não oficiais, que são diferenciadas primariamente por tipo morfológico, que podem ser caudado (vírus portadores de cauda), poliédrica, filamentosa, ou pleomórfica (vírus sem forma definida), e depois por características de sua bioquímica estrutural (natureza de ácido nucleico, presença ou ausência de lipídeos – envelope), e genômica (tamanho e arquitetura gênica) (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012; ELBREKI et al., 2014).

Os bacteriófagos caudados são os mais abundantes, todos possuem ds DNA do tipo linear, não possuem envelope, apresentam cabeça com morfologia do tipo icosaédrica regular ou alongada, e cauda em arranjo estrutural disposto em espiral ou em forma de discos sobrepostos, com tendência a terminarem em elementos facilitadores da adesão à superfície da célula hospedeira (NOVIK et al., 2017). Bacteriófagos com estes atributos constituem a ordem *Caudovirales*, que por sua vez, engloba as famílias *Myoviridae* – bactériofagos com cauda longa e contrátil, *Siphoviridae* – bacteriófagos com cauda longa e não contrátil, e *Podoviridae* – bacteriófagos com cauda curta (NELSON, 2004).

Os vírus da ordem *Caudovirales*, tendem a apresentar grande resistência a ambientes secos, sendo também capaz de sobreviver a grandes flutuações de temperatura, e conseguem permanecer estáveis em intervalos de pH entre 5-6, podendo serem isolados dos mais variados ambientes (JOŃCZYK et al., 2011).

Já Bacteriófagos de morfologia poliédrica podem ser divididos em 5 famílias (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectoviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*) e dois grupos (SH1 e STIV), que se distinguem por diferenças em atributos de sua bioquímica estrutural (ACKERMANN, 2011).

A família *Microviridae* engloba todos os bacteriófagos que possuem genoma constituído por ss DNA circular, capsídeo composto por 12 proteínas, e tamanho aproximado de 27 nm, com forma similar a um botão. Sendo os vírus desta família conhecidos por sobreviverem ao congelamento em temperaturas da ordem de -196 °C, apresentarem uma relativa amplitude de hospedeiro para os gêneros *Bdellovibrio*, *Chlamydia*, *Spiroplasma* e alguns membros da família Enterobacteriaceae (ACKERMANN, 2011; JOŃCZYK et al., 2011; NOVIK et al., 2017).

A família *Corticoviridae*, por sua vez, é constituída por bacteriófagos que possuem genoma constituído por ds DNA circular, capsídeo de aproximadamente 63 nm, que

contém em sua composição lipídeos que os tornam complexos (ACKERMANN, 2011). Muitos dos vírus desta família requerem concentrações de íons Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- na ordem de mmol/L, e intervalos de pH entre 6-8 para sobreviverem, sendo o capsídeo destes vírus extremamente sensível a temperaturas abaixo de 0° C (JOŃCZYK et al., 2011).

Os bacteriófagos pertencentes a família *Tectiviridae* apresentam genoma constituído por ds DNA linear, capsídeo de aproximadamente 60 nm, pseudo-cauda, e possuem uma vesícula lipoproteica, geralmente apresentando estabilidade estrutural e funcional em meios com valores de pH entre 5-8 (JOŃCZYK et al., 2011). Estes vírus são capazes de infectar bactérias entéricas e *Pseudomonas aeruginosa*, porém apenas cepas portadoras e com expressão ativa dos plasmídeos conjugativos dos tipos N, P ou W, que atuam como receptores para a adsorção viral (NOVIK et al., 2017).

Os integrantes da família *Leviviridae* apresentam vírions de aproximadamente 23 nm, com morfologia similar a do poliovírus, seu genoma é constituído por ss RNA linear (ACKERMANN, 2011), e sua amplitude de hospedeiro se restringe a coliformes que expressam o plasmídeo que codifica o F-pile, que atua como receptor para a adsorção dos vírus desta família na célula hospedeira (NOVIK et al., 2017).

Segundo Jończyk et al. (2011), os vírus da família *Leviviridae* possuem preferência por ambientes alcalinos, e apresentam considerável termoestabilidade, mantendo sua viabilidade estrutural em valores de pH que variam de 6-8.

Já os bacteriófagos pertencentes a família *Cystoviridae*, possuem genoma constituído por ds RNA linear dividido em seguimentos, são envelopados, e seus vírions tendem a medir aproximadamente 70-80 nm, requerendo ambientes com pH próximo de 6 para a manutenção de sua estabilidade estrutural e funcionalidade. Em termos de amplitude de hospedeiro, a família *Cystoviridae* possui alta seletividade para o fitopatógeno *Pseudomonas syringae* (ACKERMANN, 2011; NOVIK et al., 2017).

Os vírus dos grupos SHI e STIV apresentam respectivamente genoma constituído de ds DNA linear e circular, sendo que o único SHI registrado possui muita similaridade com a família *Tectiviridae*, mas se diferencia desta por ser encontrado apenas em um lago hipersalino na Austrália e infectar apenas os gêneros *Halorubrum* e *Haloarcula*; enquanto o único fago do grupo STIV é encontrado apenas em uma fonte térmica no parque nacional Yellowstone nos Estados Unidos, possuindo em seu capsídeo protrusões em forma de torre, e infecta apenas a archea hipertermofíla *Sulfolobus solfataricus* (ACKERMANN, 2007).

Em relação aos bacteriófagos que apresentam em comum a morfologia do tipo filamentosa, ou de forma de bastão, estes podem ser agrupados em quatro famílias

diferentes (*Inoviridae*, *Clavaviridae*, *Lipothrixviridae* e *Rudiviridae*), que se distinguem por aspectos estruturais de sua bioquímica, genômica e biológica, considerando sua amplitude de hospedeiros (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012; ELBREKI et al., 2014; NOVIK et al., 2017).

Os bacteriófagos inseridos na família *Inoviridae* apresentam genoma ss DNA circular, morfologia similar a bastões ou filamentos com dimensões entre 85-1950 x 7 nm, geralmente são sensíveis a valores ácidos de pH (preferindo valores de pH entre 6-9), ao clorofórmio, e a tratamentos ultrassônicos, porém possuem considerável termoestabilidade (ACKERMANN, 2011). Muitos dos bacteriófagos desta família são parasitas seletivos de micoplasmas (NOVIK et al., 2017).

A família *Clavaviridae* não possui muitas características descritas, sendo inclusive considerada uma nova família de fagos, ainda sujeita a revisão pelo ICTV; apresentando este táxon como características estruturais a morfologia de bastão e genoma constituído por ds DNA circular (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

A família *Lipothrixviridae* e a família *Rudiviridae* incluem bacteriófagos que infectam archeas, sendo estes vírus facilmente encontrados em aquíferos termais de pH ácido, e que além deste aspecto, e da morfologia, também possuem em comum a constituição de seus genomas (ds DNA linear), diferenciado-se uma família da outra pela presença de envelope, que é um elemento estrutural presente nos vírus da família *Lipothrixviridae* e ausente nos vírus da família *Rudiviridae*, que por sua vez, possuem elementos especiais de adsorção (ACKERMANN, 2011; JOŃCZYK et al., 2011; NOVIK et al., 2017).

Os bacteriófagos de morfologia pleomórfica podem ser agrupados em seis famílias distintas, que são as famílias *Plasmaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*, *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae* e *Globulaviridae*, e um grupo, o *Salterprovirus* não oficial.

A família *Plasmaviridae* é composta por bacteriófago que possuem envelope e são desprovidos de capsídeo proteico, tendo material genético constituído de ds DNA circular, e partícula viral de aproximadamente 80 nm; e a família *Fuselloviridae*, cujos bacteriófagos apresentam genoma constituído de ds DNA circular, e não possuem envelope. Sendo uma característica discriminatória marcante entre as duas famílias a sensibilidade térmica comum entre os vírus da família *Plasmaviridae*, e a termorresistência intrínseca dos vírus da família *Fuselloviridae*, que são facilmente encontrados em fontes termais ácidas (ACKERMANN, 2011; JOŃCZYK et al., 2011).

As famílias *Globulaviridae* e *Ampullaviridae* apresentam genoma constituído de ds DNA linear, e se diferenciam quanto a morfologia e amplitude de hospedeiros, na qual os fagos da família *Globulaviridae*, isolados de uma fonte termal na Itália, apresentam vírions

esféricos com envelope lipídico e são capazes de infectar apenas os gêneros *Pyrobaclum* e *Thermoproteus*; enquanto a família *Ampullaviridae* possui como principal característica estrutural a forma de garrafa (única entre os vírus) e infecta apenas a espécie *Acidum convivator* (ACKERMANN, 2007; ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

A família *Bicaudoviridae*, possui material genético constituído de ds DNA circular, pode ser encontrada em ambientes com temperatura entre 75 à 90°C, infectam apenas archeas, e possui como principal característica, partículas virais esféricas com estruturas similares a caudas em suas extremidades (ACKERMANN, 2007); enquanto a família *Guttaviridae* possui genoma de ds DNA circular e segmentado, e possui uma forma que lembra uma gota (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

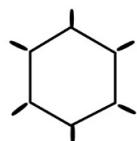
E os fagos pertencentes ao até então grupo *Salterprovirus*, cujo o reconhecimento como família está em consideração pelo ICTV, possui como características estruturais a morfologia similar aos fagos da família *Fuselloviridae*, porém possui genoma de ds DNA linear e segmentado (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

As características estruturais e morfológicas de cada família e grupo de fagos podem ser melhor compreendidas após a visualização da tabela 1.

Tabela 1 - principais critérios de classificação adotados pelo ICTV para a sistemática de bacteriófagos de acordo com o morfotipo

Forma do virion livre	Ordem	Família/Grupo	Propriedades
Caudada	<i>Caudovirales</i>		
		<i>Myoviridae</i>	ds DNA linear, sem envelope, cauda contrátil
		<i>Siphoviridae</i>	ds DNA linear, sem envelope, cauda não contrátil
		<i>Podoviridae</i>	ds DNA linear, sem envelope, cauda curta

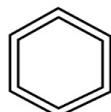
Poliédrica



Microviridae ss DNA circular, capsídeo de 27 nm, capsômeros parecidos com botões



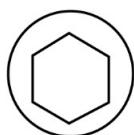
Corticoviridae ds DNA circular, capsídeo complexo, virion de 63 nm



Tectiviridae ds DNA linear, capsídeo de 60 nm, com vesícula lipídica interna, pseudocaudado



Leviviridae ss RNA linear, capsídeo de 23 nm similar ao do poliovírus



Cystoviridae ds DNA linear segmentado, envelopado, capsídeo de 70-80 nm



SHI ds DNA linear, vesícula lipídica interna,



STIV ds DNA circular, protrusões em forma de torre

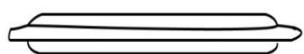
Filamentosa



Inoviridae ss DNA circular, forma de filamentos ou bastões de 85-1950 x 7 nm



Rudiviridae ds DNA linear, não envelopado, com elementos especiais de adsorção



Lipothrixviridae ds DNA linear, envelopado



Clavaviridae ds DNA circular, forma de bastão

Pleomorfica



Plasmaviridae ds DNA circular, envelopado, sem capsídeo proteíco



Fuselloviridae ds DNA circular, não envelopado



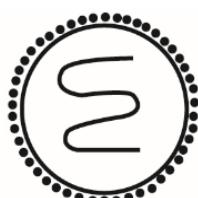
Guttaviridae ds DNA circular e segmentado, com forma de gota



Ampullaviridae ds DNA linear, com forma de garrafa



Bicaudaviridae ds DNA circular, com duas estruturas similares a caudas



Globulaviridae ds DNA linear, envelopados, com morfologia similar ao Paramyxovírus



Salterprovirus ds DNA linear e segmentado, com morfologia similar aos *Fuselloviridae*

Fonte: O autor, adaptado de Ackermann (2007), Ackermann (2011), Ackermann e Prangishvili (2012) e Elbreki et al. (2014)

1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

Os antibióticos são fármacos que tem revolucionado a medicina, por lhe proporcionar inúmeros avanços como cirurgias cardíacas, transplante de órgãos e tratamentos profiláticos ou terapêuticos, para pacientes imunodeprimidos, seja por doença ou tratamento com imunossupressores ou quimioterápicos, vindo a contribuir significativamente nas reduções de morbidade e mortalidade global, contudo, a resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno biológico que tem sido reportado como problema clínico desde a década de 1950, e com profunda intensificação no decorrer dos anos, o que ameaça severamente a eficácia dos antibióticos (VENTOLA, 2015).

Representando um sério problema de saúde pública, pois torna reduzida as opções terapêuticas contra infecções bacterianas, aumenta consideravelmente o número de complicações clínicas, que tornam o tratamento mais complexo, longo e oneroso para os pacientes e os serviços de saúde (SIQUEIRA, 2004), pois as taxas de recuperação entre pacientes infectados por patógenos resistentes é maior do que quando comparado a casos de infecções causadas por microrganismos patogênicos sensíveis aos antibióticos, o que implica maior período de doença e transmissibilidade em casos onde há resistência (SPICKNALL et al., 2013).

Neste contexto, projeções com base em modelagem matemática do tipo SIR (apêndice 1), com os compartimentos Suscetíveis/Colonizados/Infectados/Recuperados e calibração com base nos dados epidemiológicos do *National Health and Nutrition Examination Survey Colonization*, considerando competição na colonização de hospedeiros entre populações de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina, e uma vacina hipotética, demonstraram que no cenário atual, onde existe grande pressão seletiva exercida pelos antibióticos no meio, após 5 anos de cobertura vacinal a redução calculada no número de casos foi de 12%, com apenas 6% de redução na incidência (HOGEA et al., 2014). Demonstrando que a resistência bacteriana aos antibióticos tende a ser um problema de saúde duradouro.

Ressaltando que a resistência microbiana aos antimicrobianos não é um fenômeno exclusivo de bactérias, também sendo reportado a ocorrência de resistência viral aos antivirais, de parasitas aos antiparasitários e fungos aos antifúngicos (LEVY; MARSHALL, 2004); o que influencia na dinâmica das doenças infecciosas nas populações humanas,

por prolongar os períodos de doenças e transmissibilidade, e com isso aumentar as possibilidades de indivíduos suscetíveis interagirem com indivíduos infectados e contraírem doença (SIETTOS; RUSSO, 2013); favorecendo a emergência e reemergência de doenças infecciosas (COHEN, 2000; HEYMANN; DAR, 2014). Ressaltando que 20% do número registrado de eventos epidêmicos de emergência e reemergência entre 1940 e 2004 são resultado da evolução da resistência aos antimicrobianos (JONES et al., 2008; KEESING et al., 2010).

Sendo a resistência bacteriana aos antibióticos um problema atribuído ao uso excessivo ou em doses subterapêuticas de antibióticos, em decorrência de prescrições inappropriadas (VENTOLA, 2015). Além do fácil acesso a estes fármacos em localidades onde não há o devido controle da comercialização, uso extensivo na agricultura e formulação de produtos sem fins terapêuticos, como cosméticos (SILVA et al., 2012; ORÚS et al., 2015), além da elevada presença destas substâncias em esgotos, que favorecem a seleção da resistência em cepas ambientais (ASOKAN; KASIMANICKAN, 2013).

Neste âmbito, também é importante ressaltar que a resistência bacteriana aos antibióticos não é um fenômeno estático entre as populações bacterianas, havendo uma grande variedade de mecanismos de base genética que conferem às bactérias a capacidade de desenvolver e transmitir a resistência, como 1) os íntegrons, que são elementos da genética bacteriana que lhes permitem a inserção acumulativa de material genético ao nível cromossômico por meio de integrases; e 2) os transponsons, que são elementos móveis dentro do genoma bacteriano, aos níveis de cromossomo e plasmídios; resultando ambos os mecanismos em variabilidade genética que podem gerar variações gênicas que tornem as bactérias adaptadas a determinados estresses, incluindo os antibióticos (SULTAN et al., 2018). Existindo também mecanismos de transferência horizontal de genes, como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução (DZIDIC et al., 2008; COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2016).

Entretanto, deve ser considerado que eventos adaptativos selecionados pelo meio apresentam um custo biológico denominado *fitness*, que no caso das estratégias de sobrevivência bacteriana aos antibióticos culminam com a redução da velocidade de crescimento e replicação, que é mais lenta quando comparada com cepas sensíveis (ANDERSSON, 2006). O que implica duas possibilidades de combate: 1) a inibição do desenvolvimento da resistência bacteriana por meio do planejamento e desenvolvimento de fármacos cujo custo biológico da resistência seja muito oneroso; ou 2) a restauração da sensibilidade bacteriana aos antibióticos por meio da diminuição da pressão seletiva

dos antibióticos no ambiente para que o equilíbrio populacional entre cepas resistentes e cepas sensíveis se desloque a favor da sensibilidade aos antibióticos (ANDERSSON; HUGHES, 2011).

Contudo, a redução do uso dos antibióticos no cenário atual não representa uma solução muito prática, e junto a isso, a seleção e evolução da resistência a estes fármacos no meio ambiente dificultam muito o combate à resistência devido aos mecanismos de transferência horizontal de genes mencionados acima (BLANQUART et al., 2018). O que torna a resistência bacteriana aos antibióticos um problema duradouro e de difícil controle, mesmo com a redução do uso dos antibióticos (ANDERSSON, 2006).

Fazendo com que a compreensão da dinâmica deste fenômeno entre as populações bacterianas e entre as populações humanas seja essencial para a elaboração de estratégias de prevenção, da mesma forma que a compreensão acerca dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência para direcionar o contínuo planejamento e desenvolvimento de novos antimicrobianos (DUARTE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

1.3 ESTRATÉGIAS BACTERIANAS DE SOBREVIVÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS E IMPACTOS SOBRE A ANTIBIOTICOTERAPIA

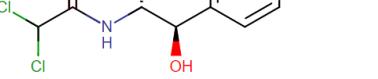
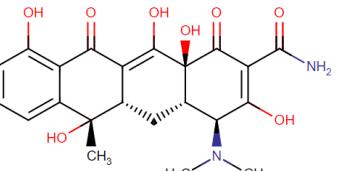
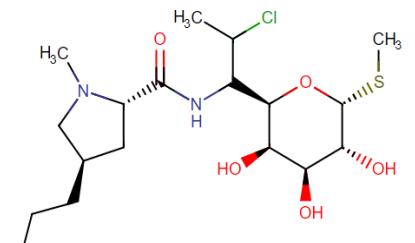
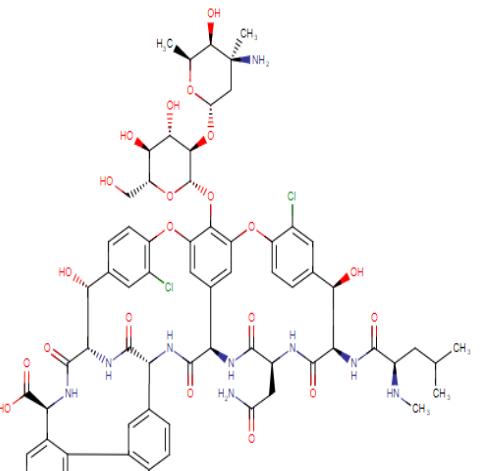
Os antibióticos são moléculas que podem apresentar as mais diversas estruturas e origens, o que possibilita a aplicação de diferentes sistemas de classificação para estes fármacos (tabela 2), incluindo seus mecanismos de ação, que de forma genérica, inibem processos vitais na célula bacteriana após atingirem determinada concentração no citosol bacteriano e interagirem com um ligante específico (alvo farmacológico), que desencadeiam a inibição do crescimento ou a morte bacteriana (DZIDIC et al., 2008; DUARTE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010), que pode se dar por meio inibição da síntese de peptidoglicano e parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese de proteínas, danos à integridade da membrana celular, e inibição de processos metabólicos por meio de substâncias estruturalmente análogas a intermediários do metabolismo energético ou anabólico (LEVY; MARSHALL, 2004).

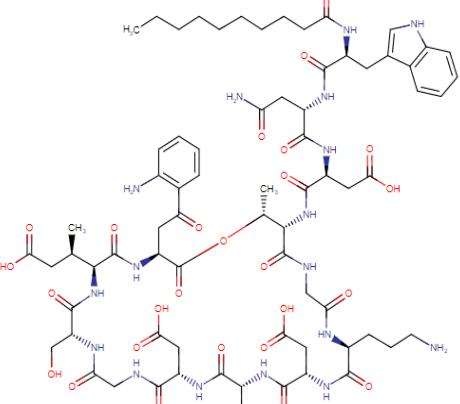
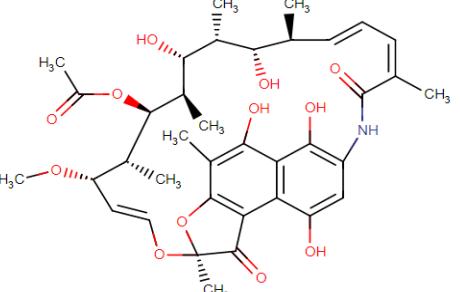
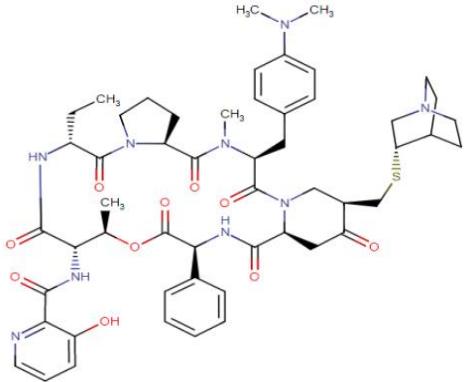
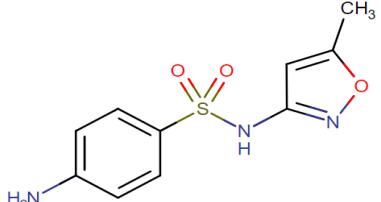
Nesta perspectiva, a eficácia dos antibióticos pode ser ameaçada por diferentes mecanismos bioquímicos e celulares envolvidos em diferentes processos, como 1) a resistência que resulta na perda total da eficácia dos antibióticos, 2) a persistência e ou 3) a tolerância aos antibióticos, que resultam na necessidade de extensão do período de

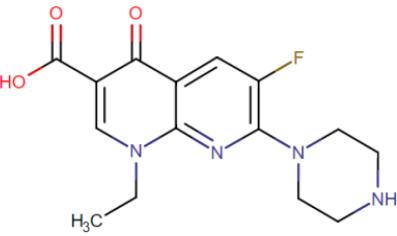
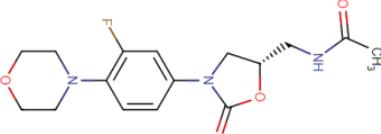
tratamento para que a resposta esperada destes fármacos não seja perdida (BRAUNER et al., 2016).

Tabela 2 - Classificação por estrutura química, origem e mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados na prática clínica.

Classe Química (Exemplos)	Fórmula estrutural	Origem	Mecanismo de ação
Beta-lactâmicos (Penicilina)		Natural	Inibição da síntese de parede celular por inibição da enzima transpeptidase
Aminoglicosídeos (Estreptomicina)		Natural	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 30S
Macrolídeos (Eritromicina)		Natural	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 50S

Cloranfenicol	 (Drugbank, 2019)	Natural	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 50S
Tetraciclinas (Clortetraciclina)	 (Drugbank, 2019)	Natural	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 30S
Lincosaminas (Clindamicina)	 (Drugbank, 2019)	Semissintética	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 50S
Glicopeptídeos (Vancomicina)	 (Drugbank, 2019)	Natural	Bloqueio da formação de parede celular por meio de complexações com as cadeias peptídicas não ligadas

<p>Lipodepsipeptídeos (Daptomicina)</p>	 <p>(Drugbank, 2019)</p>	<p>Natural</p>	<p>Afeta a permeabilidade da membrana celular e inibe a síntese do ácido pipoteicóico (componente da membrana externa de gram negativos)</p>
<p>Rifamicinas (Rifamicina B)</p>	 <p>(Drugbank, 2019)</p>	<p>Semissintética</p>	<p>Inibição da síntese de RNA pela inibição da RNA polimerase dependente de DNA</p>
<p>Estreptograminas (Quinupristina)</p>	 <p>(Drugbank, 2019)</p>	<p>Semissintética</p>	<p>Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 50S</p>
<p>Sulfonamidas (Sulfametoxazol)</p>	 <p>(Drugbank, 2019)</p>	<p>Sintética</p>	<p>Inibição da síntese de cofatores para a síntese de DNA por meio da inibição da dihidropteroato sintetase</p>

Quinolonas e flouroquinolonas (Enoxacina)		Sintética	Bloqueio da síntese e reparo de DNA pela inibição da enzima DNA girase
Oxazolidinonas (Linezolida)		Sintética	Inibição da síntese proteica por meio de ligação irreversível com a subunidade ribossomal 50S

Fonte: O autor, Adaptado de Guimarães et al., (2010).

