



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Caroline Da Silva Grando

USO DE BACTERIÓFAGOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS:
Estudo de Caso

FLORIANÓPOLIS, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Caroline Da Silva Grando

USO DE BACTERIÓFAGOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS:
Estudo de Caso

Orientador(a) : Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Santa Catarina como parte
dos requisitos para obtenção do grau de Graduação
em Engenharia de Alimentos

FLORIANÓPOLIS, 2021

RESUMO

Os bacteriófagos são vírus capazes de infectar as bactérias causando a morte ou a lise das mesmas. Estes microrganismos são reconhecidos como os mais diversificados e abundantes existentes no mundo. Diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia destes microrganismos como agentes terapêuticos aplicados em várias áreas. Destaca-se seu uso na indústria de alimentos devido ao seu grande potencial de reduzir expressivamente, em produtos alimentícios e no ambiente de produção, populações de bactérias patogênicas de grande relevância. Esse trabalho sumariza o estado da arte sobre a definição e aplicação de bacteriófagos em diferentes áreas. Inicialmente, abordou-se conceitos como estrutura, características, biodiversidade e aplicação de bacteriófagos no controle microbiológico e detecção de bactérias patogênicas nos alimentos, na formação de biofilme, sua ação no meio ambiente e na terapia de antibióticos. Subsequentemente, a utilização da fagoterapia foi considerada e uma abordagem sobre o futuro desta terapia para diversas áreas das ciências foi realizada.

Palavras - chaves: fagos, bacteriófagos, fagoterapia.

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses capable of infecting bacteria causing their death or lysis. These microorganisms are condensed as the most diverse and abundant existing in the world. Several studies have been carried out to assess the effectiveness of these microorganisms as competent medical agents in various areas. Its use in the food industry is highlighted due to its great potential to significantly reduce, in food products and in the production environment, populations of pathogenic bacteria of great supply. This work summarizes the state of the art on the definition and application of bacteriophages in different areas. Initially, concepts such as structures, characteristics, biodiversity and application of bacteriophages in microbiological control and detection of pathogenic bacteria in food, in biofilm formation, its action in the environment and in antibiotic therapy were addressed. Subsequently, the use of phagotherapy was considered and an approach to the future of this therapy for different areas of science was carried out.

Key words: phages, bacteriophages, phage therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivos Gerais	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. METODOLOGIA	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4.1 Histórico	9
4.2 Taxonomia dos Bacteriófagos	11
4.3 Estrutura dos bacteriófagos	13
4.4 Ciclo de Multiplicação	14
4.5 Isolamento e Quantificação de Bacteriófagos	17
4.6 Fatores determinantes no ciclo de vida dos Bacteriófagos	18
4.6.1 Fator físico: Temperatura	18
4.6.2 Fator físico e químico: pH e Salinidade (osmotolerância)	19
4.6.3 Especificidade dos Bacteriófagos	21
4.7 Biodiversidade	26
4.7.1 Bacteriófagos com genoma de DNA de fita dupla	28
4.7.2 Bacteriófagos de DNA de fita simples: vírions icosaédricos	31
4.7.3 Bacteriófagos de DNA de fita simples: Vírions filamentosos	32
4.7.4 Bacteriófagos de RNA	33
5. Aplicações biotecnológicas dos bacteriófagos	33
5.1 Bacteriófagos como controle microbiológico de alimentos	34
5.2 Bacteriófagos como controle microbiológico de biofilmes	39
5.3 Bacteriófagos como controle microbiológico no meio ambiente	43
5.4 Aplicações de bacteriófagos na antibioticoterapia	47
6. Mecanismos de resistência x fagos	50
7. Vantagens, desvantagens, mercado e perspectivas futuras	53
8. Conclusão	56
9. BIBLIOGRAFIA	56

1. INTRODUÇÃO

Considerados a forma mais abundante de “vida” na Terra, os bacteriófagos ou fagos, podem ser encontrados em diversos lugares (SERGEI, 2008), onde em número superam as bactérias, podendo ser isolados do solo, da água, plantas e animais, ou seja, são ubíquos (Mann, 2005; Weber-Dabroska et al., 2000). Fagos são vírus que consistem fundamentalmente de material genético e proteínas, podendo ainda conter lipídios em sua estrutura. E, por apresentarem a capacidade de infectar bactérias, despertam grande interesse na área biotecnológica (Vispo & Puchades, 2001).

A estrutura dos bacteriófagos é determinada por proteínas estruturais cuja função principal é proteger seu material genético (Clark & March, 2006; Mathur et al., 2003). Por apresentarem a incapacidade de sintetizar enzimas necessárias à sua propagação, requerem células hospedeiras para a utilização da maquinaria celular do hospedeiro, para a manutenção e propagação da replicação viral (Campbell, 2007).

Em sua maioria, os bacteriófagos infectam espécies de bactérias do grupo entérico, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Porém os bacteriófagos também podem infectar uma variedade de procariotos, tanto bactérias quanto Archaea (Madigan et al., 2008).

Morfologicamente os bacteriófagos apresentam uma ampla variedade, dispostos de capsídeo viral contendo o ácido nucléico, que pode ser DNA ou RNA; os receptores apresentam uma estrutura em formato de cauda, sendo esses receptores responsáveis pelo reconhecimento dos sítios de ligação da bactéria hospedeira (Ferreira et al., 2008; Vispo & Puchades, 2001). Existem fagos icosaédricos, helicoidais ou filamentosos, onde a forma da disposição das proteínas em torno do material genético define essa variedade (Clark & March, 2006). O material genético é protegido pelo cápside, que é constituído de uma capa de proteínas. Alguns fagos podem conter um envoltório mais externo de natureza fosfolipídica, chamado de envelope (Vispo e Puchades, 2001).

Os fagos representam um dos principais elementos genéticos móveis, pois contribuem significativamente para a transferência horizontal de genes em bactérias e, conseqüentemente, para o aumento da biodiversidade genética bacteriana (Pal et al., 2007).

De acordo com a literatura, existem duas formas do ciclo de replicação dos fagos. A primeira é forma lítica em que a célula bacteriana hospedada é destruída após a invasão de DNA/RNA do fago, seguido de sua multiplicação massiva no citoplasma do hospedeiro e finalizando com o rompimento (lise) da membrana plasmática do hospedeiro, em outras palavras, morte celular do hospedeiro e novas partículas virais liberadas com potencial de ligação a novas células-alvo. A segunda forma é lisogênica, que tem como característica a integração do DNA/RNA do fago ao DNA (ou plasmídeo) da célula hospedeira, o qual permanece durante gerações de bactérias com a nova composição genômica (modificação genética), onde esse material replica-se de forma concomitante à duplicação do genoma da bactéria hospedeira (Ferreira et al., 2008). Em relação a conservação de alimentos, o grupo de maior interesse é o de ciclo lítico, oferecendo uma abordagem natural ao processo. Estes são altamente específicos, não tóxicos, abundantes nas águas e solos, autolimitantes, podem ser administrados em doses únicas, são de fácil manipulação e não alteram a estrutura, odor e sabor dos alimentos.

A primeira utilização de bacteriófagos foi por meio de experimentos em 1919 por Felix D'Herelle para o tratamento de disenteria no homem, conhecida como fagoterapia. Fagoterapia é o estudo dos bacteriófagos (fagos) na cura/prevenção das doenças. A técnica consiste em inocular bacteriófagos (fagos) no paciente ou em alimentos, visando a lise de bactérias causadoras de doenças. Mas, com a descoberta dos antibióticos na década de 1940, as pesquisas de fagoterapia foram interrompidas, no entanto, devido a resistência adquirida pelos patógenos aos antibióticos e ao avanço das ferramentas genéticas abriram-se caminhos para novos segmentos da microbiologia, como a Biologia molecular (Campbell, 2007), pois foram muito utilizados para induzir modificações genéticas em fagos.