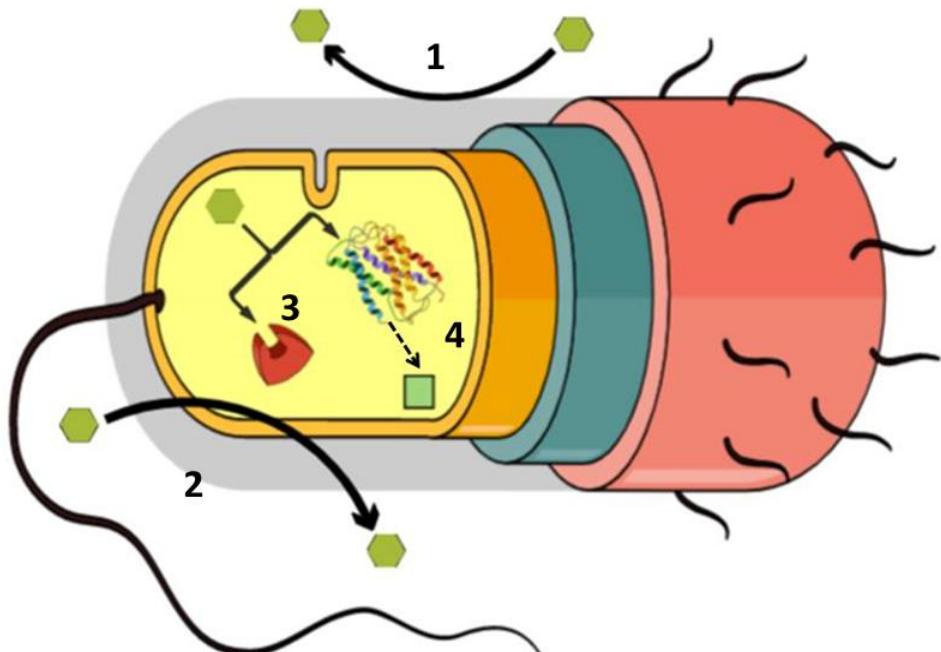
1.3.1 Resistência bacteriana aos antibióticos

Do ponto de vista biológico, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno que pode ser classificado de duas formas: 1) intrínseca, nas quais determinadas características de certas espécies de bactérias as tornam naturalmente resistentes contra a ação de um dado antibiótico em função de algum aspecto estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR et al., 2015); ou 2) adquirida por meio de mutações espontâneas ou induzidas, assim como por intermédio de mecanismos de transferência horizontal de genes, como a transdução, conjugação e a transformação (TAVARES, 2000; DZIDIC et al., 2008; COSTA, 2016), que invariavelmente permitem as bactérias a sobreviverem em altas concentrações de antibióticos, independentemente do tempo de exposição (BRAUNER et al., 2016).

Neste contexto, a partir de uma perspectiva farmacológica e bioquímica, as bactérias portadoras de resistência aos antibióticos, possuem maior adaptabilidade a pressão seletiva que os antibióticos exercem sobre o meio, por serem capazes de expressarem mecanismos de resistência (figura 1), que impedem a interação do fármaco com seu alvo farmacológico, consequentemente inibindo a ocorrência da resposta farmacodinâmica, seja ela bacteriostática ou bactericida. Sendo reportado na literatura a existência de 4 mecanismos moleculares, que são 1) a alteração da permeabilidade da membrana celular ao fármaco, 2) sistemas de efluxo, que impedem que o fármaco

alcance concentração suficiente para que a ação farmacológica ocorra 3) alteração estrutural do alvo farmacológico sem alteração de sua função, e 4) inativação do fármaco por reações enzimáticas (SIQUEIRA, 2004; SILVEIRA et al., 2006; GUSTAVO, 2008; BAPTISTA, 2013; KUMAR; VARELA, 2013).

Figura 2 - Mecanismos moleculares da resistência bacteriana aos antibióticos. 1) Modificação da permeabilidade celular, 2) bombas de efluxo, 3) modificação do alvo farmacológico, 4) degradação enzimática do antibiótico.



Fonte: O autor

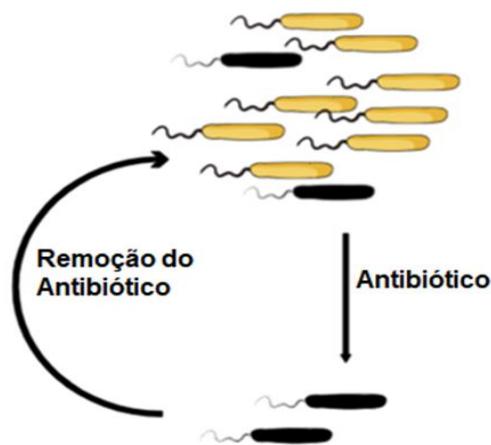
1.3.2 Persistência bacteriana aos antibióticos

Persistência aos antibióticos (figura 2) é um termo que descreve em uma população bacteriana a coexistência de uma subpopulação sensível aos antibióticos e outra subpopulação menor, denominada persistente, que possui a capacidade de sobreviver em elevadas concentrações de antibióticos por um período maior do que as demais células bacterianas (BRAUNER et al., 2016). Ocorrendo a persistência bacteriana aos antibióticos em função da existência de heterogeneidade fenotípica entre essas duas subpopulações, que se diferenciam apenas em suas propriedades de crescimento, que é mais lento nas células persistentes, o que prolonga sua sobrevivência quando sujeitas a estresses letais, o que permite o recrescimento da população total quando o estresse é removido (PATRA; KLUMPP, 2013).

Sendo importante ressaltar que este não é um fenômeno genotípico, mas sim fenotípico, e de ocorrência estocástica, devido à variabilidade com que as condições

desfavoráveis se manifestam no meio (FISHER et al., 2017), na qual o principal mecanismo molecular associado a este fenômeno é o sistema modular de genes cromossomais ou plasmidiais denominado toxina-antitoxina, que codifica proteínas denominadas toxinas, que inibem processos celulares seletivamente, como a replicação de DNA, síntese de parede celular e de proteínas, entre outros, com o intuito de induzir a célula para um estado de crescimento lento ou latência, para resistirem a estresses como pouca disponibilidade de nutrientes e antibióticos; sendo o retardamento induzido pelas toxinas cessado por outras proteínas do sistema toxina-antitoxina denominadas antitoxinas , que são sintetizadas após a remoção do estresse (SULTAN et al., 2018).

Figura 3 - Esquema da persistência bacteriana.



Fonte: O autor

1.3.3 Tolerância bacteriana aos antibióticos

Tolerância bacteriana aos antibióticos é um termo que descreve uma redução da suscetibilidade aos antibióticos em decorrência de baixa afinidade do fármaco pelo seu alvo farmacológico, ou metabolismo lento induzido por estresse (FISHER et al., 2017), o que torna necessário a extensão do período de tratamento para que as bactérias tolerantes sejam erradicadas (BRAUNE et al., 2016).

Estando também associado a tolerância aos antibióticos diferentes mecanismos fenotípicos similares a persistência, que ocasionam em ineficiência ou ausência de determinados processos bioquímicos/celulares que resultam em uma morte muito mais lenta entre as células tolerantes, mesmo na presença de elevadas concentrações de antibióticos (CHARPENTIER; TOUMANEN, 2000); além de mecanismos de natureza social entre comunidades bacterianas.

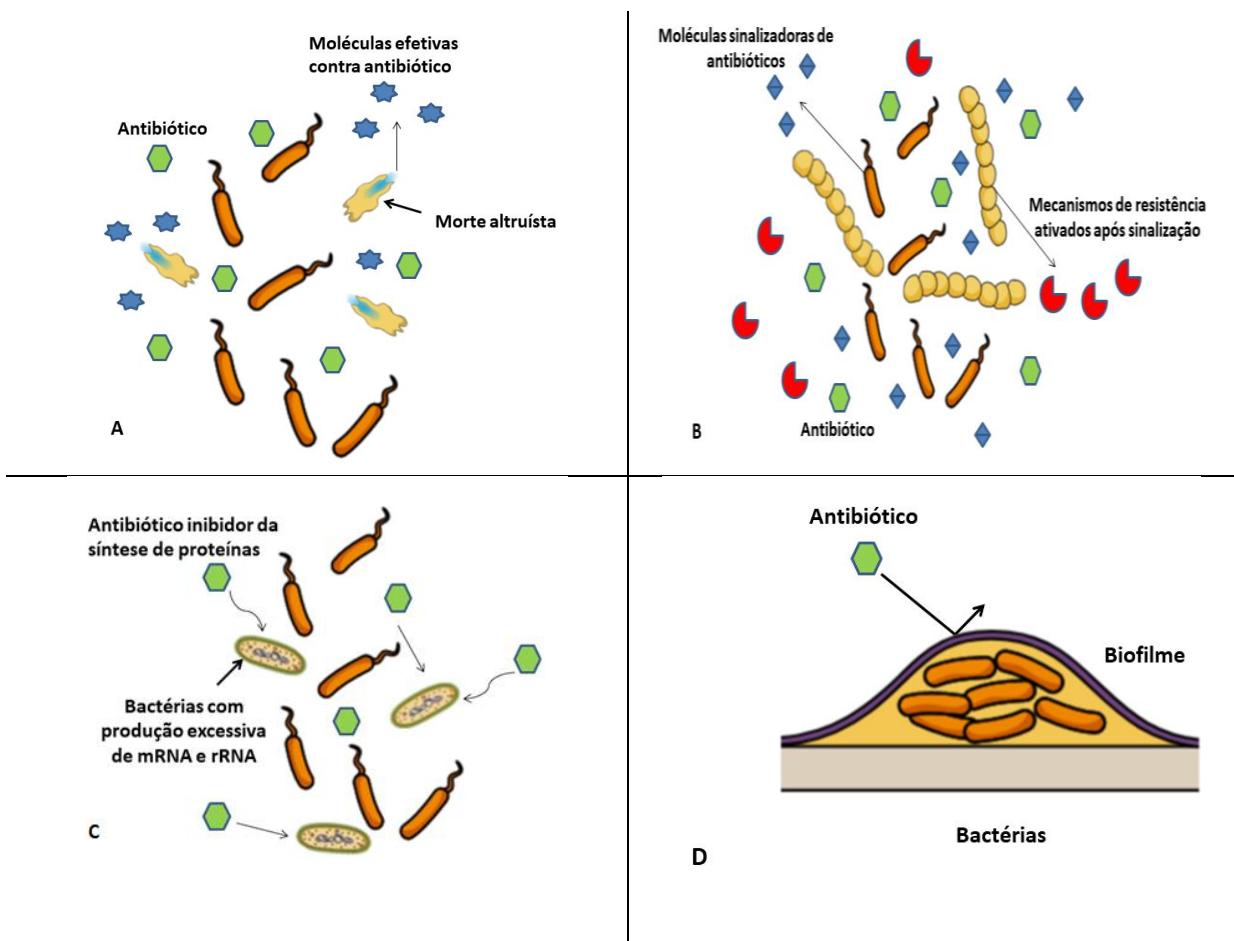
Sendo os mecanismos sociais de tolerância (figura 3) eventos dependentes de uma elevada densidade populacional e interações entre bactérias, que não possuem a capacidade de reduzir a mortalidade causada pelos antibióticos, mas preservam uma considerável parcela da população bacteriana que se mantém viável.

Entre os mecanismos sociais de tolerância estam 1) a autoprogramação de algumas células para realizarem uma morte altruísta, seguida da liberação de proteínas citoplasmáticas com efeito protetor para as células circundantes; 2) a inibição biestável da maquinaria celular, nas quais células portadoras da capacidade de síntese de rRNA e mRNA por dois mecanismos independentes (biestável) ativados por feedback positivo promovem uma maior absorção de antibióticos inibidores da síntese proteica, sem, no entanto, ter suas funções vitais afetadas, acumulando o antibiótico em seu citosol e concomitantemente reduzindo as concentrações de fármacos no meio extracelular, preservando as células vizinhas (MEREDITH et al., 2015).

Existindo ainda tolerância aos antibióticos por 3) interações sociais altruístas ou mutualistas, onde células de uma dada população sinalizam outra população bacteriana a respeito da presença de antibióticos no meio, que após serem sinalizadas, passam a expressar mecanismos de resistências (MEREDITH et al., 2015).

Neste contexto, o *quorum sensing* representa um mecanismo de comunicação entre uma ou mais populações bacterianas, que após atingirem um determinado grau de crescimento, produzem moléculas sinalizadoras que coordenam a expressão gênica coletiva para a produção de agregados celulares por produção de surfactantes que aproximam as células por meio da redução da tensão superficial, possibilitando ao aglomerado celular a execução concomitante de mais de uma das estratégias de tolerância mediadas por densidade populacional citadas; ou por produção de matrizes de exopolissacarídeos que culminarão na formação de um biofilme que confere às células em seu interior grande resistência contra estresses letais como os antibióticos (SOUZA et al., 2011; GESTAL; HOLBAN, 2014; MEREDITH et al., 2015).

Figura 4 - Mecanismos de tolerância mediados por densidades populacionais: A) Morte altruísta, B) Interações sociais, C) Inibição biestável da maquinaria celular, e D) Biofilmes.



Fonte: O autor

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar bacteriófagos isolados de um efluente doméstico e avaliar a extensão da atividade lítica frente a bactérias patogênicas ao homem;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bacteriófagos de amostras de água de efluente doméstico e avaliar sua estabilidade em armazenamento à 4°C na forma de filtrado a longo prazo;
- Avaliar a extensão da amplitude de hospedeiros de importância clínica dos bacteriófagos isolados;
- Caracterizar morfologicamente os bacteriófagos isolados por microscopia de transmissão;
- Caracterizar os isolados por biologia molecular (RFLP)

3 MATERIAL E MÉTODO(S)

A metodologia empregada neste trabalho encontra-se descrita em duas sessões, que são: Os ensaios microbiológicos e os ensaios de caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e de biologia molecular.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O canal das pedrinhas ou igarapé das pedrinhas, localizado na cidade de Macapá, é uma área inundável com predomínio de ecossistema de várzea, cuja classificação geomorfológica atribuída é a de depósito de planíce fluvial antiga, ou seja, áreas que se consolidam ao longo de anos em planícies de antigos rios, que tendem a apresentar sedimentos argilosos com laminação plano paralela de coloração que varia de cinza claro à cinza escuro, capeado com camadas centimétricas de lama contendo matéria orgânica derivada da vegetação e restos de animais; havendo nestas áreas um comportamento de inundação que é dependente da influência das marés. O que contribui para a predominância da unidade fitoecológica de várzea, mas também havendo porções de ressaca, floresta de terra firme e cerrado (SANTOS et al., 2004).

Ressaltando que fatores intrínsecos à classificação geomorfológica da área de estudo, associados a fatores abióticos como incidência de radiação solar, cuja intensidade varia de moderada a elevada, altas temperaturas, umidade e níveis de precipitação altos, assim como um grande aporte de matéria orgânica, contribuem para uma elevada produtividade ecológica (figura 5) (SANTOS, 2016), assim como para uma biodiversidade adaptada às condições do meio.

Havendo registrado em inventário biológico nas áreas de ressaca de Macapá e Santana, com pouca variação, uma flora contendo 18 espécies de *Cyperaceae*, 15 espécies de *Poaceae*, 7 espécies de *Fabaceae* e 3 espécies de *Rubiaceae*; e uma fauna com grande frequência de anfíbios e espécies emergentes, além de 81 espécies de peixe, 8 espécies de macrocrustáceos, 35 espécies de insetos da família *Culicidae*, 14 da família *Meliponinae*, 30 da família *Vespidae*, 36 da ordem *Odonata*, 88 espécies de aves e 12 espécies de mamíferos; sendo a maior variação entre os taxa reportados nas áreas analisadas em regiões onde a antropização é mais intensa (TAKIYAMA et al., 2018).

Apresentando também o canal das pedrinhas um importante papel social e econômico na região Norte, principalmente para os Estados do Amapá e do Pará, pois

neste corpo hídrico há um grande fluxo migratório e de transporte de madeiras provenientes do Estado do Pará para comercialização no Estado do Amapá, (AMARAL, 2016; CARDOSO et al., 2017). O que propicia a vários eventos adversos ao ambiente em decorrência da ocupação inadequada (figura 6), como saneamento básico precário e o despejo em grande escala de resíduos sólidos e líquidos em função da grande densidade populacional ao redor do canal das pedrinhas, a presença de instalações comerciais e o intenso fluxo fluvial e rodoviário (SILVA, 2017).

Neste contexto, de acordo com análises físico-químicas conduzidas por Oliveira et al. (2016), a concentração de oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, condutividade, pH e resíduos sólidos apresentam-se em disformidade com o estabelecido pela legislação ambiental brasileira. Estando o nível de poluição da área de estudo associado a localização de grande parte do canal ser em um perímetro urbano e este apresentar considerável importância econômica para a região.

Havendo também no curso do canal das pedrinhas, registros de elevada contaminação microbiológica, principalmente por bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo reportado o isolamento de *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp. *Edwardsiella* sp, além de elevados índices de contaminação por metais pesados (CUNHA, 2012).

Figura 5 - área adjacente ao ponto de coleta demonstrado a grande produtividade ecológica em decorrência de elevados níveis e fluxo de matéria orgânica, energia solar, temperatura, umidade e níveis hidricos (Latitude: 0,004812, N 0°0'17,32356", Longitude: -51,070926, W 51°4'15,33432").



Fonte: O autor

Figura 6 - Foto do canal das pedrinhas demonstrando o fluxo fluvial, ocupação inadequada, e instalações comerciais de madeira, havendo também nas redondezas a comercialização de outros materiais de construção civil, e poluição decorrente da localização em área urbana (Latitude: 0,004812, N 0°0'17,32356", Longitude: -51,070926, W 51°4'15,33432").



Fonte: O autor

Sendo a maioria dos trabalhos referentes ao canal das pedrinhas pertinentes a sua importância ecológica, econômica, urbana e os impactos ambientais decorrentes da atividade antrópica (figura 8). Não tendo sido encontrado trabalhos na área da virologia que disserssem precisamente sobre o viroma e taxa virais existentes na área estudada.

No entanto, considerando os aspectos socioeconômicos aos arredores do canal das pedrinhas e partindo do pressuposto de que elevadas densidades bacterianas dão suporte para a sobrevivência de bacteriófagos; a elevada contaminação fecal do canal e descrição de espécies bacterianas entéricas presentes nas comunidades microbiológicas do canal tornam promissora a investigação de fagos com possível efetividade contra bactérias patogênicas ao homem, principalmente fagos ativos contra bactérias da família Enterobacteriaceae.

E também considerado que o ambiente estudado é altamente concentrado em poluentes emergentes, que de acordo com Geissen et al. (2015), são substâncias químicas que possuem o potencial de causar efeitos adversos à saúde humana e animal, assim como ao meio ambiente, mas que normalmente não são monitoradas pelas agências regulamentadoras de parâmetros ambientais; podendo este tipo de poluente ser oriundo de pontos específicos (meio urbano/indústrias) ou de origem difusa (agricultura), compreendendo produtos farmacêuticos (incluindo antibióticos), pesticidas e desinfetantes, que ocupam em uma posição predominante dentre as 20 classes de

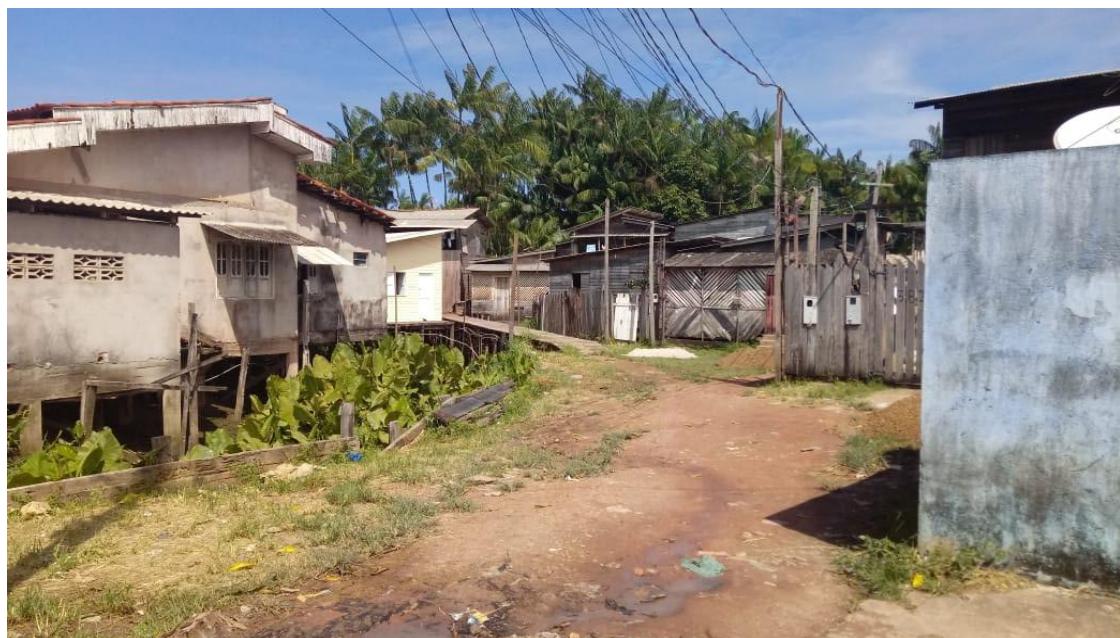
poluentes emergentes. O que implica na existência de processos de pressão seletiva na microbiota da área de estudo e possivelmente adaptabilidade fágica para infectar células portadoras de diferentes estratégias de sobrevivência aos antibióticos (resistência, persistência e tolerância aos antibióticos).

Figura 7 - Um dos pontos de contaminação química e microbiológica na área do canal das pedrinhas (Latitude: 0,006458, N 0°0'23,247", Longitude: -51,072009, W 51°4'19,23168").



Fonte: O autor

Figura 8 - Grandes disparidades sociais relacionadas a urbanização que contribuem para a ausência de saneamento básico inadequado no canal das pedrinhas e áreas adjacentes (Latitude: 0,008940, N 0°0'32,18472", Longitude: -51,070704, W 51°4'14,53584").



Fonte: O autor

Vindo este trabalho a contribuir com o conhecimento de taxas virais presentes no igarapé das pedrinhas, mesmo que superficialmente; além de demonstrar o potencial biotecnológico de tais vírus isolados de uma região da Amazônia Oriental como alternativa aos antibióticos.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de água utilizadas neste trabalho foram coletadas de um esgoto doméstico (figura 9) despejado no curso do igarapé das pedrinhas no ponto de georreferenciamento $0^{\circ} 0.112'N$ $51^{\circ} 4.219'O$.

O procedimento de coleta ocorreu durante o mês de setembro de 2018, tendo sido utilizado pipetas de pauster estéreis para transferir as amostras de esgoto para frascos de tampa enroscada, também estéreis, com o devido cuidado para evitar contaminação cruzada.

Após a coleta, as amostras foram rapidamente encaminhadas para a sessão de microbiologia do Laboratório de Toxicologia e Química Farmacêutica da Universidade Federal do Amapá para a realização dos ensaios microbiológicos.

Figura 9 - Ponto de coleta das amostras.



Fonte: O autor

3.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os procedimentos de prospecção, isolamento e armazenamento obedeceram à metodologia descrita por Mirzaei e Nilsson (2015), enquanto o ensaio para a determinação da amplitude de hospedeiros foi realizado conforme a metodologia descrita por Gregoracci (2006), e a viabilidade dos fagos obtidos e dos fagos isolados durante o período de avaliação da estabilidade à condição de armazenamento analisada foi realizada conforme o método descrito por Synnott et al. (2009).

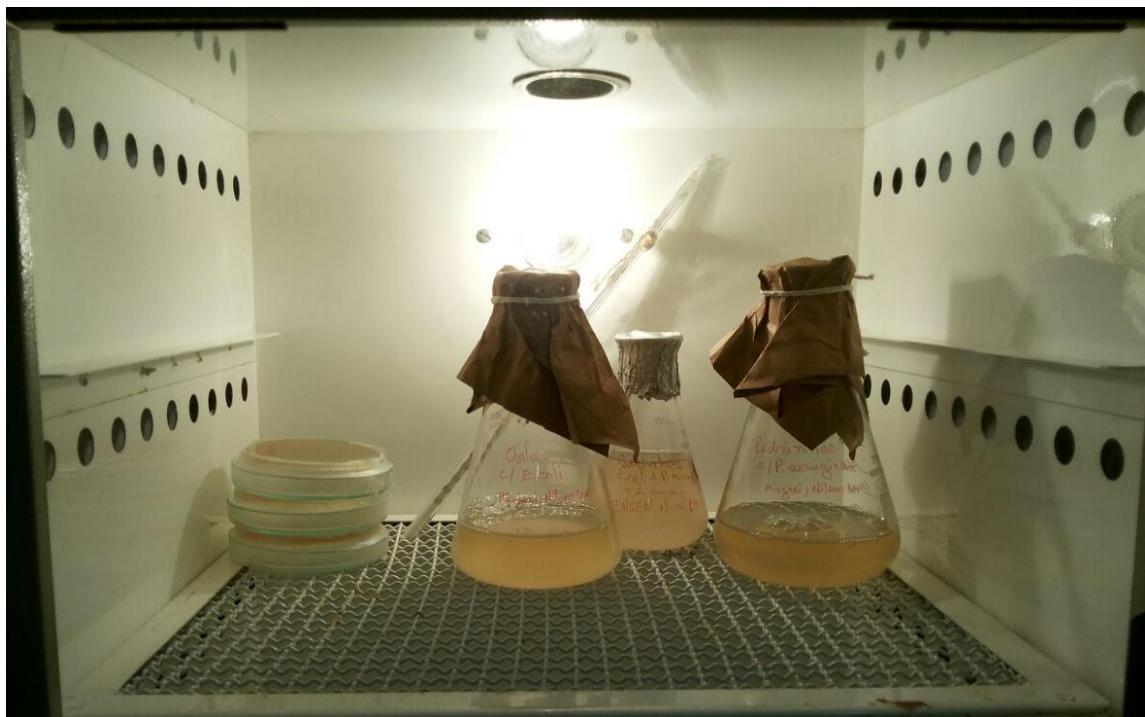
3.3.1 Prospecção de bacteriófagos

Para a prospecção de bacteriófagos líticos presentes nas amostras de esgoto coletadas, foram empregadas as seguintes cepas bacterianas da *American Type Cell Culture* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 8789, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6338, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que foram cultivadas em caldo müeller hinton a 37°C por 24 h para serem utilizadas como hospedeiro em cultivos de enriquecimento para bacteriófagos (figura 10).

Após o período de 24 horas, alíquotas de 10 mL de cultivo bacteriano foram transferidos para erlenmeyers estéreis, aos quais foram adicionados 50 mL de amostra mais 40 mL de caldo müeller hinton, seguido de suave homogeneização e incubação por 24 h a 37°C.

Concluindo o cultivo de enriquecimento conforme descrito acima, o volume total da cultura foi fracionado em tubos do tipo falcon de 15 mL, aos quais foi adicionado clorofórmio na proporção 1:1 (v/v), seguido de centrifugação a 4000 RPM por 15 minutos e filtração do sobrenadante em membranas de 0,45 µm (figura 11); sendo o filtrado utilizado para o preparo de diluições seriadas da ordem de 10⁻¹ à 10⁻⁵.

Figura 10 - Cultivo de enriquecimento viral contendo 50 mL amostras em 40 mL de caldo Müller Hinton acrescido de 10 mL de cultura ATCC em fase exponencial de crescimento a 37°C por 24 h.



Fonte: O autor

Figura 11 - Preparo dos filtrados de bacteriófagos. A esquerda, cultivo bacteriano após centrifugação com clorofórmio a 4000 g por 15 minutos, e a direita, filtragem da fase aquosa em membrana de 0,45 µm.



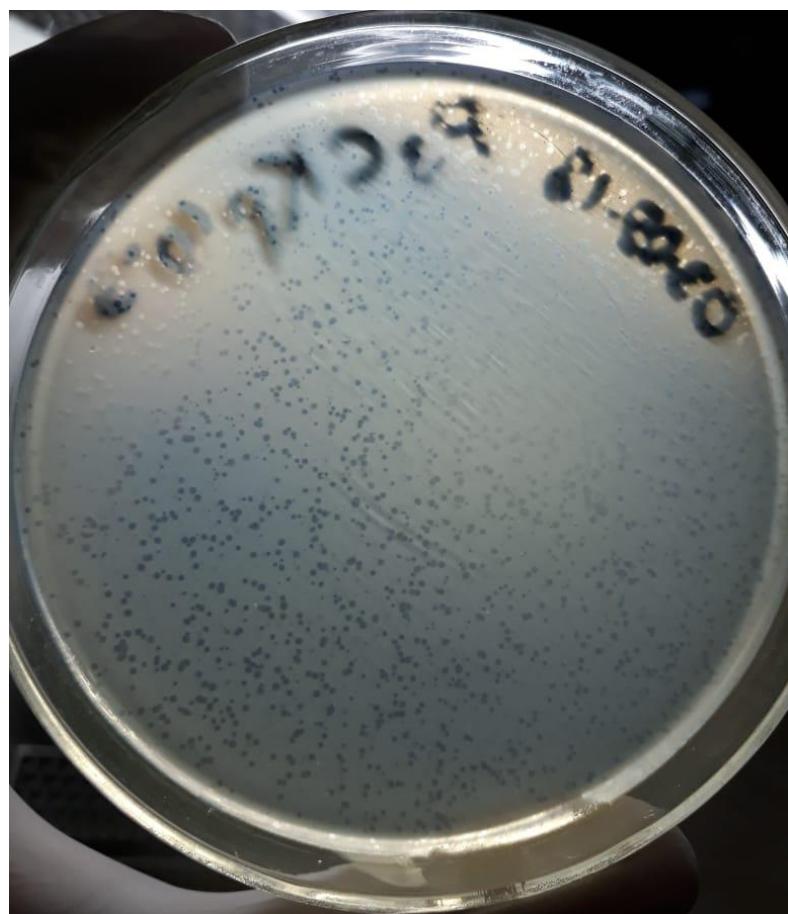
Fonte: O autor

De cada diluição preparada, 300 µL foram transferidos com micropipetas para tubos contendo 3 mL de ágar müeller hinton semissólido (ágar 0,6%) e 200 µL de cultura

das respectivas cepas utilizadas como hospedeiro no cultivo de enriquecimento inicial, sendo a mistura levemente homogeneizada e depois vertida sobre placas de ágar müeller hinton.

Após a solidificação do meio semissólido, as culturas foram incubadas a 37°C em posição invertida por 24 h, sendo a presença de bacteriófagos evidenciada por pontos translúcidos em meio ao crescimento bacteriano em confluência, que indicam a atividade lítica de bacteriófagos (figura 12).

Figura 12 - Placas ou zonas de lise resultantes da atividade lítica de bacteriófagos sobre o crescimento bacteriano.

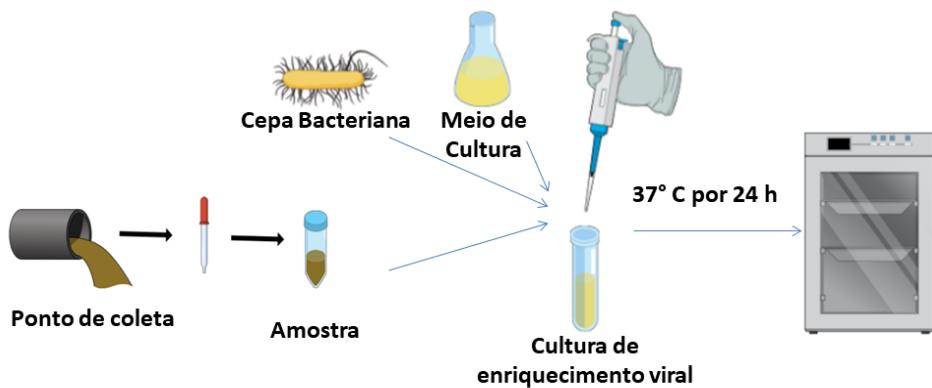


Fonte: O autor

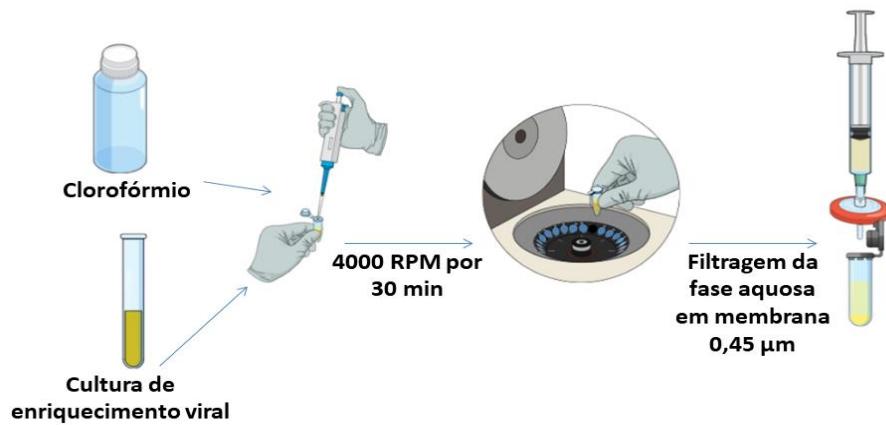
A metodologia empregada para a obtenção de bacteriófagos pode ser visualizada na figura 13.

Figura 13 - Desenho esquemático da metodologia de prospecção de bacteriófagos: 1) procedimento da coleta ao cultivo de enriquecimento, 2) preparo de filtrados virais, 3) ensaio para a formação de placas de lise.

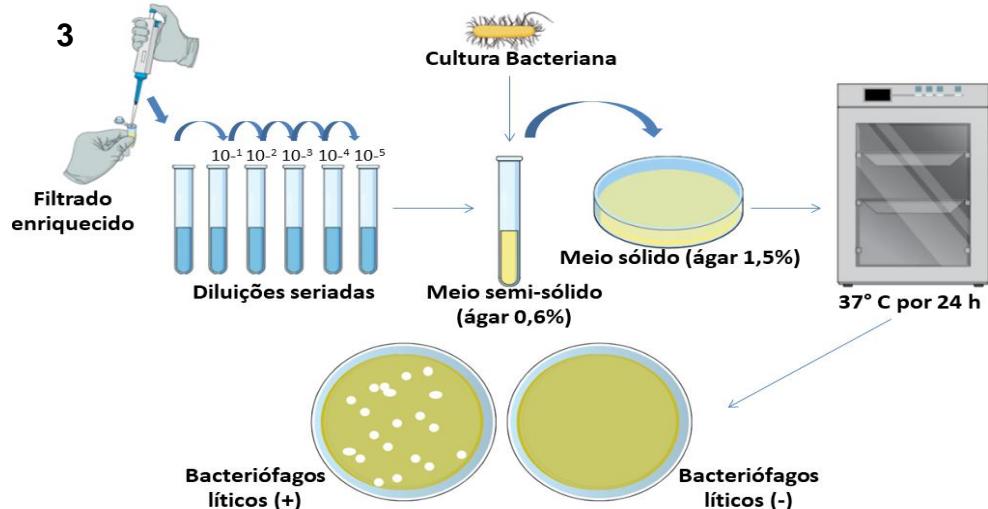
1



2



3



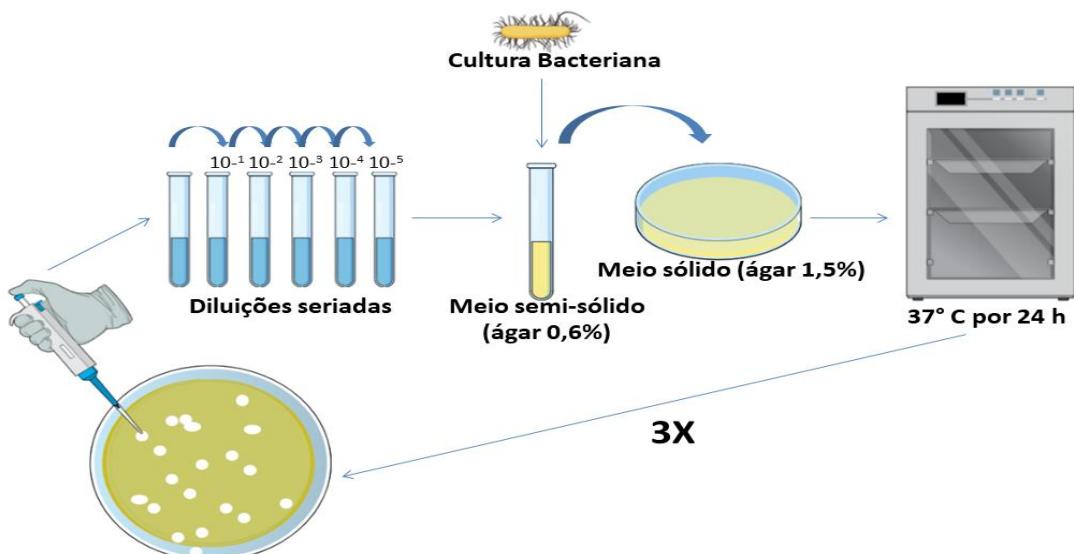
Fonte: O autor

3.3.2 Isolamento e armazenamento de bacteriófagos

Após o ensaio de prospecção, as zonas líticas ou placas mais translúcidas e com maior diâmetro foram coletadas com o auxílio de ponteiras estéreis, que depois de terem tocado as placas de lise, foram utilizadas para preparar suspensões fágicas e diluições seriadas em tampão SM, sendo as diluições preparadas cultivadas em meio semissólido (ágar 0,6%) acrescido de células hospedeiras; Sendo que os bacteriófagos obtidos com células gram negativas foram submetidos a isolamento com *Escherichia coli* ATCC 8789, e os bacteriófagos obtidos com células gram positivas foram submetidos a isolamento com *Staphylococcus aureus* ATCC 6338; então a mistura foi vertida em placas de ágar müeller hinton, e após solidificação, submetida a incubação a 37°C por 24 horas.

Este procedimento foi repetido por três vezes segundo a metodologia (figura 14), porém não foi o bastante para assegurar o isolamento e purificação de todos os bacteriófagos selecionados, sendo os bacteriófagos obtidos armazenados em alíquotas de 5 mL de filtrados de cultura de enriquecimento mantido à 4°C.

Figura 14 - Desenho esquemático da metodologia de isolamento de bacteriófagos.



Fonte: O autor

3.3.3 Determinação da amplitude de hospedeiros de bacteriófagos

Para a determinação da amplitude de hospedeiros dos bacteriófagos isolados, foram utilizadas culturas bacterianas das seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6338, *Proteus mirabilis* ATCC 15290, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella*

pneumoniae ATCC 4352, *Escherichia coli* ATCC 8789 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

O ensaio para determinação da amplitude de hospedeiros de bacteriófagos consiste em uma titulação viral realizada com diferentes espécies bacterianas, tendo sido utilizado para tal um volume de 300 µL de diluição seriada de filtrado de cada fago isolado na ordem de 10⁻³ à 10⁻⁵ e 200 µL de cultura bacteriana adicionada a 3 mL de meio de cultura müeller hinton semissólido, levemente homogeneizado e vertido sobre placas de meio sólido, seguido de incubação a 37°C por 24 h em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, a quantidade de placas de lise formadas foi contada e o resultado da titulação expresso em unidades formadoras de placa por mL (PFU x mL⁻¹) de acordo com a fórmula abaixo:

$$PFU = \frac{\text{Número de placas de lise}}{\text{volume da diluição (mL) } \times \text{fator de diluição}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{\text{mL}}$$

Os ensaios foram conduzidos em triplicatas, e os resultados expressos em PFU x mL⁻¹ com base no resultado médio obtido em cada repetição.

3.3.4 Estabilidade de armazenamento

Os filtrados de enriquecimento dos isolados obtidos foram submetidos a armazenamento à 4°C, e sua viabilidade, ou seja, a capacidade de se manter infeccioso perante as células nas quais foram isolados, foi avaliada mensalmente por um período de seis meses por meio de ensaio de placa conforme Synnott et al. (2009), na qual 10 µL de filtrado viral foi adicionado a culturas de células indicadoras semeadas na modalidade pour plate em ágar semissólido.

3.4 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E BIOLOGIA MOLECULAR

O ensaio de caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão foi realizado com a técnica de contrastação negativa com ácido fosfotungstênico 2% padronizada pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas, e os fagos observados foram identificados de acordo com Malinoff e Ackermann (2011). E os ensaios de polimorfismo de comprimento de fragmento para diferenciar a nível genético os fagos isolados empregou a metodologia de precipitação viral descrita por Gregoracci

(2006) e seguiu as recomendações descritas pelos fabricantes do kit de extração de material genômica e das enzimas de restrição utilizadas.

3.4.1 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

Os lisados de fago foram visualizados por coloração negativa no microscópio eletrônico de transmissão modelo MET EM 900 marca Zeiss (figura 15) operando a 80 kV com uma magnitude nominal variando entre 80.000 à 150.000, como segue: Suspensões de lisados de cada isolado foram preparadas em tampão SM e, em seguida, um volume entre 5-10 μ L foi adicionado à superfície de grelhas de cobre de 300 mesh revestidas com formvar, que após 1 minuto, foram secas à temperatura ambiente com o auxílio de filtro de papel, então o mesmo volume de ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 Foi adicionado e em seguida seco nas mesmas condições.

Figura 15 - Preparo das placas de cobre revestidas com formvar para visualização das amostras por microscopia eletrônica de transmissão a esquerda, e microscópio eletrônico de transmissão a direita.



Fonte: O autor

Depois de completamente secas, as grades foram organizadas em uma caixa de armazenamento e conduzidas ao laboratório de microscopia eletrônica de transmissão para a visualização de partículas fágicas.

As eletromicrografias obtidas foram analisadas com o software Icy licença GPLv3 para a obtenção das medidas das partículas virais.

3.4.2 Caracterização molecular

Para a extração de ácidos nucleicos, foi empregado o método de precipitação viral descrito por Gregoracci (2006) para a obtenção de um superconcentrado viral, que foi submetido à extração de DNA/RNA em kits Quick-DNA/RNA viralTM conforme estabelecido pelo fabricante (Zymo Research).

O procedimento de precipitação dos bacteriófagos isolados consiste em uma cultura de enriquecimento de 24 h, a qual é adicionado NaCl até a concentração de 1 M ser alcançada, seguida de repouso a -4°C por 1 h, e posterior centrifugação a 12.000 RPM por 30 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tudo e à este adicionado PEG 4000 na proporção de 1:1 (v/v) prosseguido de um novo período de repouso a -4°C por 24 horas, para então ser adicionado clorofórmio ao sistema, seguido de centrifugação a 12.000 RPM por 15 minutos.

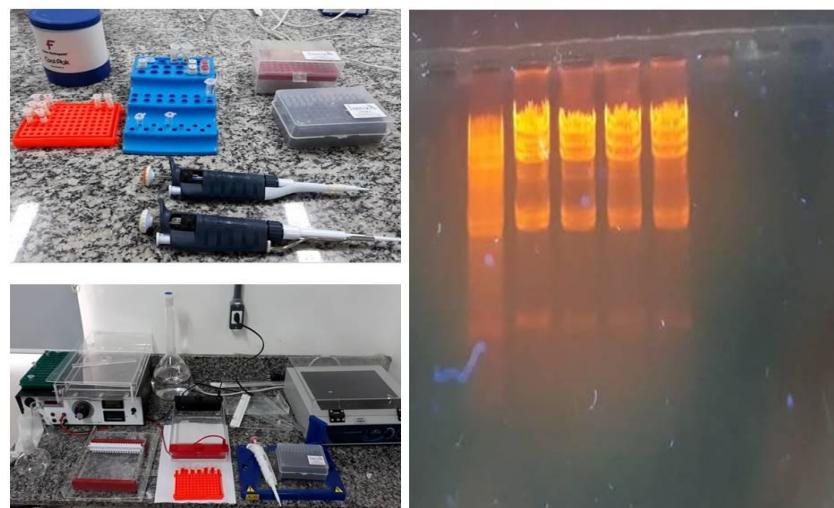
Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão SM pH 7,0, e com esta solução concentrada de fagos foi realizada a extração genômica, sendo a qualidade do procedimento de extração analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

E depois de avaliada a integridade do procedimento de extração, os genomas obtidos também foram submetidos a digestão com enzimas de restrição EcoRI e HindIII por 1 hora, a 37°C em um sistema composto por 10 µL de amostra de ácido nucleicos, 3 µL de tampão de incubação comercial suplementado com 16 µL de água e 1 µL de enzima de restrição a 10 U x mL⁻¹, sendo os fragmentos obtidos resolvidos em gel de agarose 1% com tampão Tris-Acetato-EDTA 1X.

Sendo que EcoRI e HindIII são enzimas que clivam ds DNA (WITTEK et al., 1977; HALFORD et al., 1979), na qual EcoRI reconhece e cliva as sequências GAATTC / CTTAAG, enquanto que HindIII reconhece e cliva regiões com a sequência AAGCTT / TTCGA (HERPFER et al., 1989)

A padronização da digestão foi feita com DNA comercial do bacteriófago λ (figura 16), e a visualização dos ácidos nucleicos também foi realizada pela adição de brometo de etídio para corar as amostras e luz UV do aparelho de transluminador para tornar os fragmentos da digestão enzimática fluorescente.

Figura 16 -. Ensaio de restrição enzimática. A esquerda, acima, preparo do mix reacional, a baixo o aparato de eletroforese; e a direita, padronização da técnica de digestão com Hind III e DNA comercial do fago λ .



Fonte: O autor

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS

A presença de fagos nos ensaios microbiológicos de prospecção foi identificada por meio da formação de placas no crescimento bacteriano em confluência (figura 17), que possibilitaram o isolamento viral através da técnica de coleta de placa e semeio pelo método de dupla camada de ágar com repetições consecutivas; resultando no isolamento de três fagos da ordem *Caudovirales*, que foram nomeados vB_EcS_IPC, vB_SaM_NLFC e vB_EcS_LMPC, conforme Adriaensses e Brister (2017), após a análise das partículas virais de cada isolado por microscopia eletrônica de transmissão serem realizadas.

Tendo sido também detectado a presença de cinco fagos distintos na amostra P4CEc, enriquecida com *Escherichia coli* ATCC 8789, demonstrando os ensaios de microscopia eletrônica realizados, que não foi possível isolar apenas um fago com a técnica adotada nesta amostra.

E em relação ao filtrado fágico P4CSa enriquecido com *Staphylococcus aureus* ATCC 6338 e também submetido ao mesmo processo de isolamento com o hospedeiro mencionado, não foi possível assegurar se o mesmo encontra-se isolado, ou se possui mais de um fago, pois não foi possível detectar nesta amostra a presença de partículas virais nos ensaios de microscopia eletrônica.