De acordo com a literatura consultada, a utilização dos bacteriófagos na fagoterapia é marcado por três diferentes eventos, a era antes da descoberta dos antimicrobianos (antes da descoberta dos antibióticos), a era dos antimicrobianos

(descoberta das penicilinas e sulfonamidas) e a era pós-antimicrobianos (descobertas da resistência das bactérias aos antibióticos).

A fagoterapia pode ser muito útil na área alimentícia, relacionada ao controle de contaminantes. Esta poderá ser aplicada, por exemplo, para a limpeza dos alimentos em substituição aos produtos químicos e radiação gama para a carne, que podem alterar o sabor e qualidade do alimento e ser prejudicial à saúde do consumidor (Behrsing, 2000). Além disso, os bacteriófagos podem ser utilizados no controle ambiental como indicador de agentes patogênicos na água e no solo; e como na área humana em relação à multirresistência das bactérias patogênicas, onde a utilização de bacteriófagos pode ser um método de escolha para o tratamento destas infecções e/ou potencializar a atividade das drogas.

Outra aplicação interessante do uso de bacteriófagos é na eliminação de biofilmes microbianos na indústria de alimentos. Estes biofilmes consistem na aderência inicial do microrganismo à superfície, na produção de microcolônias e substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos-EPS) (Chmielewski & Frank, 2003). A eliminação de biofilme se torna um grande desafio para as instalações de processamento de alimentos, pois há evidências que indicam o aumento da resistência dos microrganismos aderidos à biofilmes aos produtos antimicrobianos. Com o surgimento de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais, veio a necessidade de novos estudos que explorem novas estratégias para o controle de biofilme, por exemplo, inibidores de *quorum sensing*, utilização de ultrassom, e o uso de bacteriófagos (Donlan, 2009), que é tema desta revisão da literatura.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo abordar o estado da arte sobre o uso de bacteriófagos na indústria de alimentos, bem como detalhar sua estrutura, forma de ação, biodiversidade, possíveis aplicações da fagoterapia, mercado e perspectivas futuras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica da literatura sobre os bacteriófagos, abordando assuntos como: estrutura da partícula, biodiversidade, possíveis aplicações da fagoterapia, mercado e perspectivas futuras.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica das principais informações existentes na literatura que abordem definição, estrutura, tipos e características dos bacteriófagos;
- Apresentar possíveis aplicações da fagoterapia por meio da consulta de patentes e artigos científicos;
- Apresentar os resultados obtidos nos artigos científicos, assim como as vantagens, desvantagens e limitações da utilização de bacteriófagos.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho se baseou na realização de uma pesquisa da literatura, por meio do levantamento e seleção de informações relacionadas à definição, estrutura e aplicação dos bacteriófagos. Foram selecionados e analisados artigos científicos e patentes para responder aos objetivos do tema proposto.

O acesso a bibliografia foi realizado de forma eletrônica, utilizando bases de dados acadêmicos como SciELO, Google Acadêmico, ScienceDirect, EspaceNet e repositório de universidades.

As palavras-chaves utilizadas para esta revisão foram: Bacteriófagos; Bacteriófagos como uma alternativa aos antibióticos; Bacteriófagos na indústria de alimentos; Aplicações biotecnológicas utilizando bacteriófagos; Estrutura dos bacteriófagos; Ciclo de multiplicação dos bacteriófagos, entre outras.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Histórico

Em 1896, a existência primordial dos bacteriófagos teve como referência os relatos do bacteriologista britânico Ernest Hankin, que observou uma elevada atividade antimicrobiana das águas dos rios Jumma e Gangue, da Índia, que poderiam inativar o agente do cólera, *Vibrio cholerae*. Porém, essas descobertas não foram exploradas e não se conhecia ao certo o que seria responsável pela ação. Dois anos após, o bacteriologista russo Gamaleya ao trabalhar com *Bacillus subtilis*, observou um fenômeno similar. Somente após duas décadas, em 1915, o bacteriologista da Inglaterra e superintendente do Instituto Brown de Londres, Frederick W. Twort, caracterizou o fenômeno relacionando-o com ação dos bacteriófagos sobre as bactérias (Sulakvelidze et al, 2001).

Twort, ao inocular o vírus da varicela em uma placa de ágar nutritivo, notou que após algum tempo algumas colônias bacterianas tinham sofrido uma mudança visível e apresentavam um aspecto aquoso e mais transparente. Ele observou que a solução transparente das bactérias lisadas promovia a lise das células saudáveis, e que mesmo essa solução sendo diluída mil vezes promovia o mesmo fenômeno de lise bacteriana. O agente podia ser guardado durante seis meses, mas quando aquecido perdia a capacidade de lise. Com essas descobertas, em 1915, Twort publicou um artigo sugerindo a existência de um vírus com capacidade antibacteriana, sendo esta a primeira referência aos bacteriófagos em literatura (Levine, 1992). Dois anos após, Félix D'Herelle, um microbiologista do Instituto Pasteur de Paris, confirmou a existência dos fagos. Apesar das observações de Hankin e Twort terem sido fundamentais, D'Herelle foi considerado o descobridor dos bacteriófagos. Em 1919, D'Herelle realizou experimentos no hospital Enfants Malades em Paris, onde tentou utilizar fagos para tratar a disenteria. Os pacientes tratados com a fagoterapia (técnica que consiste em inocular bacteriófagos (fagos) no paciente ou em alimentos, visando a lise de bactérias causadoras de doenças)

apresentaram uma melhora significativa a partir da primeira dose. D' Herelle e seus companheiros continuaram utilizando a fagoterapia para tratar várias doenças como a cólera e a peste bubônica na Índia (Campbell, 2007).

Nas décadas de 1920 e 1930, D'Herelle dedicou seu tempo para estudos da possível utilização dos bacteriófagos na área médica, mas não rendeu muitos frutos. D'Herelle chegou a comercializar preparados de fagos para o tratamento de doenças infecciosas, mas com o descobrimento e introdução dos antibióticos e antimicrobianos químicos, a fagoterapia foi deixada de lado (Deresinski, 2009). No ano de 1942 se obteve a primeira imagem microscópica de um fago por Tom Anderson. E em 1946 no laboratório de Cold Spring Harbo nos EUA, realizou-se o primeiro curso para estudo dos bacteriófagos.

Um experimento de grande relevância nesta área foi o de Hershey e Chase em 1952, que utilizaram proteínas virais marcadas e ácidos nucleicos para estudar o processo de infecção do fago e suas alterações na célula com a incorporação do DNA/RNA do fago com o DNA da célula hospedeira. Estes cientistas observaram que o DNA da bactéria tinha todas as informações necessárias para produzir novos vírus. Um segundo experimento de grande relevância foi realizado em 1953, em que se identificou uma nova base de hidroximetilcitosina no DNA do fago T, que substituiu o lugar da citosina no DNA bacteriano. Esta descoberta abriu caminhos para novos estudos sobre a introdução de informações genéticas para a produção de novas enzimas na célula bacteriana por meio de fagos (Campbell, 2007).

Na década de 80, Smith e Huggins (1987) realizaram o controle da diarreia por *Escherichia coli* em bezerros com a fagoterapia e obtiveram resultados mais eficazes que o tratamento com antibióticos. O Instituto de Imunologia e Terapia Experimental da cidade de Wroclaw, na Polônia, começou a tratar seres humanos com a fagoterapia na mesma época (Hynes et al., 1995). Em 1990 e 1996, nos países ocidentais, as indústrias de biotecnologia começaram a explorar a fagoterapia, onde nessa mesma época também ocorreram estudos da farmacocinética da terapia com fagos (Garvey et al., 1996). Nos anos de 2002 e 2003 foi realizada a fagoterapia para *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina e metilicina em camundongos (Stummeyer et al., 2006).

4.2 Taxonomia dos Bacteriófagos

Os bacteriófagos apresentam uma grande diversidade, sendo que os mais conhecidos contêm genomas de dsDNA, no entanto, muitos outros incluem genomas de ssRNA, dsRNA e ssDNA (Madigan *et al.*, 2012; Orlova *et al.*, 2012).

A Figura 1 apresenta algumas combinações possíveis dos bacteriófagos, sendo estes constituídos de material genético RNA ou de DNA, fitas simples ou dupla, linear ou circular, segmentado ou único (Ackermann, 2003; Gregoracci *et al.*, 2006). Os bacteriófagos são classificados em famílias, em relação a sua morfologia e tamanho. Cerca de 96% dos bacteriófagos conhecidos apresentam uma estrutura caudal, onde foram classificados na ordem Caudovirales apresentando dsDNA, existindo também os filamentosos e os pleomórficos (Ackermann 2007; Hendrix 2002).

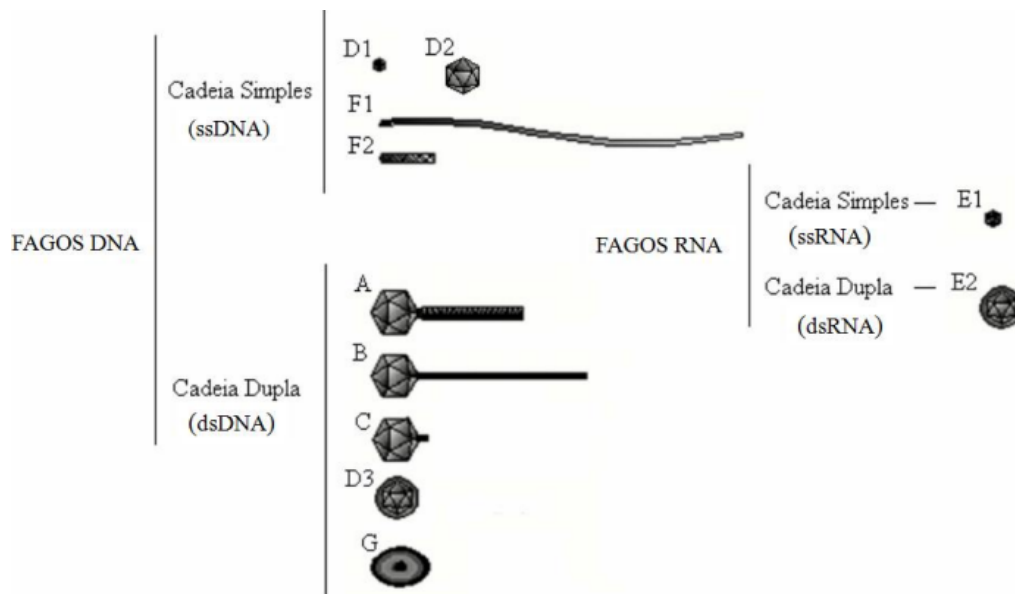


Figura 1: Classificação dos bacteriófagos conforme ácidos nucleicos e características morfológicas. Legenda: ss- fita simples;ds- fita dupla; A -fagos com cauda contrátil; B - fago com cauda não contrátil; C - fago de cauda curta; D1 e D2- fagos icosaédricos; D3- fagos espiral; E1- fagos icosaédricos; E2- fagos espiral; F1e F2 fagos filamentosos; G- fagos pleomórficos. Fonte: Ackermann e Gershman. (1992)

Na ordem dos Caudovirales são separados em três famílias filogeneticamente próximas: Myoviridae com caudas contrácteis, Siphoviridae com

caudas longas não contrácteis e Podoviridae com caudas curtas (Orlova, 2012), como mostra a representação esquemática que se encontra na Figura 2.

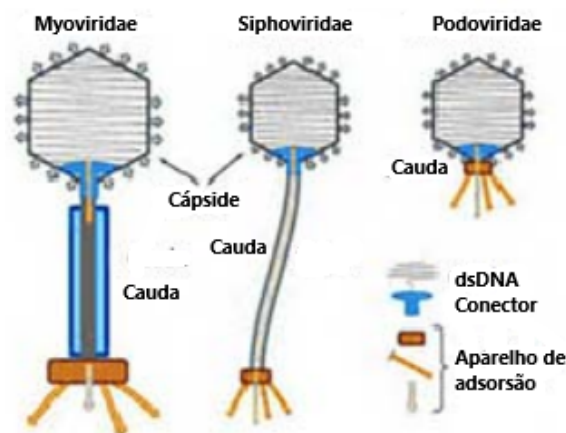
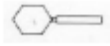


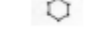








Figura 2: Famílias de fagos com cauda. Adaptado de Orlova, 2012

O único órgão internacional responsável pela taxonomia dos vírus é o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), em que são classificados em 7 ordens e 26 famílias, existindo adicionalmente 77 famílias sem ordem definida (SOUSA, 2012). Em média, para os bacteriófagos, são cerca de 70 características que o ICTV utiliza para os critérios de classificação. No entanto, as propriedades mais importantes são a morfologia, incluindo a presença ou ausência de envelope, a natureza e estrutura do ácido nucléico e as suas propriedades físico-químicas (Ackermann, 2011). No Quadro 1 estão presentes algumas famílias de bacteriófagos.

Essas e outras propriedades são consideradas e regularmente atualizadas pelo ICTV, tais como: propriedades químicas e físicas da partícula - massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade (por exemplo, o pH, temperatura, solventes, detergentes, entre outras), tamanho do genoma (kb/kbp), ácido nucleico (simples ou cadeia dupla), genoma linear ou circular, número e tamanho de segmentos, entre outras. Quanto às proteínas, considera-se o número-quantidade, tamanho, atividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais; já para aos lipídios considera-se o conteúdo, características, entre outras; e relacionado às propriedades biológicas considera-se hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade, entre outras. Referente à morfologia dos bacteriófagos considera-se tamanho, forma, presença

ou ausência de envelope, simetria do capsídeo, estrutura (Ackermann e Gershman, 1992).

	Forma	Família	Características	Exemplos
Com cauda		Myoviridae	dsDNA, L, cauda contrátil	T4
		Siphoviridae	dsDNA, L, cauda longa, não contrátil	λ
		Podoviridae	dsDNA, L, cauda curta	T7
Poliedricos		Microviridae	ssDNA, C, 27 nm, 12 capsómeros	ϕ X174
		Corticoviridae	dsDNA, C, capsula complexa, lipidos, 63 nm	PM2
		Tectiviridae	dsDNA, L, vesículas lipídicas no interior, pseudocauda, 60 nm	PRD1
		Leviviridae	ssRNA, L, como os poliovirus, 23 nm,	MS2
		Cystoviridae	dsRNA, L, segmentado, envelope lipídico, 70–80 nm	Φ 6
Filamentosos		Inoviridae	ssDNA, C, filamentos, 85–1950 de comprimento	fd
Polimórficos		Plasmaviridae	dsDNA, C, envelope lipídico, ausência de capsídeo, 80 nm	MVL2

Quadro 1: Caracterização de algumas famílias de fagos. Adaptado de Ackermann, 2011; Tobočka, 2012

4.3 Estrutura dos bacteriófagos

Existem bacteriófagos com material genético de RNA de fita simples, de fita dupla segmentado e DNA de fita simples que não apresentam envelopes lipídicos, sendo que a maioria dos fagos contém material genético de DNA dupla fita. Os bacteriófagos com DNA dupla fita apresentam cabeça, cauda, colarinho, fibras da cauda, placa basal e espículas da cauda (projeções de carboidrato-proteína na superfície do envelope; função de ancoragem na célula hospedeira), conforme

apresentado na Figura 3. Aqueles que contêm DNA de dupla fita, geralmente apresentam uma cauda como os fagos T2, T4 e MU. As caudas são essenciais no processo de penetração do material genético, existindo caudas contráteis e caudas flexíveis como o fago lambda (Madigan et al., 2008, Demuth et al., 1998).