O fago vB_EcS_IPC foi obtido a partir de uma cultura de enriquecimento com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, e o fago vB_EcS_LMPC é derivado de um enriquecimento com *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, ambos isolados posteriormente por meio de coleta de placa e culturas subsequentes com *Escherichia coli* ATCC 8789. Enquanto o fago vB_SaM_NLFC foi obtido a partir de enriquecimento com a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e subsequentemente isolado com *Staphylococcus aureus* ATCC 6338.

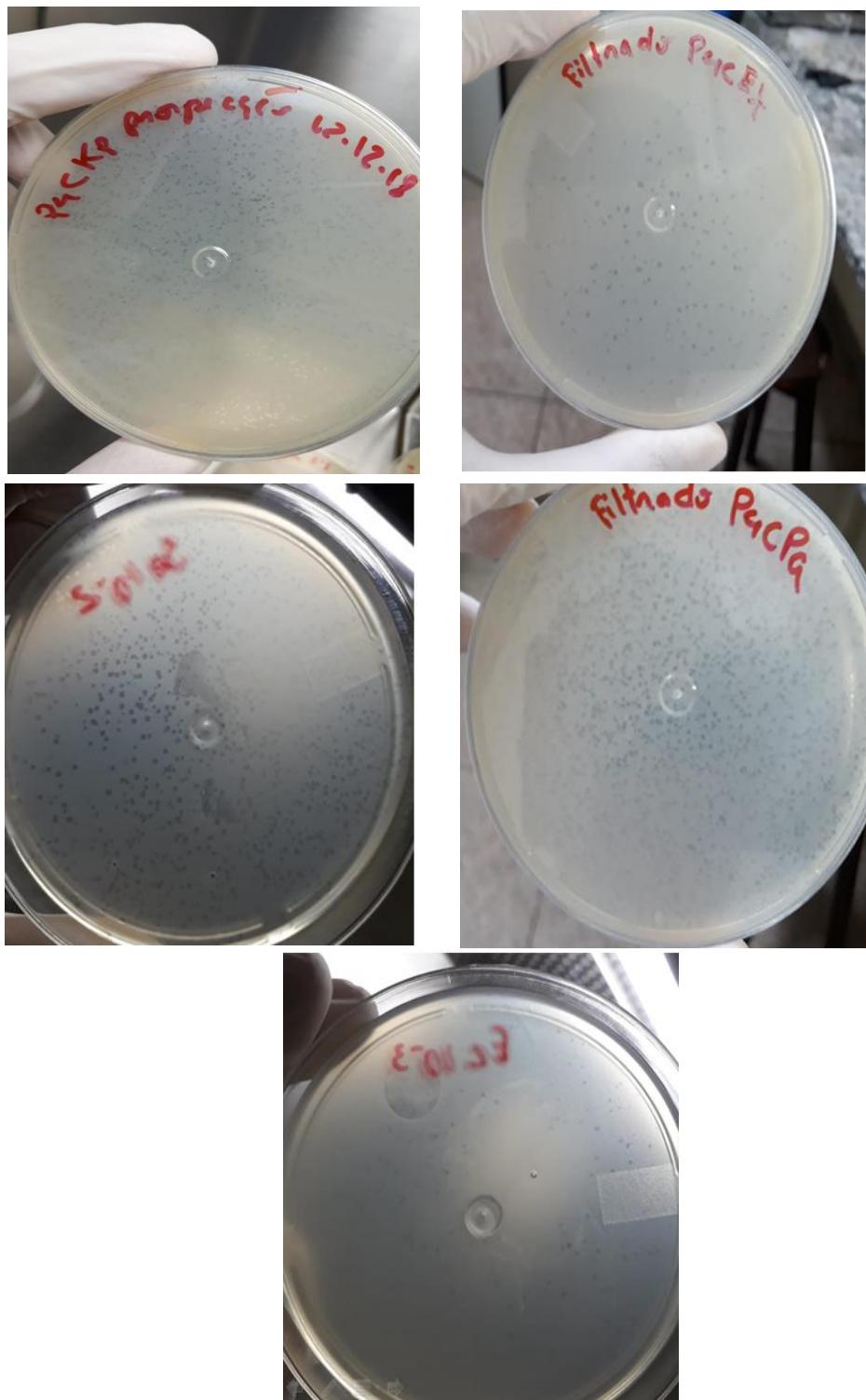
Nos isolados foi observada a formação de placas circulares, sem halo ou centro, de aparência translúcida, exceto no isolado vB_SaM_NLFC que gerou placas de forma irregular. Sendo os diâmetros de placa registrados os seguintes: $0,61 \pm 0,16$ mm para o fago vB_EcS_IPC (figura 18), $1,21 \pm 0,02$ mm para o fago vB_EcS_LMPC (figura 19), e $0,78 \pm 0,03$ mm para o fago vB_SaM_NLFC (figura 20).

O filtrado P4CEc (figura 21), contendo cinco fagos, formou placas opacas de $0,44 \pm 0,30$ mm com morfologia circular e irregular sem halo ou centro, enquanto o filtrado

P4CSa (figura 22) formou placas de aparência opaca com diâmetro de $0,64\pm0,15$ mm, cuja morfologia era circular, irregular e sem halo ou centro.

As descrições das características de placa podem ser visualizadas na tabela 3.

Figura 17 - Ensaio de prospecção de bacteriófagos. Filtrados de culturas de enriquecimento com *Enterococcus faecalis* (P4CEf), *Pseudomonas aeruginosa* (P4CPa) e *Klebsiella pneumoniae* (P4CKp), *Staphylococcus aureus* (P4CSa) e com *Escherichia coli* (P4CEc).

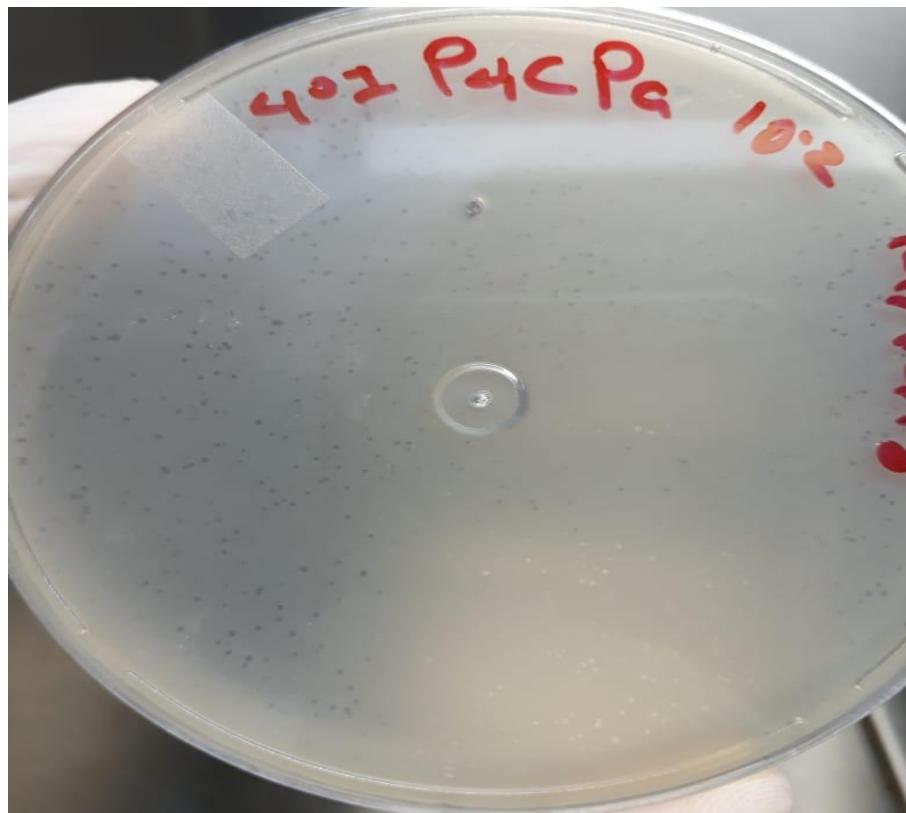


Fonte: O Autor

Tabela 3 - Características morfológicas do ensaio de placa.

Bacteriófago Isolado/Filtrado	Morfologia de placa		
	Diâmetro (mm)	Forma	Aparência
vB_EcS_IPC	0,61 ($\pm 0,16$) mm	Circular, sem halo ou centro	Translúcida
vB_EcS_LMPC	1,21 ($\pm 0,02$) mm	Circular, sem halo ou centro	Translúcida
vB_SaM_NLFC	0,78 ($\pm 0,03$) mm	Irregular, sem halo ou centro	Translúcida
P4CEc	0,44 \pm 0,30 mm	circular irregular, sem halo ou centro	Opaca
P4CSa	0,64 ($\pm 0,15$) mm	circular e irregular, límpida e sem halo ou centro	Opaca

Figura 18 - Fago vB_EcS_IPC obtido com *Pseudomonas aeruginosa* e isolado com *Escherichia coli*



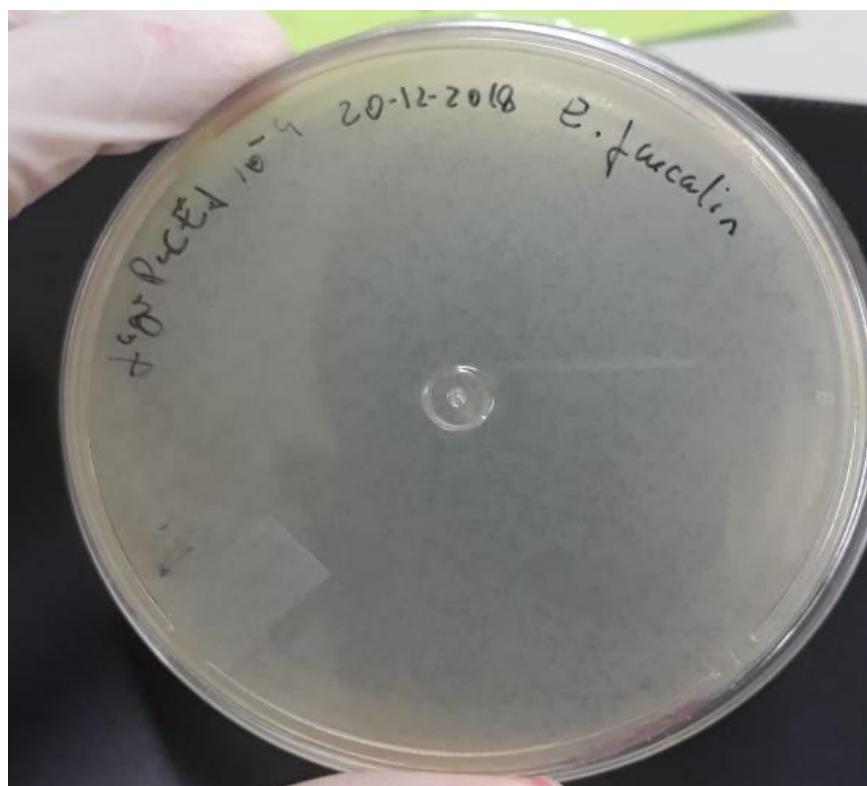
Fonte: O Autor

Figura 19 - Fago vB_EcS_LMPC obtido com *Klebsiella pneumoniae* e isolado com *Escherichia coli*



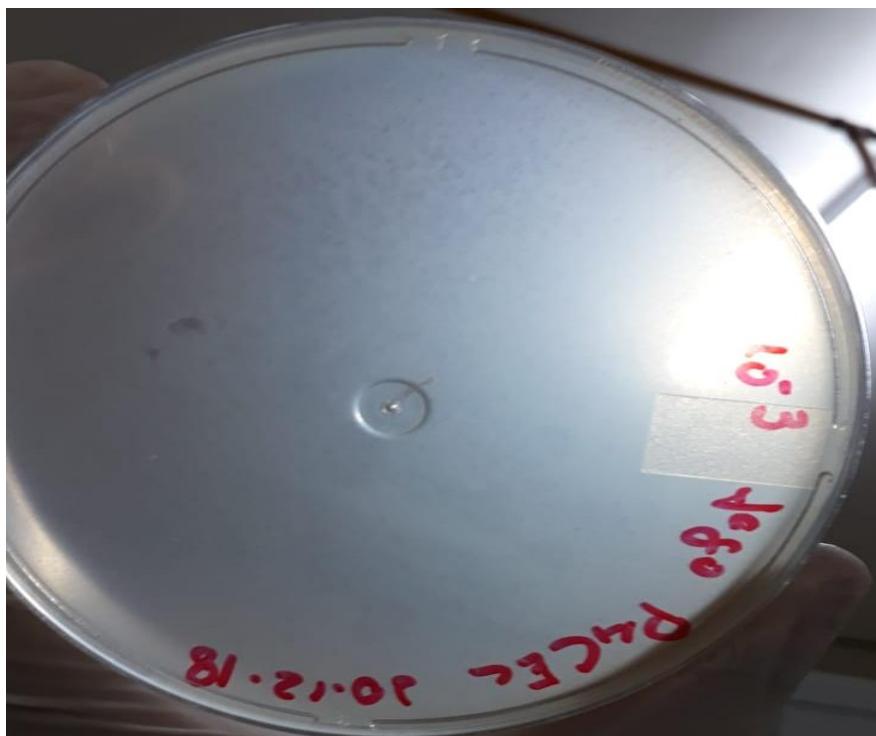
Fonte: O Autor

Figura 20 - Fago vB_SaM_NLFC obtido com *Enterococcus faecalis* e isolado com *Staphylococcus aureus*



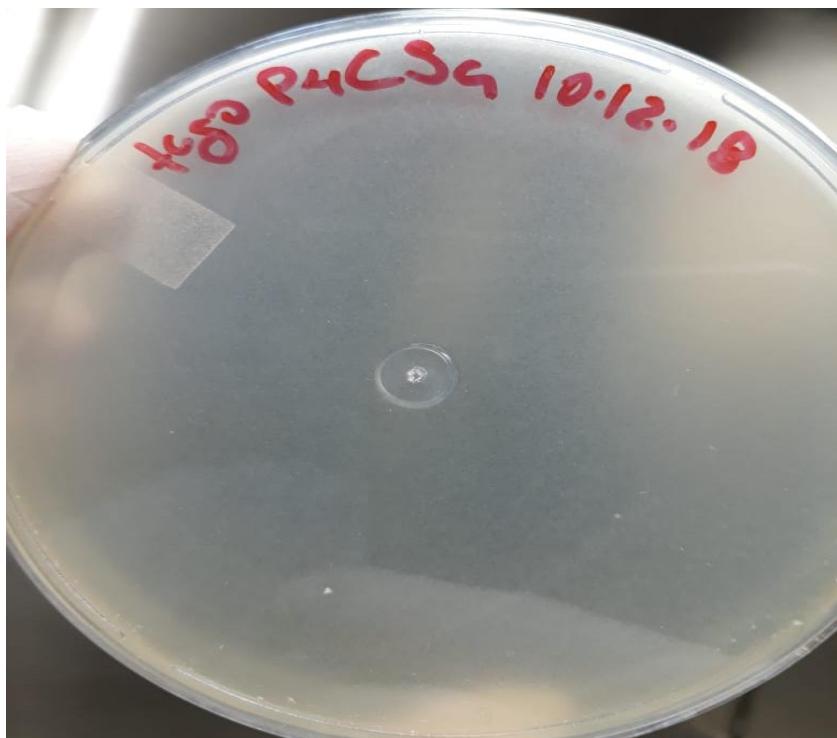
Fonte: O Autor

Figura 21 - Filtrado P4CEc obtido com *Escherichia coli*



Fonte: O Autor

Figura 22 - Filtrado P4CSa obtido com *Staphylococcus aureus*



Fonte: O Autor

Segundo Casey et al. (2018), fagos que realizam o ciclo lítico para sua replicação geram placas translúcidas, enquanto fagos lisogênicos ou temperados tendem a formar placas de aparência opaca. O que indica que os fagos vB_EcS_IPC, vB_EcS_LMPC, vB_SaM_NLFC são líticos, e o filtrado P4CSa se estiver isolado, possui atividade de fagos temperados, enquanto que os fagos que compõem o filtrado P4CEc são vírus temperados.

A morfologia de placa, além de poder informar o tipo de ciclo viral, também serve como um dos primeiros critérios de distinção entre fagos (SHENDE et al., 2017), e pode fornecer informações preditivas quanto ao tamanho das partículas virais dos isolados, na qual fagos que formam placas grandes tendem a apresentar partículas virais de tamanho pequeno, enquanto fagos que formam placas pequenas tendem a apresentar partículas virais de tamanho consideravelmente grande (SAAD et al., 2019).

Em relação ao diâmetro de placa e tamanho de partícula viral, Saad et al. (2019) reportam o isolamento de fagos com capsídeo de aproximadamente 110 nm de diâmetro e cauda de 145 nm de comprimento, obtidos em culturas com meio semissólido com ágar na concentração de 0,35%, que formaram placas com diâmetro menor que 0,01 mm; e Šimoliūnas et al. (2013), nas condições clássicas (ágar na concentração de 0,5% à 0,7%) isolaram o fago vB_KleM_RaK2, que possui genoma de 346 kbp, capsídeo de 123 nm de diâmetro e cauda de 128 x 21,5 nm, que formou placas de $0,75 \pm 0,25$ mm de diâmetro. Apresentando ambos os autores mencionados, fagos de tamanho consideravelmente grande.

Enquanto que Jurczak-Kurek et al. (2016) isolaram 83 fagos da ordem *Caudovirales*, com capsídeo cuja amplitude de tamanho variava de 41 nm à 100 nm de diâmetro e cauda com tamanho de 10 nm à 175 nm de comprimento que formaram placas com diâmetro variando de 0,5 mm à 7,0 mm, sendo as placas de maior tamanho registradas nos fagos com as menores partículas virais.

Nasr-Eldin et al. (2018) isolaram três fagos da mesma ordem com capsídeo cujo tamanho variava de 47 nm à 48 nm de diâmetro e cauda de 60 nm à 174 nm, que formaram placas de 1,3 mm; Kumari et al. (2010) isolaram fagos da família *Podoviridae* com capsídeo cuja amplitude de tamanho era de 73 nm à 135 nm de diâmetro com cauda de 15,18 nm à 40 nm que formaram placas de 7,8 nm, e Ganaie et al. (2018) isolaram um Myovírus de amostras de esgoto com capsídeo de 90 nm de diâmetro e cauda de 100 nm de comprimento que formaram placas de 1 mm à 4 mm de diâmetro.

Na tabela 4, a relação entre o diâmetro de placa com o tamanho de partícula viral dos autores citados na discussão referente aos ensaios microbiológicos de prospecção e isolamento de bacteriófagos podem ser observados.

Tabela 4 - Relação entre o diâmetro de placa e o tamanho de partícula viral citados.

Bacteriófago Família/Ordem	Diâmetro (mm)	Partícula viral (nm)	Autor (ano)
N.D.	0,01	Cp: 110; Cd: 145	Saad et al. (2019)
VB_KleM_Rak2	0,75	Cp: 123; Cd: 128 x 21,5	Šimoliūnas et al. (2013)
83 fagos Caudovirales	0,5 – 7,0	Cp: 41-100; Cd: 10- 175	Jurczak-Kurek et al. (2016)
3 Caudovirales	1,3	Cp: 47 – 48; Cd: 60 – 174	Nars-Eldin et al. (2018)
2 Podoviridae	7,8	Cp: 73 – 135; Cd: 15,18 - 40	Kumari et al. (2010)
Myoviridae	1-4	Cp: 90; Cd: 100	Ganaie et al. (2018)

N.D. Não disponível, Cp Capsídeo, Cd Cauda.

Neste contexto, a comparação dos resultados obtidos com os resultados reportados na literatura sugerem que os fagos isolados e presentes nos filtrados P4CEc e P4CSa possuem partículas virais de tamanho consideravelmente grande, que foi confirmado pela análise de microscopia eletrônica de transmissão (exceto o filtrado P4CSa).

Segundo Yuan e Gao (2017), bacteriófagos grandes são raramente isolados pelos métodos clássicos que empregam concentrações de 0,5% à 0,7% de ágar, que normalmente são utilizados na camada superior, por dificultarem a difusão dos vírus no meio, consequentemente dificultando a formação de placas. O que sugere que fagos com partículas virais de tamanho grande possam ser abundantes no ambiente na qual as amostras foram coletadas.

Quanto ao método utilizado para a obtenção e isolamento de bacteriófagos, por empregar clorofórmio para matar as células hospedeiras e auxiliar na separação do material membranar do conteúdo citoplasmático (incluindo os fagos), desfavorece o isolamento de fagos das famílias *Tectviridae*, *leviviridae* e *Crticoviridae* (ACKERMANN, 2007; SHARP, 2001). O que dificulta qualquer inferência sobre a biodiversidade de fagos existente no ambiente de onde as amostras foram coletadas.

Corroborando a afirmativa acima com os resultados de Mirzaei e Nilsson (2015) e Ganaie et al. (2018), que reportaram o isolamento de fagos caudados por meio da mesma técnica empregada neste trabalho. Sugerindo a reproduzibilidade dos resultados obtidos (obtenção de fagos da mesma ordem viral) que há seletividade nesta técnica para fagos caudados.

Entretanto, também deve ser considerado que os fagos caudados são os mais abundantes na natureza, especialmente em ambientes aquáticos com altas densidades bacterianas, sendo os mesmos, raros em ambientes habitados predominantemente por archaeas (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

E neste contexto, o esgoto é um ambiente que possui fagos em títulos que variam entre 10^8 fagos x mL⁻¹ à 10^{10} fagos x mL⁻¹ (ELBREKI et al., 2014), de onde fagos da ordem *Caudovirales* são isolados com grande frequência, principalmente os pertencentes a família *Myoviridae*, e menos expressivamente os das famílias *Siphoviridae* e *Podoviridae* (APREA et al., 2018), inclusive por meio de métodos que não empregam clorofórmio, como demonstrado por Karumidze et al. (2013), que reportaram o isolamento de fagos das famílias *Siphoviridae* e *Podoviridae* em amostras de esgoto por meio de filtragem.

Ainda com ênfase aos procedimentos técnicos utilizados, durante a padronização dos ensaios microbiológicos, foi observado que a utilização de agitação por vórtex inibiu, e até mesmo eliminou a formação de placas durante os ensaios de isolamento, o que sugere que os fagos presentes na amostragem sejam sensíveis ao estresse mecânico. Divergindo dos resultados de Bhetwal et al. (2017), que obtiveram sucesso na utilização de agitação por vórtex no cultivo de fagos.

Podendo a sensibilidade dos fagos isolados ser atribuída ao estresse mecânico proveniente da agitação por vórtex ser resultado de danos estruturais infligidos aos vírus, possivelmente em moléculas de reconhecimento de hospedeiro e iniciação do processo de infecção (JOŃCZYK et al., 2011).

4.2 AMPLITUDE DE HOSPEDEIROS

A amplitude de hospedeiros é uma característica intrínseca de cada bacteriófago, e representa um parâmetro de distinção e classificação para estes vírus, podendo a amplitude de hospedeiros ser do tipo monovalente, quando infectam apenas uma espécie bacteriana, ou polivalente, quando infectam duas ou mais espécies bacterianas (TAN et

al., 2008). Apresentando os fagos isolados neste trabalho amplitude de hospedeiro do tipo polivalente.

O bacteriófago vB_EcS_IPC foi capaz de infectar e lisar *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*; o fago vB_EcS_LMPC mostrou atividade contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, ambos em títulos virais da ordem de 10^7 à 10^{11} . Enquanto o isolado vB_SaM_NLFC foi efetivo contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* em títulos virais de 10^5 à 10^{11} . Os títulos para cada isolado por hospedeiro podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos ensaio de amplitude de hospedeiro para cada isolado viral.