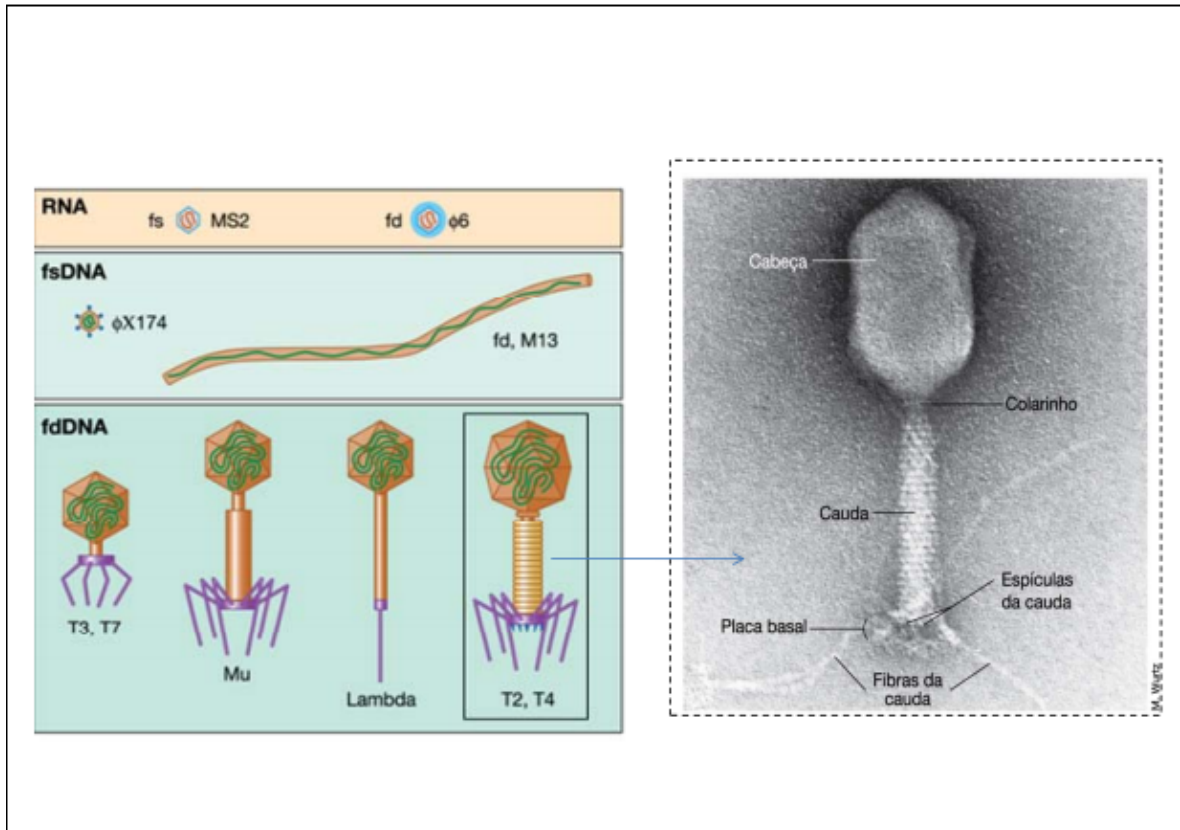


Figura 3: Estrutura de bacteriófagos e microscopia eletrônica do fago T4. Fonte: Madigan et al., 2010

Esses vírus se multiplicam, principalmente, em Archaea e bactérias, sendo de natureza geral similar aos demais vírus (Ackermann, 2003; Gregoracci et al., 2006). O bacteriófago Lambda, por exemplo, infecta *E. coli*, o qual possui uma cabeça icosaédrica e cauda contrátil separada por um colar e fibras que se fixam ao receptor da membrana bacteriana, usualmente ao lipopolissacaríde (LPS) ou pili. Essa fibra é responsável por injetar seu material genético no interior da célula bacteriana (Levine, 1992), conforme será explicado nas próximas seções.

4.4 Ciclo de Multiplicação

Os bacteriófagos, assim como os demais vírus, necessitam de um hospedeiro específico para a sua replicação. Por não terem seu próprio metabolismo, requerem do metabolismo, dos recursos energéticos e dos recursos materiais dos seus hospedeiros para se replicarem. Diversas etapas do ciclo de replicação dos fagos são comuns a todos os vírus (Welkos et al., 1974; Duckworth, 1987). Por meio da sua cauda ocorre o reconhecimento dos pontos específicos de receptores das bactérias hospedeiras. Para que esse contato ocorra é necessário que a superfície dos hospedeiros se apresente com carboidratos, proteínas e moléculas de lipopolissacarídeo e flagelos. A maioria dos bacteriófagos é bastante específica em relação aos receptores, sendo este fator utilizado como base para os métodos de fagotipagem que são amplamente utilizados para a identificação de espécies ou subespécies bacterianas.

Há a existência de 2 ciclos de replicação dos bacteriófagos, o lítico e o lisogênico (ou temperado), como ilustra a Figura 4.

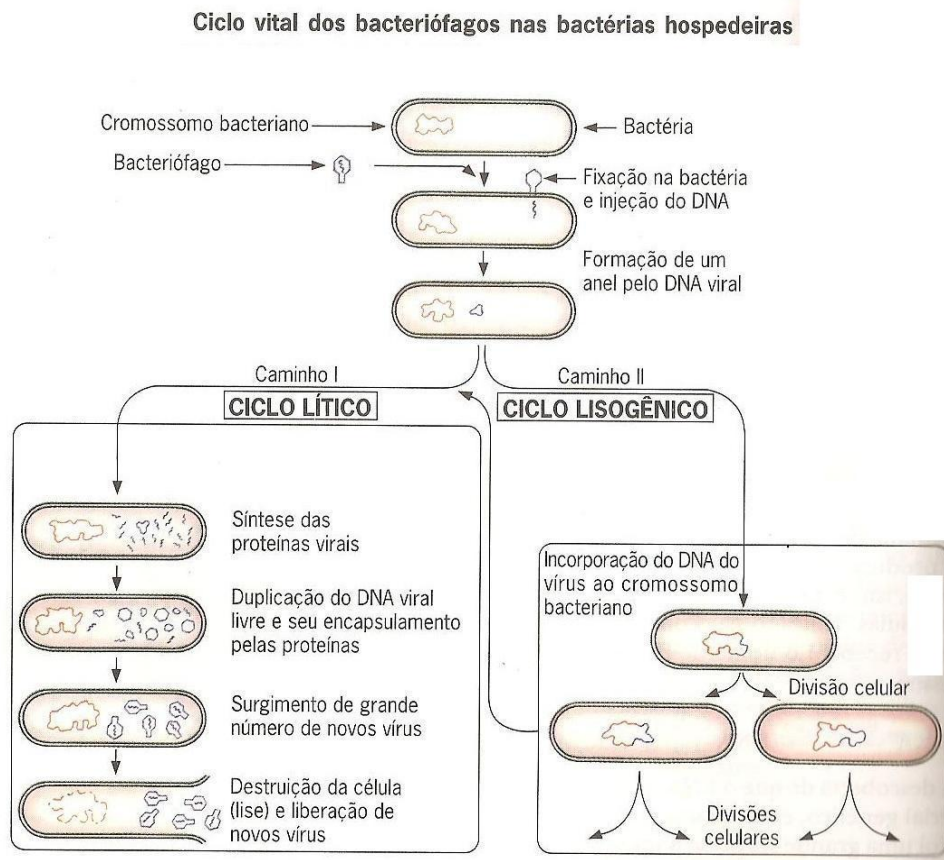


Figura 4: Esquema de ciclo biológico de replicação de bacteriófagos.

Fonte: disponível em <http://juliasarabioifes.wordpress.com/2011/02/15/13/> acessado em 23/03/2021

Basicamente, a replicação dos fagos é constituída em 5 etapas, sendo estas a adsorção; separação do ácido nucleico do envoltório proteico; expressão e replicação do ácido nucleico; formação de novas partículas fágicas e a liberação de novos fagos (Comeau & Krisch, 2005; Gregoracci et al., 2006).

A adsorção é constituída por três fases, o contato inicial, ligação reversível e ligação irreversível. Essa etapa é compreendida como a etapa inicial da replicação dos fagos e que não se difere dos demais vírus (Lindberg, 1973; Weimbauer, 2004; Comeau & Krisch, 2005; Gregoracci et al., 2006). O contato inicial transcorre dos efeitos de difusão e movimentos brownianos. Em seguida, ocorre a ligação reversível, sendo uma ligação atrativa através da associação de qualquer estrutura fágica à superfície celular, que vem a se estabilizar a partir da segunda interação irreversível onde as enzimas hidrolíticas começam a atuar com propósito de facilitar a entrada de material genético através da parede do hospedeiro. Após a ligação irreversível do fago a superfície da bactéria, ocorre a separação do ácido nucleico da proteína. A liberação do material genômico do fago para o interior da bactéria acontecerá nesta etapa.

Após a adsorção ocorrerá uma resposta entre a interação fago-bactéria e esta poderá ser uma resposta lítica, ou seja, o fago redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos que são liberados por meio da lise da célula; ou lisogênica, que consiste em um estado de latência, em que o material genético do fago é replicado com a maquinaria do hospedeiro sem causar a lise das células (Kornberg, 1980).

Conforme explicado, um fago virulento realizará um ciclo lítico, direcionando o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos, causando a lise ou morte do hospedeiro após a infecção. Caso ao contrário ocorre um ciclo lisogênico, em que o fago se comporta como um gene bacteriano em um cromossomo de uma bactéria, sugerindo que o material genético viral foi mantido em repouso em bactérias por regulação negativa (Liemann et al, 2002). Os bacteriófagos líticos são denominados de T1, T2, T3 e assim sucessivamente até T7. Ao final de um ciclo lítico há a liberação de mais de cem novas partículas virais, onde este ciclo dura em média 25 min. A enzima lítica, denominada lisozima T4, é responsável pela lise da

célula ao degradar o peptidoglicano da bactéria hospedeira (Madigan et al., 2008) e estes tipos de bacteriófagos são interessantes do ponto de vista de controle de qualidade na indústria de alimentos.

4.5 Isolamento e Quantificação de Bacteriófagos

O isolamento dos microrganismos é uma etapa importante para a caracterização e estudo de bacteriófagos. Não somente para estes fins, mas também para posterior purificação, concentração e produção em larga escala na aplicação industrial. Desde do descobrimento dos bacteriófagos em 1915, houve um notável avanço em relação a compreensão do modo de replicação e a biologia molecular destes vírus. Eficiência, custos associados, rapidez e a facilidade de execução, são parâmetros fundamentais para a escolha de um método para o processo de isolamento de bacteriófagos (Levine, 1939).

Os fagos podem ser isolados de diversos lugares como solo, água, esgoto, dos seres humanos e os animais (pele, cavidade oral, saliva, fezes, intestino) e até mesmo o alimento de consumo humano. Sugere-se que onde há bactérias é possível encontrar pelo menos um fago para cada hospedeiro diferente e que estes têm evoluído a ponto de sobreviverem em ambientes agressivos como temperaturas extremas (Marks & Sharp, 2000; Ashelford et al., 2003; Neve et al., 1994; Merrill 1974).

A partir de efluentes de origem humana, animal e industrial pode-se fazer o isolamento dos bacteriófagos. Há vários potenciais hospedeiros dos vírus em esgoto doméstico, apresentando também enterobactérias que são potenciais hospedeiros. Supõe-se que os esgotos domésticos contenham uma grande diversidade viral, havendo assim uma necessidade de se realizar mais estudos sobre a ecologia dos vírus nesse ambiente (Whithey et al., 2005).

Há métodos diretos e indiretos para realização da quantificação dos fagos, em que os métodos diretos contam com o auxílio da microscopia eletrônica e os métodos indiretos podem ser realizados por meio da técnica de unidade formadora de placa (Whithey et al., 2005). A partir da contagem das unidades formadoras de placas (UFP) ou halos numa placa de Petri com uma camada de células

hospedeiras, é obtida a contagem indireta. O método de contagem UFP representa apenas uma fração dos fagos totais existentes e ao realizar o método de contagem direto o número de fagos é normalmente 100 a 1.000 vezes superior. A contagem direta pode ser realizada utilizando diferentes técnicas, como: microscopia eletrônica (ME), microscopia de epifluorescência (MEP) e citometria de fluxo (CF). Comparativamente com o ME, os métodos MEP e CF são menos dispendiosos e bastante rápidos. Lembrando que para esses métodos é necessário a coloração dos fagos com fluorocromos adequados como, por exemplo, DAPI, SYBR Green I, Gold SYBR, entre outros. A vantagem da contagem por UFP em relação aos métodos de coloração por microscopia é que a UFP permite distinguir entre partículas não infecciosas e infecciosas (Whitney et al., 2005; Sillankorva, 2004).

4.6 Fatores determinantes no ciclo de vida dos Bacteriófagos

Existem vários fatores que são determinantes e interferem no ciclo de vida dos fagos. São fatores físico-químicos tais como pH, temperatura e salinidade que determinam a ocorrência, viabilidade e sobrevivência de bacteriófagos. Esses fatores podem levar a perda de lipídios, e/ou DNA, mudanças estruturais assim como inativação do fago por meio da supressão dos seus elementos estruturais (cabeça, cauda e envelope) (Ackermann et al. 2004).

4.6.1 Fator físico: Temperatura

A temperatura é um fator determinante para a ocorrência, viabilidade e armazenamento de bacteriófagos. E, segundo a literatura, a temperatura desempenha um papel fundamental na fixação, penetração, multiplicação e na duração do período latente (no caso de fagos lisogênicos), em que temperaturas mais elevadas podem levar ao prolongamento do estágio de latência (Tey et al. 2009). Alguns fagos podem ser isolados de fontes de águas termais cuja temperatura pode variar de 40 a 90 °C. Breitbart et al. (2004), observaram que mais de 75 % das partículas fágicas permaneceram intactas mesmo quando incubadas

em temperaturas amenas (em torno de 0 °C) e, quando fervidos a 105 °C, os fagos apresentaram uma certa sensibilidade já que apenas 18 – 30 % das partículas fágicas permaneceram intactas.

Já segundo Atamer et al. (2008), quando suspensos em leite, cerca de 40% dos fagos que infectam o *Lactococcus lactis* sobreviveram ao aquecimento a 80 °C por 5 min. Mas a uma temperatura de 95 °C quase todos os fagos foram completamente inativados.

Um fator muito importante e que determina a atividade do fago é a temperatura de armazenamento deste. Thorne e Holt (1974) observaram fagos de *Bacillus cereus* CP-51, que foram sensíveis a baixas temperaturas e sobrevivem melhor em temperatura ambiente, mas o armazenamento a longo prazo de fagos em temperatura ambiente não é geralmente recomendado (Mullan, 2001), conforme será explicado a seguir.

Há estudos que mostram a influência do tempo de armazenamento dos fagos em diferentes temperaturas. Os autores Jepson e March (2004) perceberam que os fagos foram resistentes a repetidos procedimentos de congelamento e descongelamento em intervalos curtos, sendo que esse procedimento teve uma influência negativa sobre a estabilidade dos fagos. Para períodos longos de armazenamento estes autores sugerem manter os fagos em glicerol 10 % (v/v) e temperatura de - 80 °C para que não ocorra a sua inativação. Segundo Olson et al. (2004), para períodos curtos de armazenamento (não superior a 40 dias) em águas residuais é recomendado 4 °C como a temperatura ótima para o armazenamento de fagos. A estrutura de cristal de gelo formado a uma temperatura de -20 °C pode levar a uma destruição do fago, logo, essa temperatura não é recomendada para seu armazenamento (Warren e Hatch, 1969). Uma adição de glicerol 5 a 10% (v/v) para a suspensão do fago pode garantir a viabilidade segura e capacidade de infectar para 30 dias a -20 °C ou -70 °C (Olson et al. 2004).