Bacteriófago Isolado	Célula Hospedeira	UFP/mL
vB_EcS_IPC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	$3,7 \times 10^{10}$
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	$3,0 \times 10^{11}$
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$3,3 \times 10^7$
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	$3,5 \times 10^9$
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6338	$2,1 \times 10^{11}$
vB_EcS_LMPC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	$4,8 \times 10^{11}$
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	$2,4 \times 10^{11}$
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	$2,9 \times 10^{11}$
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6338	$4,0 \times 10^{11}$
vB_SaM_NLFC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	$6,5 \times 10^{10}$
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	$4,2 \times 10^{11}$
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6338	$1,6 \times 10^5$

Enquanto o filtrado P4CEc apresentou atividade lítica contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* em títulos da ordem de 10^6 ; e o filtrado P4CSa foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em títulos virais de 10^4 à 10^7 . Os títulos virais dos filtrados P4CEc e P4CSa por hospedeiro podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados dos ensaio de amplitude de hospedeiro para os filtrados P4CEc e P4CSa.

Filtrado fágico	Célula Hospedeira	UFP/mL
P4CEc	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	1,6x10 ⁶
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2,2x10 ⁶
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7,2x10 ⁶
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6338	2,0x10 ⁶
P4CSa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	1,7x10 ⁷
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4,1x10 ⁴
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6338	2,0x10 ⁶

Os resultados obtidos corroboram com os achados de Mattila et al. (2015), que sugerem que fagos que infectam *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp tendem a apresentar grande amplitude de hospedeiros, enquanto fagos que infectam *Enterococcus* sp e *Klebsiella* sp tendem a apresentar amplitude de hospedeiro mais seletiva ou restrita a um número pequeno de espécies, ou serem do tipo monovalente.

Neste contexto, o fago vB_EcS_IPC é derivado de enriquecimento com *Pseudomonas aeruginosa*, posteriormente isolado com *Escherichia coli*, foi o que apresentou o maior número de hospedeiros nos ensaios realizados (5 bactérias de um total de 6), seguido do fago vB_EcS_LMPC, (lisou 4 bactérias de um total de 6) obtido inicialmente com *Klebsiella pneumoniae* e posteriormente isolado também com *Escherichia coli*, sendo o isolado vB_SaM_NLFC, obtido com *Enterococcus faecalis* e isolado com *Staphylococcus aureus*, o que apresentou a menor amplitude de hospedeiro (lisou 3 bactérias de um total de 6).

Valendo ressaltar que o fago vB_EcS_LMPC é derivado de cultura de enriquecimento com *Klebsiella pneumoniae* e isolado posteriormente pelo método de coleta de placa e cultura em dupla camada de ágar com *Escherichia coli*; após isolado, perdeu sua capacidade de infectar *Klebsiella pneumoniae*, o que conforme Chiba-Chennoufi et al. (2004), é um indício de que este fago possui uma elevada capacidade adaptativa para mudar de hospedeiro por meio de complexos mecanismos de recombinação gênica.

Segundo Rohwer e Edwards (2002), a capacidade dos fagos de uma mesma ordem e família de infectarem bactérias gram positivas e bactérias gram negativas é marcada por diferenças genômicas e proteômicas, que ditam os aspectos moleculares da interação patógeno e hospedeiro. Sendo observado que fagos que infectam bactérias gram positivas tendem a reconhecer moléculas contendo sacarídeos ou ácidos tecóicos

no hospedeiro, enquanto fagos que infectam bactérias gram negativas tendem a reconhecer moléculas de natureza proteica, podendo também reconhecer com seletividade anexos bacterianos como cápsulas, flagelos e pile (LÉON; BASTÍAS, 2015; CASEY et al., 2018).

Sugerindo que os isolados reportados neste trabalho, além de serem polivalentes, também possuem a capacidade de reconhecer tanto moléculas lipídicas, proteicas, como moléculas contendo sacarídeos e/ou ácidos tecóicos, pelo fato de poderem infectar tanto bactérias gram negativas quanto gram positivas.

De acordo com Shende et al. (2017), bacteriófagos com amplitude de hospedeiros extensa e do tipo polivalente possuem elevado potencial biotecnológico para o controle de patógenos bacterianos comuns, podendo inclusive servirem como alternativa aos antibióticos.

Porém, a investigação da amplitude de hospedeiros de bacteriófagos cuja finalidade é terapêutica, é melhor conduzida com a utilização de isolados bacterianos clínicos do que com cepas comerciais (ROSS et al., 2016). O que representa uma limitação para este estudo, visto que na avaliação da amplitude de hospedeiros foram utilizadas cepas bacterianas ATCC.

Mas de contra partida, os resultados obtidos se demonstram promissores e justificam a realização de novas investigações da amplitude de hospedeiros considerando isolados clínicos de cepas bacterianas com importância epidemiológica, cepas hospitalares e cepas portadoras de resistência aos antibióticos, com o intuito de melhor definir a efetividade dos vírus isolados, assim como suas possíveis aplicações.

No entanto, deve ser também considerado que há diferentes fatores intrínsecos à célula hospedeira que exercem influência na interação patógeno hospedeiro e na capacidade do fago de lisa a bactéria, como, a expressão de genes que codificam para exopolissacarídeos, que conferem algum grau de proteção contra a infecção fágica (CALSTEREN, MOINEAU, 2002); expressão diferenciada de receptores virais na superfície celular, incluindo variações gênicas de tais elementos da superfície bacteriana, entre outros (LEÓN, BASTÍAS, 2015), que podem interferir na infectividade tanto de fagos monovalentes quanto de fagos polivalentes contra diferentes cepas bacterianas da mesma espécie.

Neste contexto, Wang et al. (2018) descrevem o isolamento e caracterização da amplitude de hospedeiros de um Podovírus ativo contra *Enterococcus faecalis*, mas incapaz de infectar e lisar *Enterococcus faecium*, outra espécie bacteriana pertencente ao mesmo gênero; e Ganaie et al. (2018), isolaram outro Podovírus monovalente com

capacidade de lisar 48 cepas de um total de 120 cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo o mesmo fenômeno observado em fagos monovalentes contra *Campylobacter jeejuni*, que foram isolados por Aprea et al. (2018), e em fagos monovalentes para *Staphylococcus aureus* isolados por Hsieh et al. (2011).

Em relação a fagos com amplitude do tipo hospedeiro polivalente, Bhetwal et al. (2017) isolaram de águas de rios indianos, vários bacteriófagos ativos contra bactérias da família Enterobacteriaceae, que infectavam determinadas cepas de uma mesma espécie e outras não, sendo observado o mesmo no trabalho de Sváb et al. (2018), que isolaram dois Myovírus polivalentes, também ativos contra enterobactérias.

Os resultados descritos na literatura utilizados na discussão podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da amplitude de hospedeiros dos fagos descritos na discussão.

Bacteriófago Família/Ordem	Amplitude de hospedeiro	Resultados	Autor (ano)
<i>Podoviridae</i>	Monovalente	Infecta <i>Enterococcus faecalis</i> , mas não infecta <i>Enterococcus faecium</i>	Wang et al. (2018)
<i>Podoviridae</i>	Monovalente	Lisaram 48 cepas de <i>S. aureus</i> de um total de 120	Ganaie et al. (2018)
N.D.	Monovalente	Não infectou todas as cepas teste de <i>Campylobacter jeejuni</i>	Aprea et al. (2018)
N.D.	Monovalente	Não infectou todas as cepas teste de <i>S. aureus</i>	Hsieh et al. (2011)
N.D.	Polivalente	Infectou algumas spp de Enterobacteriaceae e outras não.	Bhetwal et al. (2017)
N.D.	Polivalente	Infectou algumas spp de Enterobacteriaceae e outras não.	Sváb et al. (2018)

N.D. não disponível.

Sugerindo a comparação dos resultados descritos na literatura com os obtidos experimentalmente, que a amplitude de hospedeiros dos fagos isolados podem apresentar diferentes perfis de infectividade contra outras cepas da mesma espécie, incluindo isolados clínicos.

4.3 ESTABILIDADE

Os isolados vB_SaM_NLFC, vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC, assim como os fagos contidos nos filtrados P4CEc e P4CSa, mantiveram a infectividade sob armazenamento à 4°C durante o período de seis meses de análise, demonstrando que tais fagos possuem

boa estabilidade por serem capazes de se manterem viáveis nesta condição de armazenamento a longo prazo.

Sendo os estudos de estabilidade de grande importância para a manutenção e aplicação de fagos, pois a sensibilidade a diferentes estresses ambientais é uma característica intrínseca de cada vírus, e não há um método universal para o seu armazenamento (GOLEC et al., 2011); reportando Jończyk et al. (2011) que a capacidade dos fagos de sobreviverem em diferentes condições de temperatura, pH, força iônica, e concentração de sais mono e divalentes do meio é extremamente diversificada em decorrência da influência que exercem sobre a estrutura e atividade das biomoléculas que compõem o víron, enfatizando que os fagos mais resistentes a tais fatores são os pertencentes a ordem *Caudovirales*, principalmente os da família *Myoviridae*.

Neste contexto, considerando a grande heterogeneidade da estabilidade dos fagos, Jurczak-Kurek et al. (2016) isolaram 83 fagos de amostras de esgoto e os da família *Myoviridae* eram os mais resistentes a diferentes, valores de pH, solventes orgânicos e estresse osmótico temperaturas (corroborando com Aprea et al. (2015)); Hsieh et al. (2011) reportaram um Myovírus isolado, que foi submetido a diferentes condições de armazenamento e manteve sua infectividade em valores de pH entre 5 à 13 por dois anos à -85°C, e que quando à 4°C se manteve viável por quatro anos; enquanto que Bao et al. (2011) reportam uma curta estabilidade de fagos monovalentes para *Salmonella* com a capacidade de manter a infectividade por 1 h à 70°C em valores de pH entre 4 e 10.

De acordo com Aprea et al. (2015), a resistência dos fagos caudados aos estresses ambientais está associada ao tamanho da cauda, na qual fagos com cauda grande tendem a apresentar menor estabilidade em função da maior probabilidade de sofrerem danos estruturais irreparáveis, diferentemente de fagos com cauda pequena, que são menos sujeitos a tais danos, e por tanto tendem a apresentar maior estabilidade.

Sugerindo a comparação dos resultados obtidos com os presentes na literatura que os fagos isolados e os presentes nos filtrados P4CEc e P4CSa apresentam boa estabilidade quando armazenados na forma de filtrados a 4°C, mesmo apresentando caudas consideravelmente longas, dando o trabalho de Aprea et al. (2015) suporte para a hipótese de que o emprego de agitação por vórtex na manipulação dos fagos obtidos e isolados seja negativo por infligir danos nas estruturas da cauda dos fagos, visto que são fagos de tamanho considerável.

Entretanto, os estudos de estabilidade viral neste trabalho foram incipientes, se fazendo necessário a realização de mais estudos sobre a sensibilidade destes vírus frente a diferentes condições físicas e químicas, pois segundo Nars-Elsin et al. (2018) e Casey

et al. (2018), a resistência dos fagos é um fator de extrema importância para a sua futura aplicação, pois o desenvolvimento de um sistema de manutenção e aplicação deve proteger o fago contra estresses ambientais e manter sua infectividade por períodos relativamente longos de armazenamento.

Se fazendo necessária a realização de estudos futuros de estabilidade para tornar possível o planejamento de formulações farmacêuticas e aplicações biotecnológicas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise por microscopia eletrônica de transmissão possibilitou classificar os fagos isolados e os presentes no filtrado P4CEc como pertencentes a ordem *Caudovirales*.

A ordem *Caudovirales* é composta por três famílias, que estruturalmente são compostas por fagos que apresentam um capsídeo preenchido com ds DNA organizado em camadas concêntricas com espaçamento de 25 Å, contendo na região conectora da cabeça com a cauda, uma proteína dodecamérica denominada portal, cuja função é injetar o material genético viral na célula hospedeira, havendo nas extremidades distais da cauda, estruturas de reconhecimento, adsorção e iniciação da infecção (BEBEACUA et al., 2013).

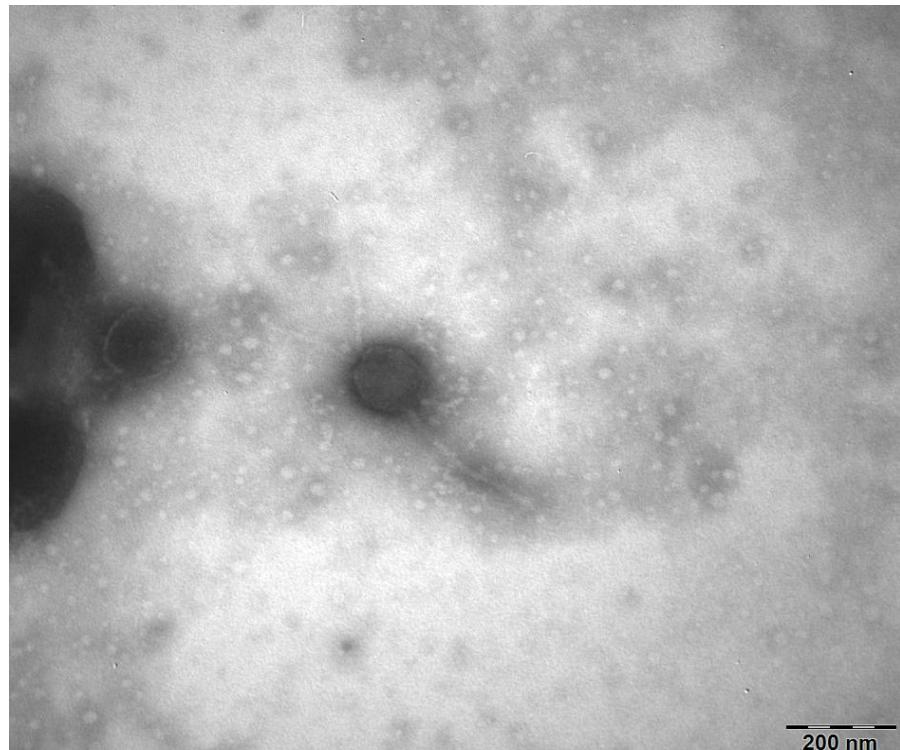
Se diferenciando os fagos das três famílias que compõem a ordem pelas características da cauda, na qual a família *Myoviridae* possui cauda longa e contrátil, a família *Siphoviridae* apresenta cauda longa e não contrátil, e a família *Podoviridae* cauda curta e não contrátil (NELSON, 2014).

O isolado vB_EcS_IPC (figura 23) possui capsídeo com 120,98 ($\pm 3,33$) nm de diâmetro por 137,38 ($\pm 4,54$) nm de comprimento, enquanto sua cauda apresenta 274,56 ($\pm 5,14$) nm de comprimento por 17,73 ($\pm 1,34$) nm de diâmetro, e o fago vB_EcS_LMPC (figura 24) apresenta capsídeo de 133,78 ($\pm 2,14$) nm de diâmetro por 160,93 ($\pm 5,06$) nm de comprimento, e apresenta cauda de 311,19 ($\pm 3,75$) nm de comprimento por 18,14 ($\pm 0,92$) nm de diâmetro, ambos pertencentes a família *Siphoviridae*, e com grande similaridade morfológica. Não tendo sido possível pelos estudos moleculares determinar um maior grau de diferenciação genética entre os isolados.

Neste contexto, os resultados de Kumari et al. (2010) corroboram com a assertiva acima, pois demonstram que fagos da família *Podoviridae* isolados de esgoto, apesar de apresentarem grande similaridade morfológica, também possuíam grande diversidade

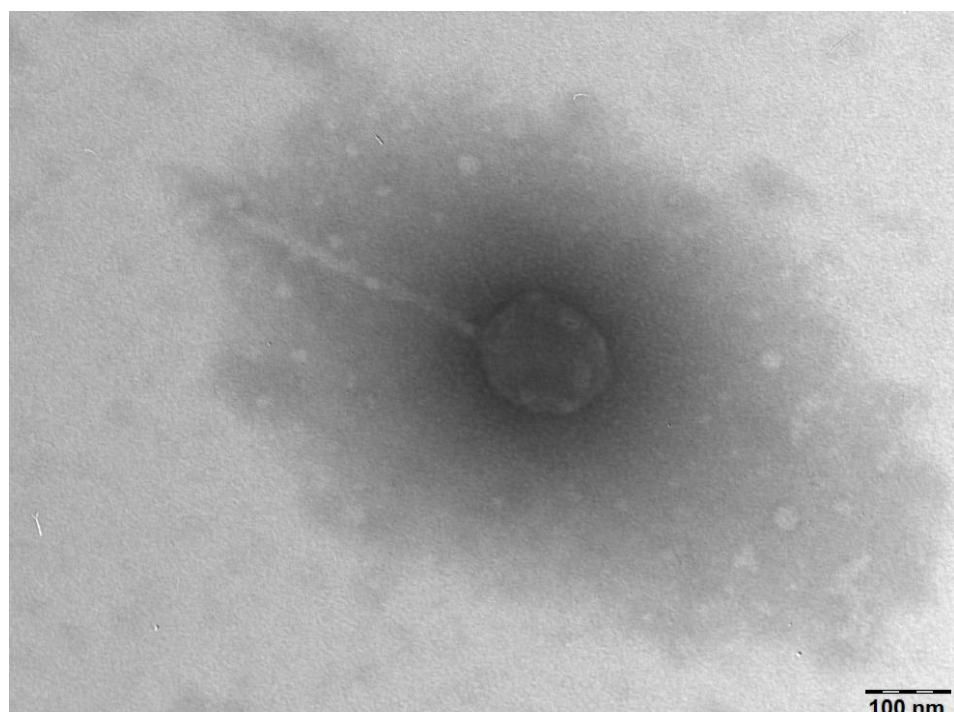
genética, que foi evidenciada por meio de ensaios de RFLP empregando digestão enzimática com *Hinf* 1 e *Bsu* RI, e análises de RAPD-PCR com os genomas fágicos.

Figura 23 - Isolado vB_EcS_IPC tratado por contrastação negativa com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



Fonte: O Autor

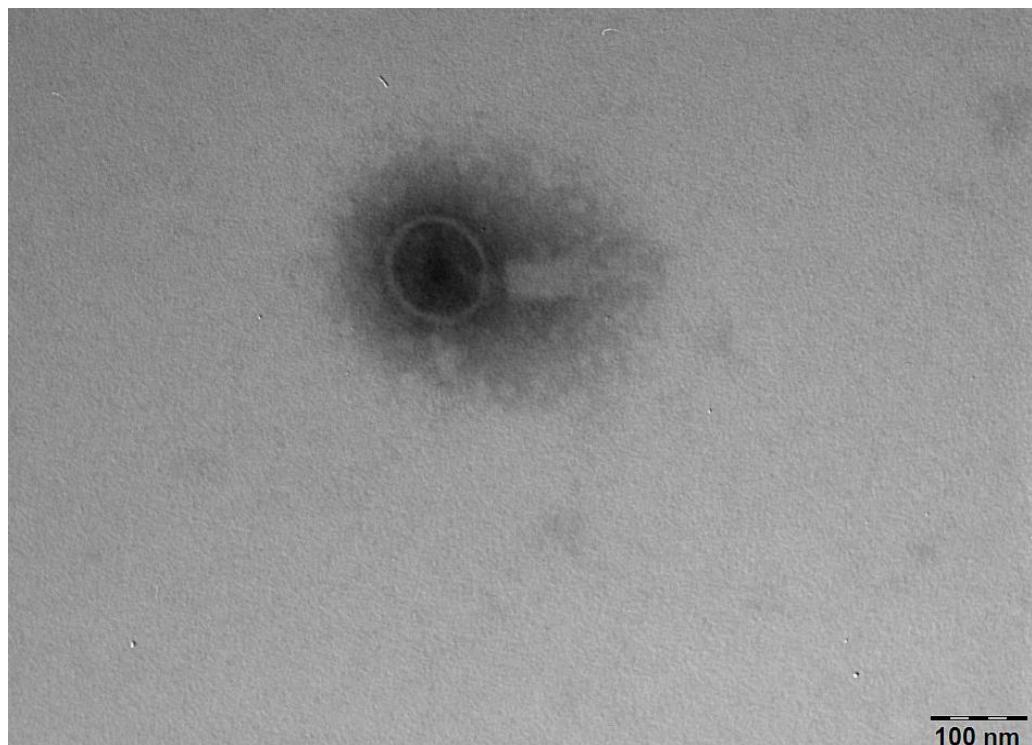
Figura 24 - Isolado vB_EcS_LMPC tratado por contrastação negativa com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



Fonte: O Autor

Já o isolado vB_SaM_NLFC (figura 25) apresentou capsídeo com 103,44 ($\pm 1,68$) nm de diâmetro por 116,23 ($\pm 2,09$) nm de comprimento, e sua cauda apresentou 119,99 ($\pm 1,82$) nm de comprimento por 39,83 ($\pm 0,75$) nm de diâmetro, com morfologia típica da família *Myoviridae*.

Figura 25 - Isolado vB_EcM_NLFC tratado por contraste negativo com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



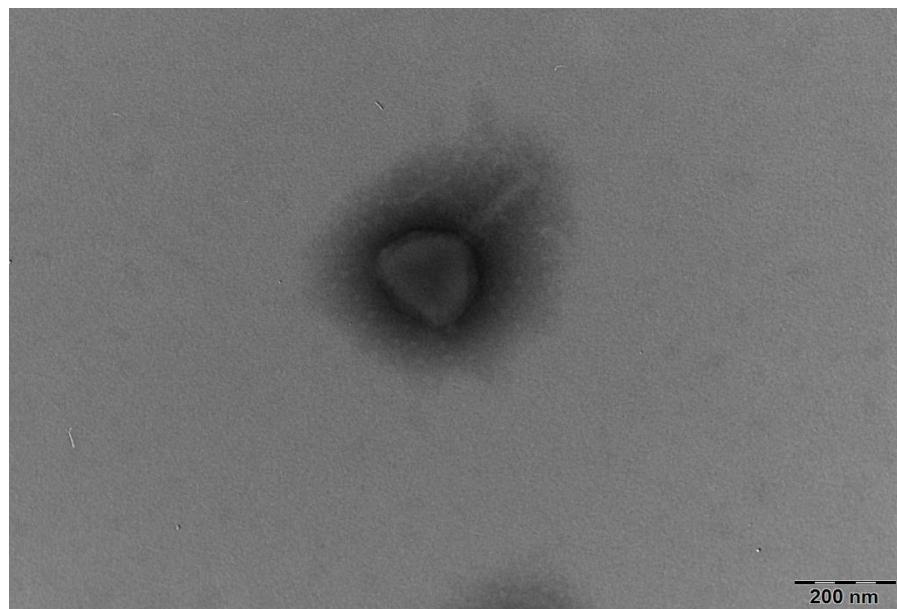
Fonte: O Autor

Enquanto que no filtrado P4CEc foram identificados cinco fagos pertencentes a família *Myoviridae* com as seguintes dimensões:

- P4CEc1 (figura 26) possui capsídeo com 202,57 ($\pm 1,89$) nm de diâmetro por 195,03 ($\pm 4,37$) nm de comprimento, e cauda com 191,00 ($\pm 7,86$) nm de comprimento por 32,07 ($\pm 2,35$) nm de diâmetro;
- P4CEc2 (figura 27) possui capsídeo com 132,93 ($\pm 7,05$) nm de diâmetro por 113,44 ($\pm 1,51$) nm de comprimento, e cauda com 96,98 nm de comprimento por 46,57 ($\pm 1,94$) nm de diâmetro;
- P4CEc3 (figura 28) possui capsídeo com 206,15 ($\pm 8,52$) nm de diâmetro por 194,31 ($\pm 3,41$) nm de comprimento, e cauda com 222,20 ($\pm 5,13$) nm de comprimento por 42,38 ($\pm 5,64$) nm de diâmetro;

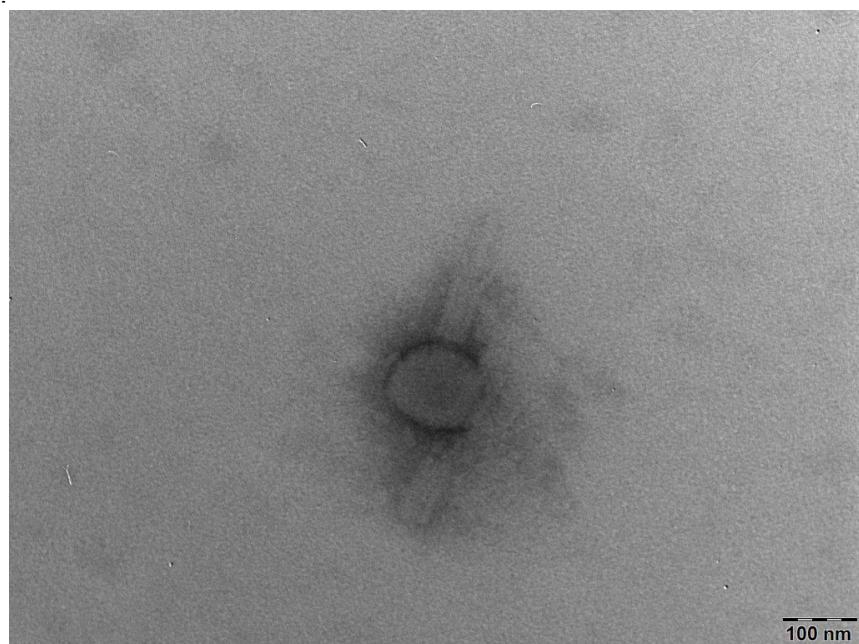
- P4CEc4 (figura 29) possui capsídeo com 192 ($\pm 2,10$) nm de diâmetro por 196,05 ($\pm 2,63$) nm de comprimento, e cauda com 198,37 ($\pm 6,51$) nm de comprimento por 41,87 ($\pm 1,58$) nm de diâmetro;
- P4CEc5 (figura 30) possui capsídeo com 209,86 ($\pm 3,96$) nm de diâmetro por 174,04 ($\pm 2,10$) nm de comprimento, e cauda com 193,62 ($\pm 3,87$) nm de comprimento por 37,96 ($\pm 2,87$) nm de diâmetro;

Figura 26 - Filtrado P4CEC fago 1 tratado por contraste negativo com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



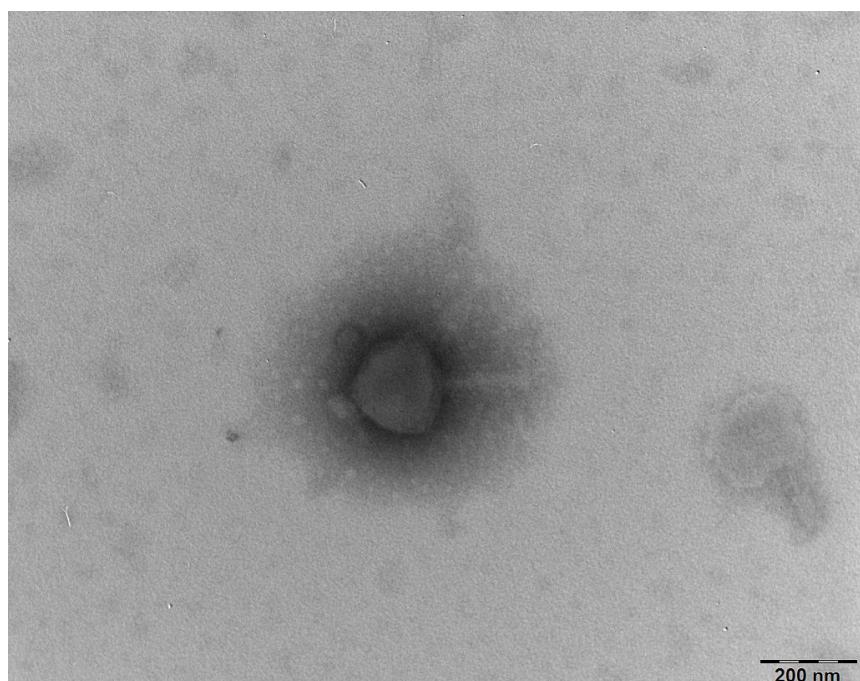
Fonte: O Autor

Figura 27 - Filtrado P4CEC fago 2 tratado por contraste negativo com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



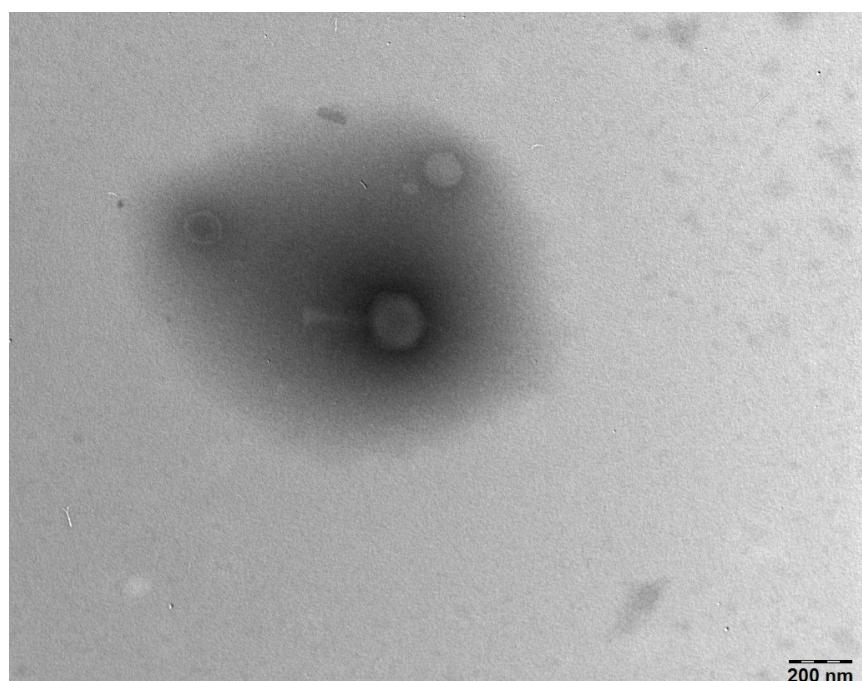
Fonte: O Autor

Figura 28 - Filtrado P4CEC fago 3 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



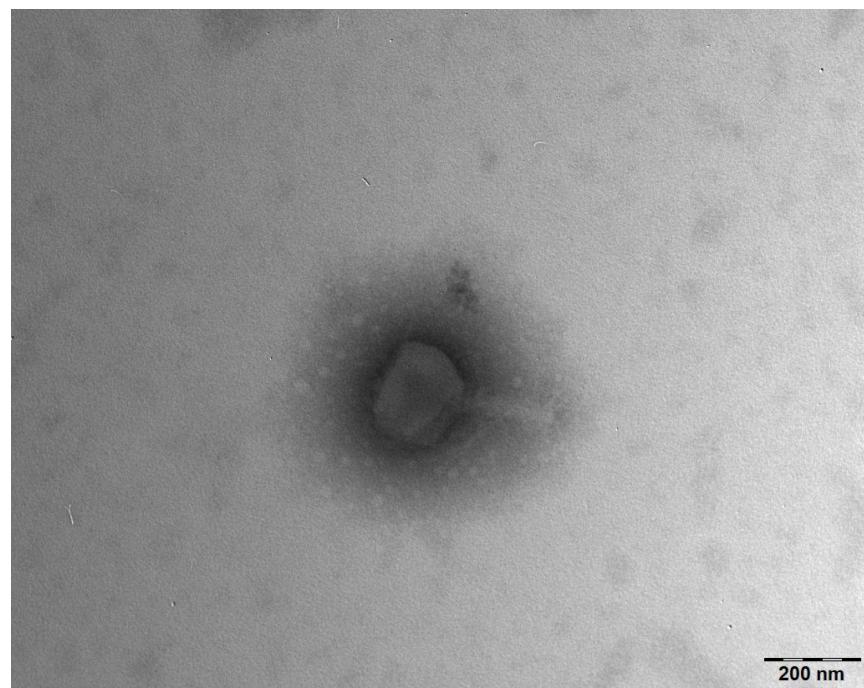
Fonte: O Autor

Figura 29 - Filtrado P4CEC fago 4 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotungstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



Fonte: O Autor

Figura 30 - Filtrado P4CEC fago 5 tratado por contrastação negativa com ácido fosfotúngstico a 2% pH 7,2 com aumento de 140000x.



Fonte: O Autor

E no filtrado P4CSa não foram detectadas partículas virais, assim como também não foi possível cultivá-lo no centro de infectologia Instituto Evandro Chagas, provavelmente em decorrência da perda da estabilidade viral em função das condições de transporte aéreo de Macapá para Belém, e terrestre de Belém à Ananindeua, considerando os períodos intermitentes na qual as amostras ficaram expostas a condições não apropriadas de armazenamento antes de seu processamento.

No entanto, as alíquotas do filtrado P4CSa armazenadas no laboratório de toxicologia e química farmacêutica da Universidade Federal do Amapá se mantiveram viáveis, sendo desconhecida a razão pela qual a amostra encaminhada ao Instituto Evandro Chagas para as análises de microscopia eletrônica de transmissão perderam sua viabilidade.

Na tabela 8, os resultados das análises de microscopia eletrônica de transmissão dos isolados vB_EcS_IPC, vB_EcS_LMPC e vB_SaM_NLFC, e dos cinco *Myoviridae* detectados no filtrado P4CEc podem ser observados.

Tabela 8 - Resultados das dimensões das partículas virais dos isolados vB_EcS_IPC, vB_EcS_LMPC e vB_SaM_NLFC, e dos cinco *Myoviridae* detectados no filtrado P4CEc

Fago	Capsídeo (nm)		Cauda (nm)	
	Diâmetro	Comprimento	Comprimento	Diâmetro
vB_EcS_IPC	120,98 ($\pm 3,33$)	137,38 ($\pm 4,54$)	274,56 ($\pm 5,14$)	17,73 ($\pm 1,34$)
vB_EcS_LMPC	133,78 ($\pm 2,14$)	160,93 ($\pm 5,06$)	311,19 ($\pm 3,75$)	18,14 ($\pm 0,92$)
vB_SaM_NLFC	103,44 ($\pm 1,68$)	116,23 ($\pm 2,09$)	119,99 ($\pm 1,82$)	39,83 ($\pm 0,75$)
P4CEc 1	202 ($\pm 1,89$)	195,03 ($\pm 4,37$)	191,00 ($\pm 7,86$)	32,07 ($\pm 2,35$)
P4CEc 2	132,93 ($\pm 7,05$)	113,44 ($\pm 1,51$)	179,12 ($\pm 5,57$)	46,57 ($\pm 1,94$)
P4CEc 3	206,15 ($\pm 5,14$)	194,31 ($\pm 3,41$)	222,20 ($\pm 5,13$)	42,36 ($\pm 5,64$)
P4CEc 4	192,12 ($\pm 2,01$)	196,05 ($\pm 2,63$)	198,37 ($\pm 6,51$)	41,87 ($\pm 1,58$)
P4CEc 5	209,86 ($\pm 3,96$)	174,04 ($\pm 2,10$)	193,62 ($\pm 3,87$)	37,69 ($\pm 2,87$)

Comparando as dimensões de capsídeo e de cauda dos isolados reportados neste trabalho com outros trabalhos, é possível observar que se tratam de fagos relativamente grandes, principalmente os pertencentes a família *Siphoviridae* e os fagos presentes do filtrado P4CEc.

Mirzaei e Nilsson (2015) isolaram dois Myovírus de amostras de esgoto com capsídeo de 71 nm e outro com 72 nm de diâmetro, e cauda respectivamente de 119 nm, e 126 nm de comprimento, tendo também isolado três Siphovírus cuja amplitude de diâmetro de capsídeo era de 58-69 nm e a cauda era de 154-168 nm de comprimento; Aprea et al. (2015) isolaram de águas residuais da produção de queijo, um Siphovírus com capsídeo de 80 nm de diâmetro e cauda de 90 nm de comprimento; e Bao et al. (2011) isolaram um Myovírus com capsídeo de 74,3 nm de diâmetro e cauda de 114,2 nm de comprimento, e também isolaram um Siphovírus com capsídeo de 57,4 nm de diâmetro e cauda de 103,57 nm de comprimento, ambos provenientes de esgoto de excretas de galinha.

Sendo todas as dimensões de partículas viral mencionadas acima, menores que as encontradas neste trabalho.

Havendo no entanto, trabalhos que reportam o isolamento e caracterização de outros fagos da ordem *Caudovirales* com dimensões similares à dos fagos caracterizados neste trabalho, como por exemplo, Aprea et al. (2018), que reportaram o isolamento de Myovírus com capsídeos de 80-90 nm de diâmetro e cauda de 100-110 nm de comprimento, que foram obtidos a partir de amostras de swabs de cloaca de galinha; e Jurczak-Kurek et al. (2016), que isolaram 83 fagos de amostras de esgoto, dos quais 2 apresentavam capsídeo com 91 nm e 104 nm de diâmetro por 100 nm e 104 nm de

comprimento, e cauda de 103 nm e de 175 nm de comprimento por 22 nm e 26 nm de diâmetro respectivamente. Tais resultados são aproximados aos observados no isolado vB_SaM_NLFC, sendo que este fago é maior que os normalmente reportados na literatura, porém menor que os isolados vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC

Os resultados expostos na discussão podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados descritos na literatura que apontam que os fagos isolados neste trabalho possuem partículas virais muito maiores que o comum, apresentando similaridade apenas a dimensão do fagos da família *Siphoviridae* descrito por Aprea et al. (2015) e entre 2 fagos *Myoviridae* reportados por Jurczak-Kurek et al. (2016) com o isolado vB_SaM_NLFC.

Bacteriófago Família/Ordem	Particula viral	Autor (ano)
2 Caudovirales	Cp: 90-91 nm; Cd: 100-109 nnm	Jurczak-Kurek et al. (2016)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 71 – 72 nm; Cd: 119 – 126 nm	Mirzaei e Nilsson (2015)
<i>Siphoviridae</i>	Cp: 58 nm; Cd 154 nm	
<i>Siphoviridae</i>	Cp: 69 – 80 nm; Cd: 90 – 168 nm	Aprea et al. (2015)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 74,3 nm; Cd: 114,2 nm	Bao et al. (2011)
<i>Siphoviridae</i>	Cp: 57,4 nm; Cd: 103,57 nm	
<i>Myoviridae</i>	Cp: 80 - 90 nm; Cd: 100-110 nm	Aprea et al. (2018)

Cp Capsídeo, Cd Cauda.

Em relação aos fagos contidos no filtrado P4CEc e os isolados vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC, as dimensões de partícula viral registradas sugerem que tais bacteriófago sejam gigantes, também conhecidos como bacteriófagos jumbo, que são vírus predominantemente pertencentes a família *Myoviridae*, mas havendo também registos de fagos jumbo pertencentes a família *Siphoviridae*, que normalmente são isolados em hospedeiros gram-negativos, apresentam genoma maior que 200 kbp, o que consequentemente exige destes fagos um capsídeo de tamanho significativamente grande para abrigar um enorme genoma, também se diferenciando dos fagos de genoma menor, por apresentarem origem evolutiva distinta e possuírem enzimas como DNA e RNA polimerases, lisinas, quitinases, glicosil hidrolases e liases (YUAN; GAO, 2017; SAAD et al., 2019; BUTTNER et al., 2016).

Ressaltando que o filtrado P4CEc e os isolados vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC foram obtidos e submetidos a isolamento com bactérias gram negativas. Entretanto, os estudos moleculares realizados não permitiram a determinação do tamanho genômico dos isolados, e o não isolamento dos fagos no filtrado P4CEc impossibilita qualquer inferência discriminatória entre os genomas dos cinco fagos presentes no filtrado.

Porém a comparação do tamanho de partículas virais de fagos jumbos amplamente caracterizados dá suporte à hipótese de que os isolados e dos fagos no filtrado P4CEc sejam do tipo jumbo.

Arens et al. (2018) reportaram o isolamento de dois Myovírus de amostras de macieira com genoma de 235 kbp, capsídeo de 143,6±6 nm de diâmetro e cauda 206,8±3,6 nm de comprimento por 23,2±2,4 nm de diâmetro; Drulis-Kawa et al. (2014) isolaram um Myovírus de esgoto com genoma de 375 kbp, capsídeo de 131 nm de diâmetro e cauda de 136 nm de comprimento por 19 nm de diâmetro; Hua et al. (2017) isolaram 6 Myovírus de amostras ambientais com genomas entre 207 kpb à 440 kbp e capsídeo de 107 nm à 144 nm; Buttimer et al. (2017) isolaram o fago vB_PcaM_CCB, que possui genoma de 355 kbp, capsídeo de 126±4,9 nm de comprimento por 128±0,6 nm de diâmetro, e cauda de 123±2,6 nm de comprimento por 27,1±1,8 nm de diâmetro.

E Attai et al. (2018) isolaram um Myovírus que infecta o fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*, com genoma de 440 kbp, capsídeo de 152±0,8 nm de diâmetro por 146±0,6 nm de comprimento, com cauda de 136±0,5 nm de comprimento; Jacquemot et al. (2018) reportaram o isolamento de um Myovírus capaz de infectar a bactéria *Vibrio corallityus*, com genoma de 303 kbp, capsídeo de 120 nm de diâmetro e cauda de 190 nm de comprimento; e Day et al. (2018) isolaram quatro Myovírus jumbo com genomas entre 253 kbp à 255kbp com capsídeo de 120 nm de diâmetro e cauda de 150 nm de comprimento, e também compatíveis com os resultados registrados para o isolado vB_SaM_NLFC.

Os resultados presentes na literatura apresentados na discussão deste trabalho sobre fagos jumbos podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10 - Descrição do tamanho de partícula viral e tamanho de genoma de fagos Jumbo amplamente caracterizados presentes na literatura.

Bacteriófago Família/Ordem	Partícula viral	Genoma	Autor (ano)
2 <i>Myoviridae</i>	Cp: 143,6 nm; Cd: 206,8 nm x 23,2 nm	235 kbp	Arens et al. (2018)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 131 nm; Cd: 136 nm x 19 nm	375 kbp	Drulis-kawa et al. (2014)
6 <i>Myoviridae</i>	Cp: 107 – 144 nm; Cd: n.d.	207-440 kbp	Hua et al. (2017)
vB_PcaM_CCB	Cp: 126 nm x 128 nm; Cd: 123 nm x 27 nm	355 kbp	Buttimer et al. (2017)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 152 nm x 146 nm; Cd: 136 nm	440 kbp	Attai et al. (2018)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 120 nm; Cd: 190 nm	303 kbp	Jacquemot et al. (2018)
<i>Myoviridae</i>	Cp: 120 nm; Cd:150 nm	Entre 253-255 kbp	Day et al. (2018)

Cp Capsídeo, Cd Cauda.

Sendo os resultados observado nos fagos presentes no filtrado P4CEc e nos isolados vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC similares aos descritos acima, e o fago vB_SaM_NLFC apresenta similaridade com os fagos jumbos descritos por Hua et al. (2017) e Buttimer et al. (2017).

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A extração de material genômico por meio de kits Quick – DNA/RNA viral TM dos concentrados virais obtidos por precipitação com PEG 4000 resultou na obtenção de material genômico 1) o suficiente para a caracterizar o material genético dos isolados vB_EcS_IPC, vB_EcS_LMPC e vB_SaM_NLFC como sendo ds DNA, devido a estereoespecificidade das enzimas Eco RI e Hind III por ds DNA nas regiões com sequências GAATTC / CTTAAG e AAGCTT / TTCGA, respectivamente (WITTEK et al., 1977; HALFORD et al., 1979; HERPFER et al., 1989); mas 2) insuficiente para diferenciar geneticamente ao nível molecular por meio da técnica de RFLP os isolados descritos em decorrência da obtenção de massa de material genético abaixo do limite de detecção de fragmentos pela técnica de eletroforese corada com brometo de etídio.

Sendo o mesmo resultado acima também observado nas amostras dos filtrados P4CEc e P4cSa. Ressaltando que o filtrado P4CEc possui 5 fagos, e a amostra P4CSa não apresenta o status de isolado confirmado pelos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão.

No entanto, a ocorrência de digestão enzimática com Eco RI e Hid III revelam que a amostra P4CSa também apresenta material genético constituído de ds DNA. Possibilitando inferir que em decorrência do método de isolamento, amplitude de hospedeiros observada e o tipo de ecossistema (esgoto) da qual as amostras foram coletadas, sugerem a classificação na ordem *Caudovirales* ao material viral contido na amostra P4CSa, porém não sendo possível a distinção ao nível de família.

Pois em decorrência do método de isolamento adotado, na qual clorofórmio foi utilizado, é possível excluir a possibilidade da presença de fagos das famílias *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Cystoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Plasmaviridae* e *Globulaviridae*, que também apresentam ds DNA, mas possuem elevado conteúdo lipídico em seus vírions (MÄNTYNEN et al., 2019); e também excluir a possibilidade de fagos do grupo *Salterprovius* e das famílias, *Rudiviridae* *Clavaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*,

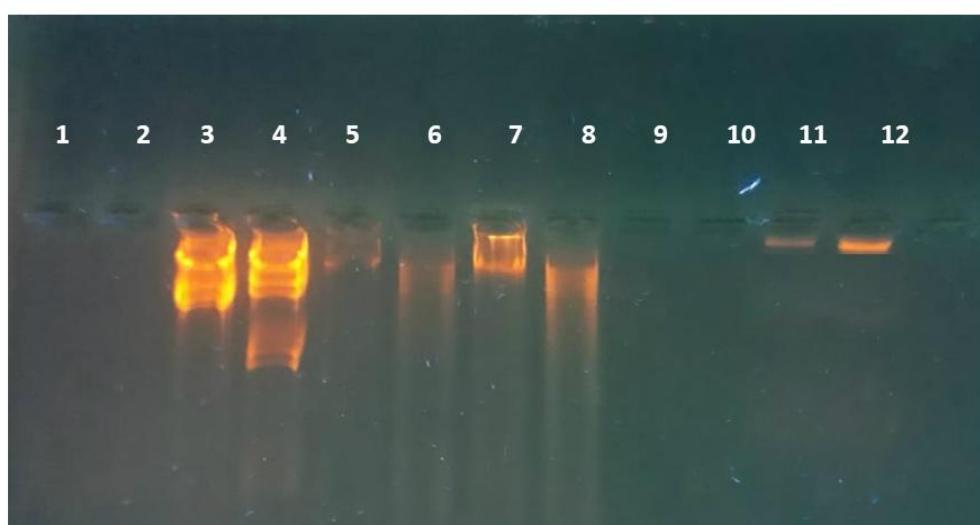
Ampullaviridae, *Bicaudaviridae* em decorrência da especificidade de hospedeiros, incluindo archaea, e serem vírus extremófilos de habitats aquáticos termais, hipersalinos ou ácidos (ACKERMANN, 2007; ACKERMANN, 2011; ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

Na figura 16 (materiais e métodos) é possível observar a padronização do ensaio de padronização da técnica com DNA comercial do fago λ digerido com a enzima Hind III, apresentando 8 fragmentos, demonstrando o esperado pela técnica conforme o descrito pelo fabricante e observado em trabalhos que utilizam os fragmentos gerados no DNA do fago λ por meio da reação enzimática com esta enzima como marcadores de peso molecular (KLIEVE; SWAIN, 1993; SILVA et al., 2015) para identificação de material genético com propriedades conhecidas, amplificado ou não; ou para caracterizar o peso molecular de material genético de uma determinada amostra pelo cálculo de regressão linear considerando a relação entre tamanho e peso molecular com o fator de retenção (rf = distância percorrida pelo tampão de carregamento amostra/distância da banda de material genético) (NELSON; COX, 2011).