4.6.2 Fator físico e químico: pH e Salinidade (osmotolerância)

Assim como a temperatura, a acidez é um fator importante que influencia a estabilidade do fago. A atividade do fago específico para bactérias do ácido láctico em vinhos foi descrita por Davis *et al.* (1985). Como resultado estes autores observaram que o pH limitante foi de 3,5 e a concentração total de SO₂ de 50 mg/L. Lu *et al.* (2003) isolaram fago de um tanque de fermentação de chucrute, concluindo que os fagos podem persistir em um ambiente ácido como o chucrute (pH < 3,5). Kerby *et al.* (1949) analisaram a estabilidade do fago T7 em diversas soluções tampão (citrato, citrato-fosfato, fosfato, borato-fosfato e borato) para um período de uma a duas semanas em diferentes pH (3 a 11) e temperatura entre 0,5 e 2 °C. A faixa de pH onde o fago apresentou maior estabilidade física foi entre 6 e 8 para um armazenamento a longo prazo. Após duas semanas o fago T7 perdeu apenas 20 % da sua capacidade infecciosa, apresentando maior estabilidade na solução tampão fosfato em pH 7. Já em outras faixas de pH apresentou-se instável. Em pH menor que 4, o fago perdeu quase toda sua capacidade infecciosa em 96 h em soluções tampão de fosfato ou citrato-fosfato, e em pH 3, o fago perdeu completamente a atividade a partir de 1 h. Já em pH alcalino (pH 9), o fago manteve pelo menos 30% de sua capacidade infecciosa após duas semanas (Kerby et al. 1949). A perda quase completa da atividade do fago T7 foi observada em pH maior que 10 na solução tampão borato após 24 h.

A estabilidade do fago T2 foi avaliada em uma ampla faixa de pH (2 a 11) para 1 h, em um dia, e uma a quatro semanas (Sharp *et al.*, 1946). Como resultado, obteve-se que o fago se manteve estável em uma faixa de pH de 5 a 9, onde mostrou a maior estabilidade em pH 5 e 6. Nestes pH o fago teve uma perda de apenas 11 % do seu título, enquanto que em pH 7 manteve apenas 1 % da Unidade formadora de Placa (UFP) inicial. Com estas observações, segundo os autores, podem indicar que a variação do pH ambiental pode proteger a atividade dos fagos a uma temperatura baixa.

O choque osmótico de íons e a salinidade também são fatores apontados como inativadores de bacteriófagos (Davis et al. 1985; Kerby et al. 194; Sharp et al., 1946). Os autores Whitman e Marshall (1971), analisaram os fagos psicrófilos de *Pseudomonas* (WY e PS1) em soluções altamente concentradas de NaCl e sacarose e estes apresentaram redução de persistência. Em uma solução de 4

mol/L de NaCl, o fago PS1 apresentou diminuição de 99 % na viabilidade, enquanto que a viabilidade do fago WY foi reduzido em apenas 26 %. Para uma solução de 2 mol/L de sacarose houve uma diminuição da viabilidade em PS1 de 50 % e em WY de 48 %.

A estabilidade do bacteriófago T5 incubado a 37 °C em soluções salinas de citrato, cálcio e tampão fosfato foi avaliada por Adams (1949). Este autor obteve como resultado a estabilidade do fago na solução de íons de cálcio, havendo uma perda da sua atividade em tampão fosfato, ao passo que foi rapidamente inativado em solução de citrato. Nesse mesmo estudo, o autor demonstrou que os metais bivalentes em concentrações milimolar podem impedir a inativação de fagos supondo que o aumento da estabilidade de T5 na presença de diferentes soluções aniônicas resultam na formação do complexo da partícula fágica e íons.

4.6.3 Especificidade dos Bacteriófagos

De acordo com o artigo de revisão de Rakhuba et al. (2010), foi apresentado diversos receptores que podem estar presentes nas bactérias e podem ou não ser reconhecidos por diferentes fagos, definindo assim a sua especificidade. Os receptores bacterianos que entram em contacto com bacteriófagos estão envolvidos em atividades do metabolismo celular, sendo diferentes entre os representantes dos diversos grupos taxonômicos e podendo localizar-se na parede celular ou noutras estruturas de revestimento ou locomoção (Rakhuba *et al.*, 2010).

A Figura 5 representa as duas estruturas de membrana das bactérias Gram-negativas, onde essas são separadas por uma camada conhecida por periplasma que contém uma camada fina de peptidoglicano (PG). Composta por uma bicamada de fosfolípidos, a membrana citoplasmática é a membrana interna que circunda o citoplasma bacteriano. Já a membrana externa apresenta uma estrutura trilamelar com dois folhetos densos contendo proteínas. O folheto exterior é composto principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) e o folheto interior contém fosfolípidos e lipoproteínas. Os LPS das bactérias Gram-negativas são constituídos por um lípido-A e um núcleo de polissacarídeo com cadeias de polissacarídeos específicas (antigénio-O) que se projetam para o exterior (Chatterjee *et al.*, 2012).

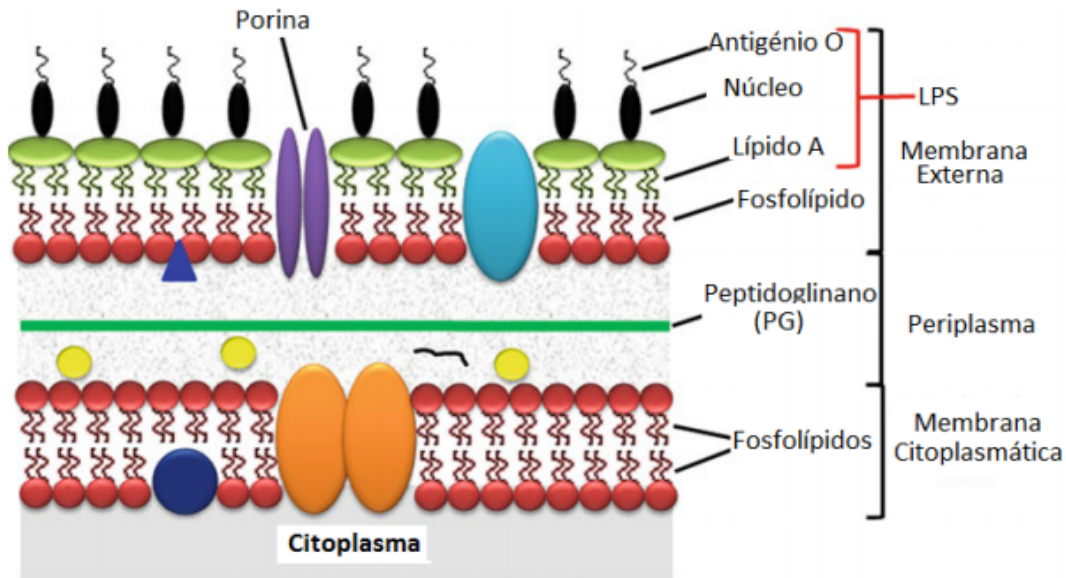


Figura 5: Estrutura das paredes das bactérias Gram-negativas. Fonte Chatterjee *et al.*, 2012.

Em diversos casos os bacteriófagos necessitam de moléculas de ambos os tipos durante a adsorção. As proteínas localizadas em vários locais de LPS e na membrana externa podem servir como receptores de bacteriófagos. Essas proteínas podem ser estruturais como, por exemplo, OmpA (normalmente envolvida no processo de conjugação bacteriana e receptor para o fago K3); porinas que formam canais de membrana como a OmpC (receptor para os fagos Hy2, SS4, Tulb e T4) e OmpF (receptor para o fago T2); enzimas como as proteases OmpT e OmpX (receptores dos bacteriófagos M1 e Ox2 respectivamente) e proteínas transportadoras como LambB (receptora para o fago λ). Na Figura 6 estão representados diversos receptores de fagos de Salmonella (Gram-negativa), que podem incluir glicolípidos do LPS (antígenos O), proteínas de membrana (OmpF, BtuB e TolC) e proteínas de flagelos (FliC, FljB e FliK) (Rakhuba *et al.*, 2010).

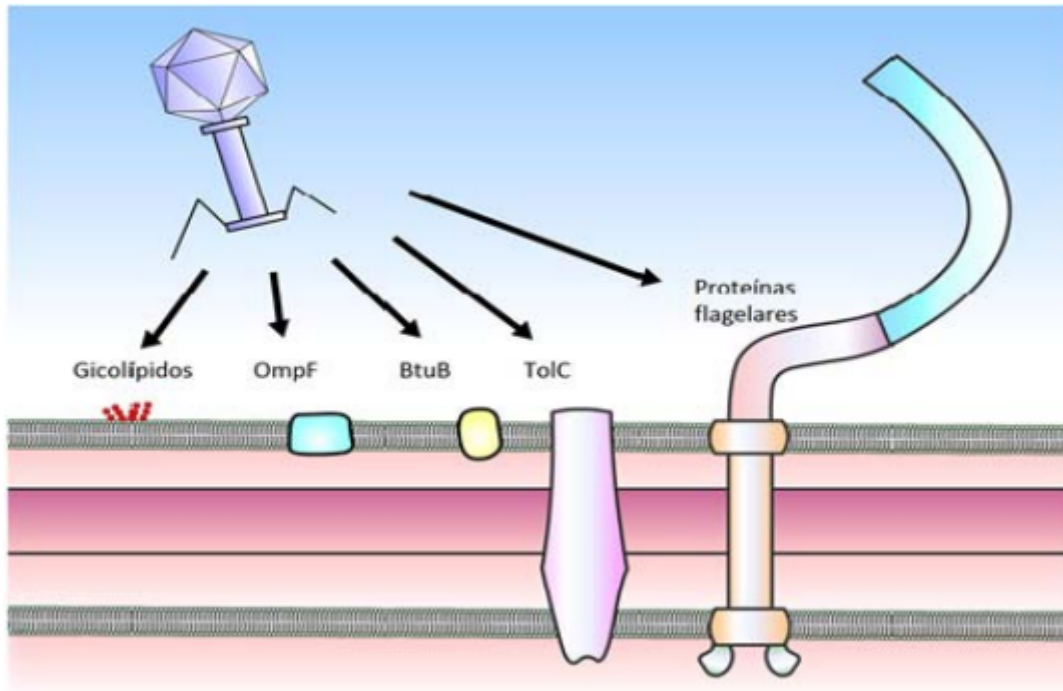


Figura 6: Receptores de fagos de *Salmonella* (Gram-negativa). Fonte Chaturongakul *et al.*, 2014.

Além das proteínas, o LPS pode também servir como receptor para a adsorção de bacteriófagos (Figura 7). Existem dois tipos de LPS: liso (S) e rugoso (R). Fagos específicos para LPS tipo S exibem uma extrema especificidade de hospedeiros determinada pela grande variabilidade da estrutura do antígeno-O, em bactérias de diferentes grupos taxonômicos. Bacteriófagos que reconhecem o LPS tipo R mostram uma gama de hospedeiros mais ampla, uma vez que a estrutura do núcleo do LPS é comum em diferentes gêneros de bactérias Gram negativas (Rakhuba *et al.*, 2010).

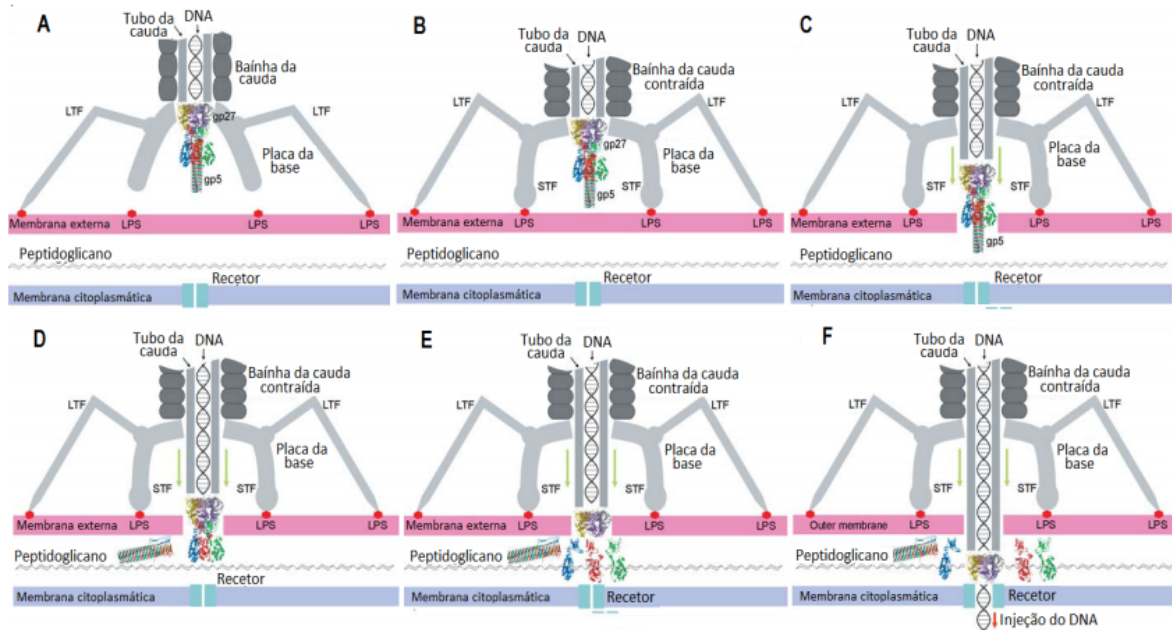


Figura 7: Processo de infecção de *E. coli* pelo fago T4: A- reconhecimento das moléculas de LPS pelas fibras longas da cauda (LTF) numa ligação reversível; B- ligação irreversível aos receptores pelas fibras curtas (STF) e início da contração da bainha; C- a contração da bainha faz com que a agulha perfure a membrana externa; D- ativação dos domínios de lisozima; E- destruição do peptidoglicano pela lisozima; F- reconhecimento da gp27 por um receptor na membrana interna e injeção do DNA. Fonte: Leiman *et al.*, 2003.

A parede celular de bactérias Gram-positivas difere significativamente das espécies Gram-negativas. O componente principal é peptidoglicano, constituindo 40 % a 90 % do peso seco das células, sendo composto por dissacarídeos formados pelos ácidos N-acetilglucosamina e N-acetilmurâmico. Os ácidos teicóicos (WTA e LTA) são outro constituinte e podem ser utilizados como receptores pelos bacteriófagos. Constituem a maior parte dos antígenos de superfície da célula bacteriana e desempenham um papel múltiplo e variado na sua fisiologia estando envolvidos, por exemplo, na regulação iônica e no controle da divisão celular. Na Figura 8 pode observar-se uma representação esquemática da parede celular de *Lactococcus lactis* (Gram positiva) e as suas interações com bacteriófagos infestantes através do reconhecimento específico de receptores (polissacarídeos) localizados na superfície bacteriana (Chapot-Chartier *et al.*, 2014).