Sendo os resultados obtidos nas amostras analisadas afirmativo apenas para a ocorrência de digestão com ambas as endonucleases utilizadas, podendo esta ser evidenciada pela comparação das amostras digeridas com EcoRI (fago λ , P4CEc e P4CSa nos poços 3, 5 e 7 respectivamente) e Hind III (fago λ , P4CEc e P4CSa nos poços 4,6 e 8) com os materiais genômicos das amostras P4CEc e P4CSa nos poços 11 e 12.

Tal resultado pode ser observado na figura 31.

Figura 31 - Eletroforese do material de restrição das amostras P4CEc e P4CSa. No poço 3 λ +EcoRI, no poço 4 λ +HindIII, no poço 5 P4CEc + EcoRI, o poço 6 P4CEc+HindIII, no poço 7 P4CSa+EcoRI, no poço 8 P4CSa+HindIII, e nos poços 11 e 12 P4CEc e P4CSa genômico respectivamente.



Fonte: O Autor

5 PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram isolados três bacteriófagos pertencentes à ordem *Caudovirales*, dois pertencem à família *Siphoviridae*, e um à família *Myoviridae*, todos com amplitude de hospedeiro do tipo polivalente, e com estabilidade superior a seis meses em armazenamento na forma de filtrados mantidos a 4°C. Tendo também sido descrito morfologicamente cinco fagos da família *Myoviridae* obtidos com *Escherichia coli*.

Demonstrando tanto os isolados, como os fagos presentes nos filtrados, possuem potencial de empregabilidade na terapêutica e aplicação biotecnológica para o controle das espécies bacterianas testadas, bem como, para outras espécies de importância clínica.

Entretanto, são necessários estudos mais extensos sobre a amplitude de hospedeiros de bactériofagos, assim como provas de aplicação para fomentar a pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos ou biotecnológicos contendo fagos como ativos sejam lançados no mercado.

Mas de contra partida, também deve ser levado em conta que este é o primeiro estudo sobre isolamento e caracterização de bacteriófagos do Estado do Amapá, e um dos poucos da região norte que contribuem para o fomento do conhecimento deste tipo de vírus na região amazônica e na América do Sul, pois muitas das informações conhecidas sobre os bacteriófagos são proveniente de fagos isolados da Europa e América do Norte (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012), ainda havendo poucos estudos, principalmente de microscopia eletrônica de transmissão com fagos de outras partes do mundo (ACKERMANN, 2011).

Sendo observado neste trabalho que há fagos gigantes no canal das pedrinhas, e que estes possuem potencial empregabilidade terapêutica e também biotecnológica para o controle de bactérias patogênicas.

A seguir, são apresentadas algumas perspectivas para a realização de futuros trabalhos que podem ser desenvolvidos com os fagos isolados e obtidos nos filtrados P4CEc e P4CSa, que também podem ser aplicadas a outros fagos, com o intuito de aplicação como agentes anti-infecciosos.

5.1 APLICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES ANTI-INFECCIOSOS

Farmacologicamente, o emprego dos bacteriófagos como antibacterianos possui propriedades peculiares, como, a capacidade de auto dosagem, em decorrência do processo de replicação viral que dispensa a necessidade de administração de doses de manutenção para acondicionar os níveis séricos de um determinado antibiótico dentro do intervalo da janela terapêutica durante o tempo necessário para que a resposta farmacológica ocorra (LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011). O que caracteriza a terapia fágica como sendo um tratamento ativo, diferentemente do tratamento passivo realizado com substâncias químicas (ABEDON; THOMAS-ABEDON, 2010).

Possivelmente implicando uma maior comodidade ao paciente devido a não necessidade de um esquema posológico com muitas doses, podendo contribuir para uma maior adesão ao tratamento, resultando consequentemente em uma redução na frequência de falhas decorrentes de uso errado de antibióticos.

E em relação às propriedades farmacocinéticas, os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, são respectivamente dependentes do tipo de sistema de carreamento, que precisa ser eficaz em transportar os fagos até o sítio em que sua ação é desejada, evitando o seu decaimento pelo sistema imunológico, para que cheguem à densidade suficiente para performarem seus mecanismos farmacodinâmicos, que pode uma cascata de eventos que alteram a expressão de genes estruturais e funcionais das bactérias, resultando em morte; diferentemente dos fármacos químicos que podem interagir com inúmeros sistemas enzimáticos do organismo humano, como o sistema CYP 450 (ABEDON; THOMAS-ABEDON, 2010; ABEADON et al., 2011; SULAKVELIDZE et al., 2011).

Sugerindo os aspectos cinéticos e dinâmicos da terapia fágica, uma alternativa segura para pacientes com infecções bacterianas e portadores de doenças crônicas como depressão, cardiopatias, distúrbios da coagulação, e pacientes geriátricos, que fazem uso contínuo de um ou mais medicamentos, pois o número de interações medicamentosas com antibióticos é consideravelmente grande (SULAKVELIDZE et al., 2011), como por exemplo, o uso de velafaxina com amoxicilina potencializa os riscos de morte por síndrome serotoninérgica, o uso de furosemida com gentamicina aumenta a toxicidade da gentamicina, e a utilização de varfarina com penicilina elevam os riscos de eventos hemorrágicos (OLIVEIRA; LIMA DELLAMORA, 2013).

Sendo a segurança da terapia fágica demonstrada por Bruttin e Brüssow (2005) por meio da administração oral de fagos T4 a voluntários humanos e efetivo como

demonstrado em estudos clínicos para o tratamento de úlceras venosas em seres humanos (RHOADS et al., 2009), tratamento de infecção do trato urinário por *Pseudomonas aeruginosa* (KHAWALDEH et al., 2011), no tratamento de otite crônica causada por *Pseudomonas aeruginosa* multe resistente aos antibióticos (WRIGHT, 2009), porém a sua efetividade é dependente do tipo de formulação empregada (QADIR et al., 2018), como demonstrado por SARKER et al. (2016), que administrou fagos em crianças com diarréia bacteriana aguda e não observou reações adversas, mas também não obteve êxito no tratamento.

O que reforça a necessidade de mais estudos sobre a estabilidade dos fagos isolados, para viabilizar o planejamento e desenvolvimento de formulações específicas para a terapia fágica, pois o tipo de formulação além de ser um fator limitante na terapêutica, também é responsável por manter a estabilidade dos fagos em prateleira. Representando uma perspectiva de grande relevância para trabalhos futuros com os fagos isolados.

Implicando também na possibilidade de emprego de fagos no tratamento ou manejo de doenças crônicas nas quais bactérias atuam como indutores determinantes na cronicidade e não apenas como agravante clínico, como *Helicobacter pylore* em casos de gastrite intestinal e úlceras pépticas, *Campylobacter* em casos de síndrome de gülain-barré, e *Borrelia burgdorferi* em casos de artrite de lyme (O'CONNOR et al., 2006).

Existindo também relatos da utilização de bacteriófagos líticos na prevenção de contaminação de ambientes hospitalares, curativos de tecidos moles para evitar infecções (PELFRENE et al, 2016), descontaminação de pacientes e profissionais de saúde (HOUSBY; MANN, 2009), eliminação de biofilmes (ELBREKI et al., 2014), e prevenção de doenças transmitidas por alimentos (AZIZIAN et al., 2013; ENDERSEN et al., 2014; MOYE et al., 2018)

Sendo recomendado que os bacteriófagos selecionados para tais finalidades devam ser líticos, apresentar alta virulência, elevada progênie após infectar uma célula, e interajam com diferentes espécies bacterianas, para manterem altas as densidades virais nos sítios de infecção (KINGWELL, 2015; MIRZAEI; NILSSON, 2015); além da capacidade de resistirem aos processos farmacotécnicos de produção de medicamentos e suas devidas vias de administração (CASEY et al., 2018).

5.2 APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES ANTI-INFECIOSOS

Embora os bacteriófagos líticos sejam considerados os candidatos ideais para a terapia fágica, o isolamento de fagos lisogênicos também é relevante para a descoberta de novos antibióticos em função da ocorrência da produção de proteínas responsáveis pela degradação de peptidoglicano na porção intracelular da parede celular para possibilitar a liberação da progênie viral para o meio extracelular (sendo tais proteínas denominadas lisinas fágicas, lisinas ou ainda endolisinas); que também possuem atividade hidrolítica sobre a parede celular bacteriana quando isoladas, tornando consequentemente os bacteriófagos lisogênicos promissores objetos de estudo para a pesquisa de novos antibióticos de natureza enzimática (JUN et al., 2017).

Estas enzimas geralmente codificadas por bacteriófagos lisogênicos, são também conhecidas por tenderem a apresentar além da atividade de hidrolase, funcionalidades que variam de acordo com a biologia viral, incluindo participação em etapas da morfogênese viral e em processos iniciais do processo infeccioso (SCHMELCHER et al., 2012).

Estruturalmente, as endolisinas de bacteriófagos podem possuir um ou mais domínios catalíticos, e domínio(s) de ligação à parede celular, que respectivamente são responsáveis pela hidrólise do peptidoglicano e conectividade da proteína viral com a parede celular bacteriana (PROENÇA et al., 2015).

Nas últimas décadas, em função do bioterrorismo com a bactéria *Bacillus anthracis*, crescentes casos de intoxicações e infecções alimentares, além da crescente incidência global de patógenos resistentes, vêm motivando a comunidade científica a trabalhar na elucidação das propriedades bioquímicas e possível empregabilidade das endolisinas no tratamento de infecções bacterianas e controle de patógenos em alimentos (OLIVEIRA et al., 2014; KONG; RYU, 2015; PARK et al., 2018).

Demonstrando dados experimentais que as endolisinas possuem grande efetividade contra bactérias gram positivas devido ao fato de estas possuírem a parede celular exposta, porém reduzida atividade contra gram negativas. Entretanto, tecnologias relacionadas a modificações das propriedades físico-químicas do meio (pH, força iônica) possibilitam a interação das endolisinas com a membrana externa das bactérias gram negativas e interações com suas paredes celulares. Além disso, devido ao fato dos bacteriófagos possuírem uma grande abundância e diversidade biológica, suas proteínas

podem ser clonadas e produzidas por tecnologia recombinante, e sua produção ocorrer em larga escala (CURTRIGHT; ABEDON, 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Sendo relevante ressaltar que peptídeos fágicos e seus derivados podem ainda serem estudados estruturalmente e analisados por métodos quânticos para inibir processos bacterianos ou mecanismos de virulência; representando uma abordagem completamente nova na terapêutica de infecções persistentes ou causadas por patógenos resistentes (SELVARAJ et al., 2013; ORNDORFF, 2016), e para o desenvolvimento de novos fármacos por meios computacionais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste trabalho, três bacteriófagos foram isolados, 5 estão contidos em um filtrado viral obtido com *Escherichia coli*, e um filtrado fágico foi obtido com *Staphylococcus aureus*, sendo o seu estado de isolamento incerto; todos obtidos a partir de amostras de esgoto doméstico não tratado.
- Todo os fagos reportados são viáveis ao armazenamento à 4°C na forma de filtrado por mais de seis meses. Sugerindo tal resultado os fagos obtidos possuem resistência à condição física de armazenamento estudada, e esta pode ser considerada para o planejamento de formulações farmacêuticas contendo tais fagos, principalmente no que diz respeito a aspectos como validade e condição de armazenamento do produto acabado.
- A avaliação da extensão da amplitude de hospedeiros de importância clínica dos bacteriófagos isolados e dos filtrados fágicos demonstram potencial aplicabilidade terapêutica e biotecnológica, pois os fagos isolados apresentam amplitude de hospedeiro polivalente, e os filtrados P4CEc e P4CSa também foram capazes de infectar e lisar mais de uma bactéria teste.
- A caracterização morfológica dos bacteriófagos isolados por microscopia de transmissão, assim como a dos contidos no filtrado P4CEc, revelam que todos os fagos obtidos são pertencentes a ordem de fagos portadores de cauda, denominada *Caudovirales*, sendo que os isolados vB_EcS_IPC e vB_EcS_LMPC são pertencentes à família *Siphoviridae* (fagos com cauda longa e não contrátil), enquanto o isolado vB_SaM_NLFC e os fagos contidos no filtrado P4CEc são pertencente à família *Myoviridae* (fagos com cauda longa e contrátil). Apresentando todos dimensões de partículas virais consideravelmente grandes o suficiente para caracterizá-los como fagos gigantes ou do tipo jumbo.
- Os ensaios de biologia molecular (RFLP) permitiram apenas a caracterização do tipo de material genético presente nos isolados e nas amostras dos filtrados P4CEc e P4CSa; todos constituídos de ds DNA, concordando com os resultados obtidos nos ensaios de microscopia eletrônica, visto que é encontrado ds DNA nos vírus da ordem *Caudovirales*. Porém não foi possível distinguir geneticamente os isolados

obtidos devido a obtenção de material genômico que após submetido a digestão com as endonucleases EcoRI e HindIII, geraram fragmentos em quantidade inferior ao limite de detecção da técnica. O que impossibilitou a observação dos fragmentos e análise de seus respectivos pesos moleculares.

REFERÊNCIAS

ABEADON, ST; KUHL, SJ; BLASDEL, BG; KUTTER, EM. Phage Treatment of Human Infections. **Bacteriophage**. v.1, n.2, p.66-84, 2011.

ABEDON, S. T.; THOMAS-ABEDON, C. Phage Therapy Pharmacology. **Current pharmaceutical biotechnology**. v.11, p.28-47, 2010.

ACKERMANN, H.-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of Virology**, v. 152, n. 2, p. 227–243, 6 fev. 2007.

ACKERMANN, H.W. Bacteriophage Taxonomy. **Microbiology Australia**, v. 32, n. 2, p. 90–94, 2011.

ACKERMANN, H.-W.; PRANGISHVILI, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. **Archives of Virology**, v. 157, n. 10, p. 1843–1849, 3 out. 2012.

ADRIAENSSENS, E.; BRISTER, J.R. How to name and classify your phage: An informal guide. **Viruses**, v.9, n. 70, p. 1-9, 2017.

AMARAL, M. D. B. As feiras em cidades médias da Amazônia: as relações desenhadas a partir das experiências nas cidades de Marabá-PA, Macapá-AP e Castanhal-PA. **Geousp – Espaço e Tempo**, v. 20, n. 2, p. 376-391, 2016.

ANDERSSON, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 461–465, 2006.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 901–911, 2011.

APREA, G.; D'ANGELANTONIO, D.; BONI, A.; CONNERTON, P.; CONNERTON, I.; SCATTOLINI, S.; MAROTTA, F.; POMILLO, F.; MIGLIORATI, G.; D'ALTERIO, A.; DI GIANNATALE. Isolation and Morphological Characterization of New Bacteriophages Active against *Campylobacter jejuni*. **American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2018.

APREA, G.; D'ANGELO, R.; ANNUNZIATA, V.; PRENCIPE, A.; MIGLIORATI, G. Bacteriophage Morphological Characterization by Using Transmission Electron Microscopy. **Journal of Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 214–220, 28 maio 2015.

ARAP, M.A. Phage display Technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2005.

ARENS, D.K.; BRADY, T.S.; CARTER, J.L.; PAPE, J.A.; ROBINSON, D.M.; RUSSELL, K.A.; STALEY, L.A.; STELLER, J.M.; TATEOKA, O.B.; TOWNSEND, M.H.; WHITLEY, T.K.; WIENCLAW, T.M.; WILLIAMSON, T.L.; JOHNSON, S.M.; GROSE, J.H. Characterization of two related *Erwinia* myoviruses that are distant relatives of the PhiKZ-like Jumbo phages. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200202, 6 jul. 2018.

ASOKAN, G. V.; KASIMANICKAM, R. K. Emerging Infectious Diseases, Antimicrobial Resistance and Millennium Development Goals: Resolving the Challenges through One Health. **Central Asian Journal of Global Health**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2013.

ATTAI, H.; BOON, M.; PHILLIPS, K.; NOBEN, J.P.; LAVIGNE, R.; BROWN, P.J.B. Larger Than Life: Isolation and Genomic Characterization of a Jumbo Phage That Infects the Bacterial Plant Pathogen, *Agrobacterium tumefaciens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. August, p. 1–14, 14 ago. 2018.

AZIZIAN, R.; MOUSAVI, S.S.; AHMADI, N.A. Bacteriophage as a novel antibacterial agent in industry and medicine. **Journal of Paramedical Sciences**, v.4, n.4, p. 93-101, 2013.

BAO, H.; ZHANG, H.; WANG, R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2370–2377, 2011.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

BEBEACUA, C. et al. Visualizing a Complete Siphoviridae Member by Single-Particle Electron Microscopy: the Structure of Lactococcal Phage TP901-1. **Journal of Virology**, v. 87, n. 2, p. 1061–1068, 15 jan. 2013.

BHETWAL, A.; MAHARJAN, A.; SHAKYA, S.; SATYAL, D.; GHIMIRE, S.; KHANAL, P.R.; PARAJULI, N.P. Isolation of Potential Phages against Multidrug-Resistant Bacterial Isolates : Promising Agents in the Rivers of Kathmandu , Nepal. **BioMed Research**, v. 2017, p. 10, 2017.

BLAIR, J.M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BLANQUART, F.; LEHTINEN, S.; LIPSITCH, M.; FRASER, C. The evolution of antibiotic resistance in a structured host population. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 143, 2018.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O GEFEN, O.; BALABAN, N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.

BRUTTIN, A.; BRÜSSOW, H.; BRU, H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally : a Safety Test of Phage Therapy These include : Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally : a Safety Test of Phage Therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2874–2878, 2005.

BUTTNER, C.; HENDRIX, H.; OLIVEIRA, O.; CASEY, A.; NEVE, H.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, NOBEN, J.P.; O'MAHONY, J.; LAVIGNE, R.; COFFEY, A. Things Are Getting Hairy: Enterobacteria Bacteriophage vB_PcaM_CBB. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. January, p. 1–16, 24 jan. 2017.

BUTTNER, C.; O'SULLIVAN, L.; ELBREKI, M.; NEVE, H.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Genome Sequence of Jumbo Phage

vB_AbaM_ME3 of *Acinetobacter baumannii*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. 2006–2007, 25 ago. 2016.

CALSTEREN, M. VAN; MOINEAU, S. Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4364–4369, 2002.

CARDOSO, J.P.; OLIVEIRA, N.I.S.; FERREIRA, J.F.C. Planejamento urbano e ambiental no canal das pedrinhas - Ap (Brrasil): entraves e desafios. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v.13, n.1. P. 218-232, 2017.

CASEY, E.; VAN SINDEREN, D.; MAHONY, J. In vitro characteristics of phages to guide 'real life' phage therapy suitability. **Viruses**, v. 10, n. 4, 2018.

CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1855-1864, 2000.

CHIBANI-CHENNOUFI, S. BRUTTIN, A.; DILLMANN, M-L, BRÜSSPW, H. Phage-Host Interaction : an Ecological Perspective MINIREVIEW. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 12, p. 3677–3686, 2004.

CHLORAMPHENICOL, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/structures/DB00446/image.svg>>.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762–767, 2000.

COSTA, A.L.P.; SILVA-JÚNIOR, A.C.S. Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Breve Revisão de Literatura. **Estação Científica**, v.7, n.2, p. 45-57, 2016.

COSTA, A.L.P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos - Uma Perspectiva do Fenômeno Biológico Suas Consequencias d Estrategias De Contenção**. 2016 63f. Monografia (Graduação) – Curso de Bacharelado Em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amapá.

CUNHA, E.L. **Avaliação da contaminação bacteriana e pormetais pesados na orla fluvial do município de Macapá, Amapá**. 2012. 155 f. Dissertação (Mestrado): Programa de Pós graduação em biodiversidade tropical, UNIFAP, Macapá, 2012.

CURTRIGHTA, J.; ABEDON,S.T. Phage Therapy: Emergent Property Pharmacology. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. s6, 2011.

DAPTOMYCIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/structures/DB00080/image.svg>>.

DAWKINS, R. **As evidências da evolução: O maior espetáculo da terra**. Editora Companhia das Letras, São Paulo, 2009.

DAY, A.; AHN, J.; SALMOND, G. P. C. Jumbo Bacteriophages Are Represented Within an Increasing Diversity of Environmental Viruses Infecting the Emerging Phytopathogen, *Dickeya solani*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–15, 12 set. 2018.

DRULIS-KAWA, Z.; OLSZAK, T.; DANIS, K.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; ACKERMANN, H.W. A giant *Pseudomonas* phage from Poland. **Archives of Virology**, v. 159, n. 3, p. 567–572, 26 mar. 2014.

DUARTE, M. W. **Atividade Antimicrobiana e Produção e Enzimas Extracelulares por Actinomicetos Isolados de Solo**. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ELBREKI, M.; ROSS, R.P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Bacteriophage and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment, **Journal of Viruses**, v. 2014, p. 1-20, Article ID 382539, 2014.

ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Phage therapy in the food industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.5, p. 327, 349, 2014.

ENOXACIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em:
<<https://www.drugbank.ca/structures/DB00467/image.svg>>.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature**, v. 15, n. 8, p. 453–464, 2017.

FRUCIANO, E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 19–26, 2007.

GANAEI, M.Y.; QURESHI, S.; KASHOO, Z.; WANI, S.A.; HUSSAIN, M.I.; KUMAS, R.; MAQBOOL, R.; SIKANDER, P.; BANDAY, M.S.; MALLA, W.A.; MONDAL, P.; KHAN, R.I.N. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against Bovine mastitis. **Veterinary Research Communications**, v. 42, n. 4, p. 289–295, 15 dez. 2018.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMP, E.; UMFAUF, G.; NADAL, M.; PLOEG, N.V.D.; ZEE, S.E.A.T.M.; RITSEMA, C.J.; Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v.3, n.1, p. 57-65, 2015.

GESTAL., C.; HOLBAN, A.M. Advances in Nanotechnology as an Alternative Against Superbugs, **JSM Chemistry. SciMed Central**, v .2, n. 2, p. 1-5, 2014.

GIBNEY, E.; VAN NOORDEN, R.; LEDFORD, H.; CASTELVECCHI, D.; WARREN, M. Nobel for test-tube evolution, **Nature**, v. 562, p. 176, 2018.

GOLEC, P.; DABROWSKI, K.; HEJNOWICZ, M.S.; GOZDEK, A.; LÓS, J.M.; WEGRZYN, G.; LOBOCKA, M.B.; LÓS, M. A reliable method for storage of tailed phages. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 3, p. 486–489, mar. 2011.

GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; GENE PACE, D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 129–136, 2014.

GREGORACCI, GB. **Levantamento de bacteriófagos líticos: Isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana**. 2006. 87f. Dissertação de Mestrado - Programa de pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUSTAVO. B. L. **Análise de portadores assintomáticos de staphylococcus aureus no hospital universitário de Brasília**. 2008. 102f. Monografia (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília.

HALFORD, S.E.; JOHNSON, N.P.; GRINSTED, J. The reactions of the EcoRI and other endonucleases. **Biochemistry Journal**, v. 179, p. 353-365, 1979.

HARADA, L.K.; SILVA, E.C.; CAMPOS, W.F.; FIOL, F.S.; VILA, M.; DABROWSKA, K.; KRYLOV, V.N.; BALCÃO, V.M. Biotechnological applications of bacteriophage. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018.

HERPFER, C.E .; TURCHI, S.L. An introduction to restriction mapping of DNA. **Biochemical education**, v. 17, n. 1, p. 48-50, 1989.

HERSHEY, A.D.; CHASE, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, **Journal of General Physiology**, v. 36, p. 31-56, 1952.

HEYMANN, D. L.; DAR, O. A. Prevention is better than cure for emerging infectious diseases. **BMJ**, v. 348, n. feb21 1, p. g1499–g1499, 2014.

HOGEA, C.; VAN EFFELTERRE, T.; ACOSTA, C. J. A basic dynamic transmission model of *Staphylococcus aureus* in the US population. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 3, p. 468–478, 2014.

HOUSBY, J. N.; MANN, N. H. Phage therapy. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 11–12, p. 536–540, 2009.

HSIEH, S.E.; LO, H.H.; CHEN, S.T.; LEE, M.C.; TSENG, Y.H. Wide Host Range and Strong Lytic Activity of *Staphylococcus aureus* Lytic Phage Stau2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 756–761, 1 fev. 2011.

HUA, J.; HUET, A.; LOPEZ, C.A.; TOROPOVA, K.; POPE, W.H.; DUDA, R.L.; HENDRIX, R.W.; CONWAY, J.F. Capsids and Genomes of Jumbo-Sized Bacteriophages Reveal the Evolutionary Reach of the HK97 Fold. **mBio**, v. 8, n. 5, p. 1–15, 8 nov. 2017.

JACQUEMOT, L.; BETTAREL, Y.; MONJOL, J.; CORRE, E.; HALARY, S.; DESNUES, C.; BOUVIER, T.; FERRIER-PAGÈS, C.; BAUDOUS, A.C. Therapeutic Potential of a New

Jumbo Phage That Infects *Vibrio coralliilyticus*, a Widespread Coral Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–16, 24 out. 2018.

JOŃCZYK, E.; KŁAK, M.; MIEDZYBRODZKI, R. GORSKI, A. The influence of external factors on bacteriophage – review. **Folia Microbiology**, v.56, p. 191-200, 2011.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTELMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008.

JUN, S.Y.; JANG, I.J.; YOON, S.; YU, K.S.; CHO, J.Y.; SEONG, M.W.; JUNG, G.M.; YOON, S.J.; KANG, S.H. Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage Endolysin-Based Candidate Drug SAL200 after a Single Intravenous Administration among Healthy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–11, 2017.

JURCZAK-KUREK, A.; GASIOR, T.; NEJMAN-FALĘNCZYK, B.; BLOCH, S.; DYDECKA, A.; TOPKA, G.; NECEL, A.; JAKUBOWSKA-DEREDAS, M.; NARAJCZYK, M. RICHERT, M.; MIESZKOWSKA, A.; W'ROBEL, B.; WEGRZYN, G.; WEGRZY, A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2016.

KARUMIDZE, N.; KUSRADZE, I.; RIGVAVA, S. GODERZISHVILLI, M.; RAJAKUMAR, K.; ALAVIDZEM, Z. Isolation and Characterisation of Lytic Bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. **Current Microbiology**, v.66, n. 3, p. 251–258, 2013.

KEEN, E. C. Century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. **Bioessays**, v. 37, n. 1, p. 6–9, 2016.

KHAIRNAR, K. Ganges: special at its origin. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 23, n. 1, p. 16, 2016.

KEESING, F.; BELDEN, L.K.; DASZAK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, D.; HOLT, R.D.; HUDSON, P.; JOLLES, A.; MITCHELL, C.E.; MYERS, S.S.; BOGICH, T.; OSSTFELD, R.S. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647–652, 2010.

KHAL, A.E. **Isolamento e caracterização genômica de bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso terapêutico em infecções causadas por enterobactérias**. 2016. 96f. Disseratção de mestrado - fundação oswaldo ruz, Belo Horizonte.

KHAWALDEH, A.; MORALES, S.; DILLON, B.; ALAVIDZE, Z.; GINN, A.A.; THOMAS, L.; CHAPMAN, S.J.; DUBLANCHET, A.; SMITHYMAN, A.; IREDELL, J.R. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 1697–1700, 2011.

KINGWELL, K. Bacteriophage Therapy re-enter clinical trials. **Nature Reviews Drug Discovery**.v.14, 2015.

KLIEVE, A.V.; SWAIN, R.A. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pelsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2299-2303, 1993.

KONG, M.; RYU, S. Bacteriophage PBC1 and its endolysin as an antimicrobial agent against *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2274–2283, 2015.

KUMAR, S., VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education, **Formatex**, p. 522-534 2013.

KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 3, p. 221–227, 6 maio 2010.

LEÓN, M.; BASTÍAS, R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 06, n. April, p. 1–7, 23 abr. 2015.

LEVY, S. B.; BONNIE, M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses, **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

LINCOMYCIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em:<<https://www.drugbank.ca/structures/DB01190/image.svg>>.

LINEZOLID, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em:<<https://www.drugbank.ca/structures/DB00601/image.svg>>.

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111–114, 2011.

MACROLIDES, 2019.. Acesso em 22 maio 2019. Disponível em:<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00199>>.

MANILOFF, J.; ACKERMANN.H.W. Taxonomy of bacterial viruses: Establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. **Archives of virology**, v.143, p. 2051–2063, 1998.

MÄNTYNEN, S. et al. Half a Century of Research on Membrane-Containing Bacteriophages: Bringing New Concepts to Modern Virology. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 76, 18 jan. 2019.

MATTILA, S.; RUOTSALAINEN, P.; JALASVUORI, M. On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–7, 13 nov. 2015.

MEREDITH, H.R.; SRIMANI, J.K.; LEE, A.J.; LOPATKIN, A.J.; YOU, L. Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 182–188, 2015.

MIRZAEI, M.K; NILSSON, A.S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analysis for determination of host range and efficacy. **Plos one**. v.10, n.3, p.1-13, 2015.

MOYE, Z.D.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage applications for food production and processing. **Viruses**, 1v. 10, n. 205, p. 1-22, 2018.

NASR-ELDIN, M. A. et al. Characterization and development of a phage cocktail for *Escherichia coli* causing gastrointestinal diseases. **Journal of Basic and Environmental Sciences** . v. 5, p. 115–122, 2018.

NELSON, D. Phage taxonomy: We agree to disagree. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7029–7031, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5º Edição, Artmed, 2011.

NOVIK, G.; LADUTSKA, A.; RAKHUBA, D. **Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs**, Editora Méndez-Vilas, ISBN: 978-84-947512-0-2, p.251-259, 2017.

O'CONNOR, S.M.; TAYLOR, C.E.; HUGES, J.M. Emerging Infectious Diseases Determinants of Chronic Diseases. **Emerging Infectious Diseases**. V.12, n.7, p. 1051-1057, 2006.

OLIVEIRA, H.; THIAGARAHAN, V.; WALMAGH, M.; SILLANKORVA, S.; LAVIGNE, R.; NEVES-PETERSEN, M.T.; KLUSKENS, L.D.; AZEREDO, J. A thermostable salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

OLIVEIRA, T.F.; LIMA-DELLAMORA, E. C. Interações potencialmente perigosas : proposta de uma lista de referência. **Revista brasileira de farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 4, n. 3, p. 17–23, 2013.

OLIVEIRA, B.R.; LESS, D.F.S.; FILHO, O.B.Q.O.; LIMA, C.S. **Diagnóstico ambiental e qualidade da água do canal das pedrinhas, Macapá- Amapá**, 10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. 2016. Porto Alegra, RS: PUCRS, 2016, p.1-10.

ORNDORFF, P.E. Use of bacteriophage to target bacterial surface structures required to virulence: a systematic search for antibiotics alternatives. **Current Genetics**, v. 62, n. 4, p. 753-757, 2016.

ORÚS, P.; GOMES-PEREZ, L.; LERANZOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. **International Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 51–59, 2015.

PARK, S.; JUN, S.Y.; KIM, C.H.; JUNG, G.M.; SON, J.S.; JEONG, S.T.; YOON, S.J.; LEE, S.Y.; KANG, S.H. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

PATRA, P.; KLUMPP, S. Population Dynamics of Bacterial Persistence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

PELFRENE, E.; WILLEBRAND, E.; SANCHES, A.C.; SEBRIS, Z.; CAVALERI, M. Bacteriophage therapy: A regulatory perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2071–2074, 2016.

PENICILIAN, 2019 Acesso em 22 maio 2019. Disponível em:
<<https://www.drugbank.ca/structures/DB01053/image.svg>>.

PROENÇA, D.; LEANDRO, C.; GARCIA, M; PIMENTEL, M.; SÃO -JOSÉ, C. EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5137–5149, 2015.

QADIR, M.I.; TAHIRA, M.; MASOOD, A. Phage therapy: Progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.54, n.1, p. 1-9, 2018.

QUINUPRISTIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em:
<<https://www.drugbank.ca/structures/DB01369/image.svg>>.

RHOADS, D. D; WOLCOTT, R.D; KUSKOWSKI, M.A.; WOLCOTT, B.M.; WARD, L.S.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. **Journal of wound care**, v. 18, n. 6, p. 237–8, 240–3, 2009.

RIFAMYCIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em:
<<https://www.drugbank.ca/structures/DB11753/image.svg>>.

ROHWER, F.; EDWARDS, R. The phage proteomic tree: A genome-based taxonomy for phage. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.16, p.4529-4535, 2002.

ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. September, p. 1–6, 8 set. 2016.

SAAD, A.M.; SOLIMAN, A.M.; KAWASAKI, T.; FUJIE, M.; NARIYA, H.; SHIMAMOTO, T.; YAMADA, T. Systemic method to isolate large bacteriophages for use in biocontrol of a wide-range of pathogenic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 1, p. 73–78, 2019.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777–786, 2015.

SANTOS, R.S.; SILVA, C.R. (orgs). 2004. **Diagnóstico socioambiental participativo do setor costeiro estuarino do Estado do Amapá**, Macapá, CPAq, IEPA.

SANTOS, V.F. Dinâmica de inundação em áreas úmidas dosteiras: zona urbana de Macapá e Santana, costa amazônica, Amapá. **Revista eletrônica de humanidades do curso de ciências sociais da UNIFAP**, v.9, n.3, p. 121-144, 2016.

SARKER, S. A. SULTANA, S.; REUTELER, G.; MOINE, D.; DESCOMBES, P.; CHARTON, F.; BOURDIN, G.; MCCALLIN, S.; NGOM-BRU, C.; NEVILLE, T.; AKTER, M.; HUQ, S.; QADRI, F.; TALUKDAR, K.; KASSAM, M.; DELLEY, M.; LOISEAU, C.; DENG, Y.; EL AIDY, S.; BERGER, B.; BRÜSSOW, H. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. **EBioMedicine**, v. 4, p. 124–137, 2016.

SCHMELCHER, M.; DONOVAN, D. M.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. **Future Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1147–1171, 2012.

SIETTOS, C. I.; RUSSO, L. Mathematical modeling of infectious disease dynamics. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 295–306, 2013.

SELVARAJ, C.; SINGH, P.; SINGH, S.K.; Investigations of the interaction of λ-phage derived peptides against the SrtA mechanism if *Bacillus anthracis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, p. 1790-1806, 2014.

SERVICE, R.F. Protein evolution earns chemistry Nobel, **Science**, v. 362, n. 6411, p. 142, 2018.

SHARP, R. Bacteriophages: biology and history. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 7, p. 667–672, jul. 2001.

SHENDE, R.K.; HIROURKAR, S.D.; SANNAT, C.; RAWAT, N.; PANDEY, V. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 973–978, ago. 2017.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de Antibióticos em Leite. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p. 30-44, 2012.

SILVA, R.G.; PINHATI, F.R.; SILVA, J.T. Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial. **Revista de biologia**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2015.

SILVA, S.C.O. **Orlas fluviais das cidades de Macapá e Santana: Análise da dinâmica Urbana**. 2017. 143 f. dissertação (mestrado) - Programa de pós graduação em desenvolvimento regional, UNIFAP, Macapá, 2017.

SILVEIRA, .G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias Utilizadas no Combate à Resistência Bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

ŠIMOLIŪNAS, E. et al. Klebsiella Phage vB_KleM-RaK2 — A Giant Singleton Virus of the Family Myoviridae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60717, 9 abr. 2013.

SIMMONDS, P.; AIEWASAKUN, P. Virus classification – where do you draw the line. **Archives of Virology**, v.163, p. 2037-2046, 2018.

SIQUEIRA, C. M. M. Resistência aos Antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Resista de la Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos**, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

SOUZA, C; BOTELHO, C.; OLIVEIRA, R. Nanotechnology Applied to Medical Biofilms Control. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, **Formatex**, p. 878-888, 2011.

SPICKNALL, I.H.; FOXMAN, B.; MARRS, C.F.; EISENBERG, J.N. A modeling framework for the evolution and spread of antibiotic resistance: Literature review and model categorization. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 4, p. 508–520, 2013.

STREPTOMYCIN, 2019. Acesso em 22 maio 2019. Disponível em <<https://www.drugbank.ca/structures/DB01082/image.svg>>.

SULAKVELIDZE, A. The challenges of bacteriophage therapy. **Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 31, p. 14–18, 2011.

SCHLESINGER, M. The Feulgen reaction of the bacteriophage substance. **Nature**, v.138, n. 3490, p. 508-509, 1936.

SULFAMETHOXAZOLE, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/structures/DB01015/image.svg>>.

SULTAN, I.; RAHMAN, S.; JAN, A.T.; SIDDIQUI, M.T.; MONDAL, A.H.; HAQ, Q.M.R. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, 2018.

SVÁB, D.; FALGENHAUER, L.; ROHDE, M.; CHAKRABORTY, T.; TÓLTH, I. Identification and characterization of new broad host-range rV5-like coliphages C203 and P206 directed against enterobacteria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 64, n. July, p. 254–261, out. 2018.

SYNNOTT, A.J.; KUANG, Y.; KURIMOTO, M.; YAMAMICHI, K.; IWANO, H.; TANJI, Y. Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4483-4490, 2009.

TAKIYAMA, L.R.; SILVA, U.R.L.; JIMENEZ, E.A.; PEREIRA, R.A.; SOBRINHO, A.F.; CALDAS, D.; ZACARDI, D.M.; FERNANDES, E.F.; AUGUSTIN, F.B.F.; SOUTO, F.A.F.; COSTA, H.K.S.; SILVA, L.M.A.; SILVA, M.S.; SANTOS, M.A.; NETO, S.V.C.; SANTOS, V.F. **Zoneamento ecológico econômico urbano das áreas de ressaca de Macapáe Santana, Estado do AMAPÁ**, Relatório Técnico, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. 2018.

TAN, G. H.; NORDIN, M. S.; NAPSIAH, A. B. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage water. **J. Trop. Agric.**, v. 36, n. 2, p. 000–000, 2008.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

TETRACYCLIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/structures/DB00759/image.svg>>.

TWORT, F. W. Further investigations on the nature of ultra-microscopic viruses and their cultivation. **Journal of Hygiene**, v. 36, n. 2, p. 204–235, 1936.

VANCOMYCIN, 2019. Acesso 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/structures/DB00512/image.svg>>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. **P & T journal**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

WANG, R.; XING, S.; ZHAO, F.; LI, P.; MI, Z.; SHI, T.; LIU, H.; TONG, Y. Characterization and genome analysis of novel phage vB_EfaP_IME195 infecting *Enterococcus faecalis*. **Virus Genes**, v. 54, n. 6, p. 804–811, 1 dez. 2018.

WITTEK, R.; MENNA, A.; SCHÜMPERLI, D.; STOFFEL, S.; MÜLLER, H.K.; WYLER R. HindIII and Sst I restriction sites mapped on rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA. **Journal of Virology**, v. 23, n. 3, p. 669-678.1977.

WRIGHT, A. HAWKINS, C.H.; ANGGARD, E.E.; HARPER, D.R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; A preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, v. 34, n. 4, p. 349–357, 2009.

YUAN, Y.; GAO, M. Jumbo Bacteriophages: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. March, p. 1–9, 14 mar. 2017.

Apêndice 1 - Modelo SIR (Apêndice matemático)

A partir de uma perspectiva ecológica, a dinâmica das doenças infecciosas é dependente dos seguintes fatores: tamanho e distribuição espacial da população de hospedeiros suscetíveis, a movimentação de indivíduos infectados/suscetíveis, assim como a movimentação de vetores, e o estado de saúde populacional (DOBSON; CARPER, 1996).

Podendo a extração do comportamento epidemiológico das doenças infecciosas em uma determinada população ser analisado por meio de modelos matemáticos, como por exemplo o modelo SIR (indivíduos Suscetíveis, Infectados e Recuperados), que é um modelo matemático que implica uma mistura homogênea de contato e conservação total da população de forma análoga a lei de conservação das massas, assumindo transitoriedade entre as categorias S, I e R, sendo o modelo também definido como contínuo, na forma de equações diferenciais (equação 1) e/ou integro parciais, que podem ser utilizadas como ferramenta para a investigação de vários parâmetros (característica da população de hospedeiro, vetores, quarentena, e outros) sobre a dinâmica das doenças infecciosas (SIETTOS; RUSSO., 2013).

Apresentando a modelagem SIR o potencial de capturar a essência da dinâmica das doenças infecciosas, nas quais é possível se observar graficamente, que o número de indivíduos infectados aumenta exponencialmente enquanto o número de indivíduos suscetíveis decresce na mesma proporção, até que se torne insuficiente para manter infecções contínuas dentro da população, vindo o número de indivíduos suscetíveis a aumentar na mesma proporção que o número de indivíduos recuperados (KEELING;DANON.,2009).

Equação 1: Equações diferenciais do modelo SIR, onde:

$$S = \frac{dS}{dT} = -\beta SI$$

$$I = \frac{dI}{dt} = \beta SI$$

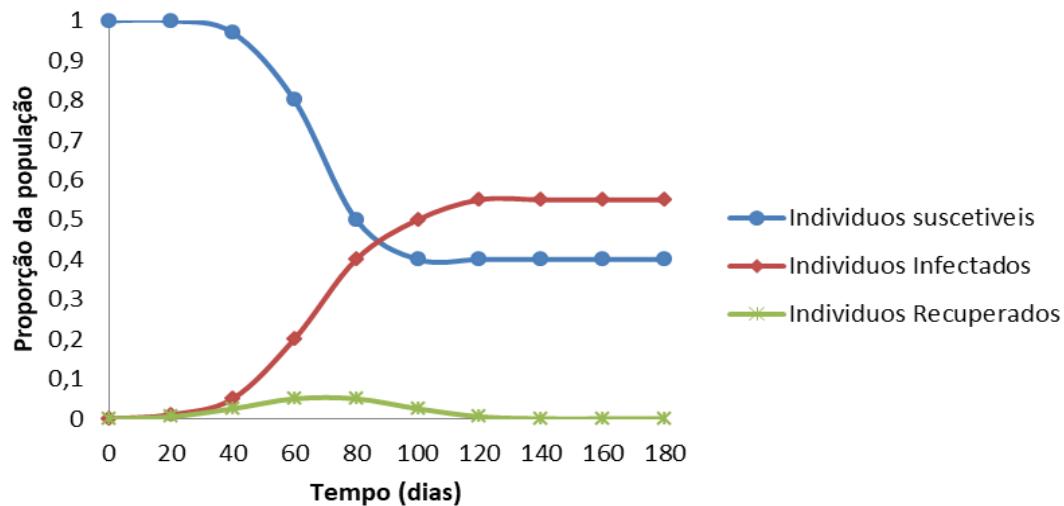
$$R = \frac{dR}{dt} = \gamma I$$

S= população suscetível

I= população infectada

R = população recuperada
 β = constante de proporcionalidade para a infecção
 γ = taxa de recuperação

Figura 1: Modelo matemático SIR de doenças infecciosas.



Fonte: O autor, adaptado de (KEELING;DANON.,2009)

Entretanto, este modelo não é uma estratégia muito realista, pois muitas vezes considera apenas as densidades populacionais de S, I e R pelo tempo, e desprezam a influência de outras variáveis (KEELING;DANON.,2009) como mutações do patógeno que aumentem sua virulência, a saturação por morte ou imunidade adaptativa dos hospedeiros (GRASSLY; FRASER, 2008), o período de latência intrínseco da infecção e tornam carente de acurácia a descrição da dinâmica de infecções em uma população suscetível (LINDAHL; GRACE, 2015; DRIESSCHE, 2017)

Outros fatores que geralmente são desconsiderados na modelagem mecanicista, mas que se contemplado seus efeitos sobre a dinâmica das doenças infecciosas, lhe conferem um grau mais elevado de realismo, são as variabilidades climáticas (PATZ et al., 1996; CONFALONIERI, 2003), perfil de contato social, idade, e a relação entre ambos (princípio da *assortatividade*: indivíduos de uma dada faixa etária tendem a se misturar com indivíduos da mesma idade) (FUMANELLI et al., 2012; VANHEMS et al., 2013), heterogeneidade social e período de exposição da população suscetível ao patógeno (MUKANDAVIRE; JUNIOR, 2015) incluindo fatores de risco da história natural de cada doença infecciosa, contemplando patogênese, fontes de infecção, reservatórios de patógenos, e padrões de transmissão e circulação (EYBPOOSH et al., 2017).

Contudo, o modelo SIR, assim como outros modelos matemáticos, são ferramentas extremamente eficazes no planejamento de ações de saúde pública em um contexto do

tipo “pior dos casos” considerando o comportamento qualitativo da dinâmica das doenças infecciosas (ZAMAN et al., 2017).

REFERÊNCIAS

CONFALONIER, U.E.C. Variabilidade climática, vulnerabilidade social e saúde no Brasil, **Terra livre**, v.1, n.9, p. 193-204, 2003.

DOBSON, A.P.; CARPER, E.R. Infectious diseases and human population history, **Bioscience**, v.46, n. 2, p, 115-127, 1996.

DRIESSCHE, P.D Reproduction number of infectious diseases models. **Infectious Disease Modelling**, v. 2, p. 288-303, 2017.

EYBPOOSH, S.; HAGHAOOST, A.A.; MOSTAFAVI, E.; BAHRAMPOUR, A.; AZADMANESH, H.K.; ZOLLALA, F.; Molecular epidemiology of infectious diseases, **Physician**, v.9, n.8, p, 5149-5158, 2017.

FUMANELLI, L.; AJELLI, M.; MANFREDI, P.; VESPIGNANI, A.; MERLER, S. Inferring the structure of social contacts from demographic data in the analysis of infectious diseases spread. **Plos computational biology**, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2012.

GRASSLY, N.C.; FRASER, C. Mathematical models of infectious diseases transmission, **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p. 477-487, 2008.

KEELING, M.J.; DANON, L. Mathematical modelling of infectious diseases. **British medical bulletin**, v. 92, p. 33-42, 2009.

LINDAHL, J.F.; GRACE, D. The consequences of human actions on risk factors for infectious diseases: a review. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 5, p. 1-11, 2015.

MUKANDAVIRE, Z.; JUNIOR, J.G.M. Modeling the epidemiology of cholera to prevent disease transmission in developing countries, **Microbial Spectr.** v.3, n.3, p. 1-10, 2015.

SIETTOS, C.I.; RUSSO, L. Mathematical modelling of infectious diseases. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 295-306, 2013.

VANHEMS, P.; BARRAT, A.; CATTUTO, C.; PINTON, J.F.; KHANAFER, N.; RÉGIS, C.; KIM, B.; COMTE, B.; VOIRIN, N. Estimating potential infection transmission routes in hospital wards using wearable proximity sensors. **Plos One**, v.8, n. 9, p. 1-12, 2013.

ZAMAN, G.; JUNG, I.H.; TORRES, D.F.M.; ZEB, A. Mathematical modelling and control of infectious diseases, **Computational and mathematical methods in medicine**, article ID 7149154, p.1, 2017.

Apêndice 2 - Caldo Müller Hinton

Peptona de caseína	17,5 g/L
Peptona de carne	2,0 g/L
Amido	1,5 g/L
Água destilada	q.s.p
pH final	7,0

Apêndice 3 - Ágar Müller Hinton

Peptona de caseína	17,5 g/L
Peptona de carne	2,0 g/L
Amido	1,5 g/L
Ágar	15 g/L
Água destilada	q.s.p
pH final	7,0

Apêndice 4 - Ágar Müller Hinton Semissólido

Peptona de caseína	17,5 g/L
Peptona de carne	2,0 g/L
Amido	1,5 g/L
Ágar	0,6 g/L
Água destilada	q.s.p
pH final	7,0

Apêndice 5 - Tampão SM

Tris 1 M (pH7)	50 mL
NaCl	5,8 g
MgSO ₄	2 g
Água destilada	500 mL
pH final	7,0
Ajustar o pH com HCl/Tris		

Apêndice 6 - Adição de NaCl e PEG 4000 para precipitação viral

PEG 4000	1g por mL de cultura
NaCl	0,0584 g por mL de cultura