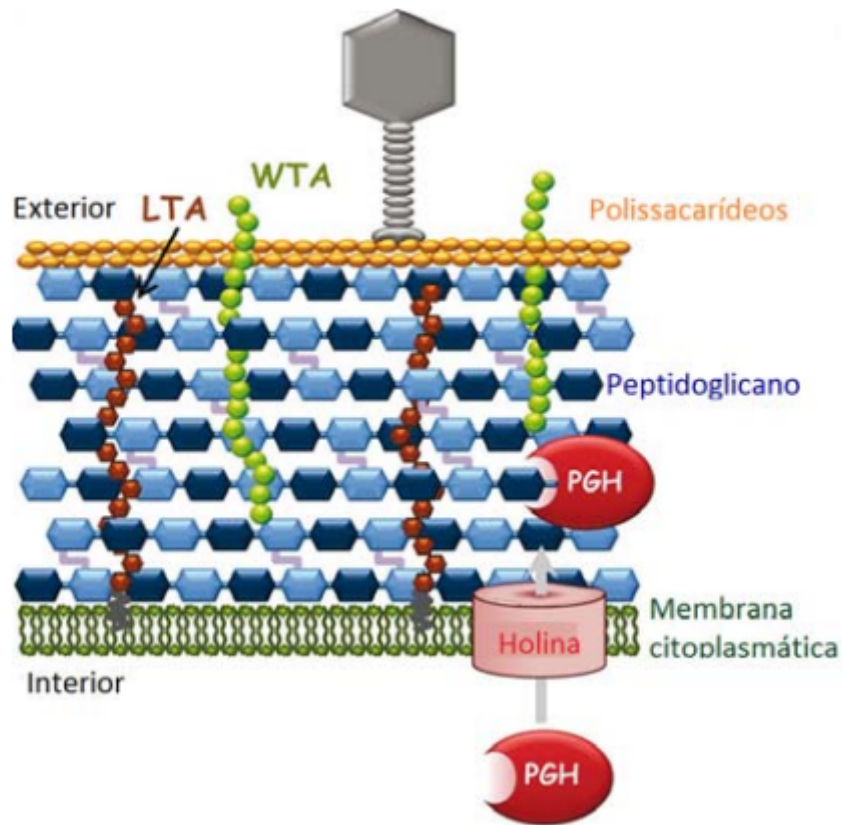


Figura 8: Parede celular de *Lactococcus lactis* as suas interações com bacteriófagos. No final do ciclo de infecção, no interior do hospedeiro, a holina (PGH, do inglês *peptidoglycan hydrolase*), endolisina codificada pelo genoma do fago, tem acesso ao peptidoglicano, destruindo a sua estrutura para libertação dos vibriões. Fonte: Chapot-Chartier *et al.*, 2014.

Por outro lado, muitos bacteriófagos são atraídos para receptores bacterianos localizados em flagelos, pili e cápsulas (Rakhuba *et al.*, 2010). Na Figura 9, observa-se a infecção de *Salmonella enterica* pelo bacteriófago iEPS5, cujo DNA foi marcado. Nos primeiros 10 min, alguns flagelos da bactéria tornam-se fluorescentes. Após 1 h a fluorescência deslocou-se para o citoplasma, durante a injeção do DNA do bacteriófago (Choi *et al.*, 2013).

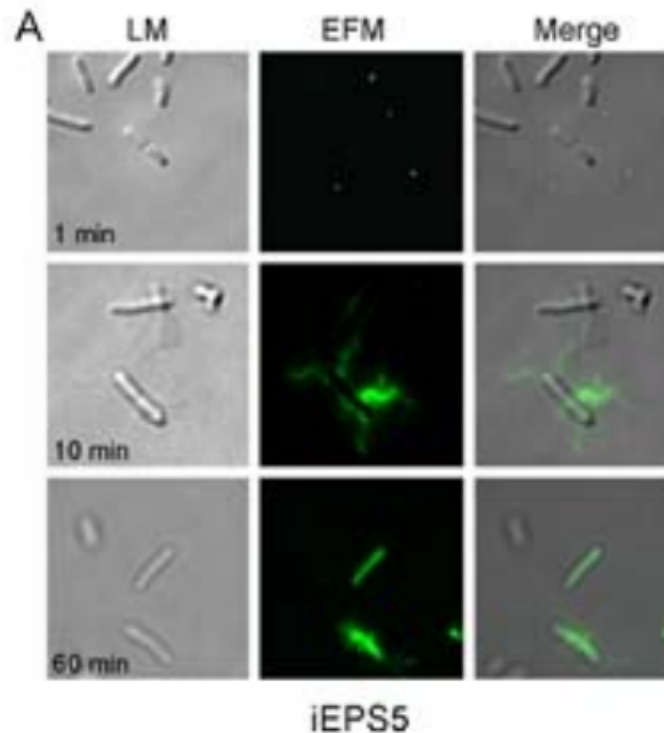


Figura 9: Infecção de *Salmonella enterica* pelo bacteriófago iEPS5. LM (microscópio ótico); EFM (microscopia de epifluorescência); Merge (fusão de LM e EFM). Ampliação 1000. Fonte: Choi *et al.*, 2013

Os mecanismos de adsorção e a taxa de penetração variam em cada par do fago/hospedeiro. Como os bacteriófagos não têm estruturas específicas responsáveis pelo movimento, não podem se mover de forma independente. Assim, o processo de adsorção é o resultado da colisão aleatória entre as bactérias e os fagos, que aumenta à medida que a concentração de cada um aumenta. A taxa de adsorção é também determinada por uma série de fatores físico-químicos (pH, temperatura e a presença de alguns íons) e depende das condições fisiológicas do hospedeiro (Rakhuba *et al.*, 2010), conforme apresentado anteriormente.

4.7 Biodiversidade

Em todos os ambientes estudados tem sido mostrado que os fagos superam as bactérias, gerando assim a hipótese de que é a forma de vida predominante na biosfera (Farrag *et al.*, 1989; Brading *et al.*, 1995; Simões *et al.*, 2005). O tamanho global da população estimada de fago é extremamente alta. Os ecossistemas terrestres revelaram 10^7 UFP por grama de solo de bacteriófagos (Farrag *et al.*,

1989) e de esgoto apresentam números de fagos totais na faixa de 10^8 - 10^{10} UFP por mililitro (Wagenaar et al., 2005). Já em ambiente aquático presume-se que tenha números de fagos totais acima de 10^{31} UFP (Farrag et al., 1989 & Raya et al., 2006).

De maneira geral, onde há bactérias há bacteriófagos. Estes podem ser encontrados em diversos lugares como nos desertos, nas fontes termais, no Mar do Norte e em águas polares (Prigent et al 2005; Lin et al.2010; Breitbart et al 2004; Wichels et al. 1998; Sawstrom et al. 2008). Algumas pesquisas revelaram que, além destes locais, também é possível detectar fagos em águas subterrâneas e superficiais, em alimentos como chucrute e vinho, solo, lamas e esgotos (Lucena et al. 2006; Yoon et al. 2002; Davis et al. 1985; Kumari et al. 2010). Em humanos e animais podem ser encontrados e isolados da saliva e dos excrementos como fezes e urina, por exemplo (Gantzer et al. 2002; Caroli et al 1980; Bachrach et al. 2003; Nigutová et al. 2008.; Keller e Traub 1974). Os fagos fazem parte da microbiota intestinal juntamente com as bactérias e são capazes de penetrar os diferentes órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central (Frenkel & Salomon, 2002; Kameyama et al., 2001). No ecossistema aquático, os fagos são responsáveis por 10 a 80 % da mortalidade bacteriana total, sendo importantes no que diz respeito à limitação das populações desses microrganismos (Weinbauer et al. 2004).

Os bacteriófagos podem apresentar uma grande variedade morfológica mesmo residindo em ambientes semelhantes. Ackermann (2007) classificou cinco tipos de fagos que ocorrem em fontes termais como SH1, STIV, *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae* e *Globuloviridae*. Segundo o autor, SH1 tem a mesma estrutura que os *Tectiviruses* (Figura 10), sendo poliédricos. Os fagos do grupo SH1 e *Tectiviruses*, foram encontrados na Austrália em um lago hipersalino. Os fagos STIV podem infectar bactérias hipertermofílicas, e foram encontrados pela primeira vez em fontes de águas quentes no *Yellowstone National Park* (nos EUA) (Ackermann, 2007). Os fagos deste grupo também são poliédricos. A seguir será discorrido a diversidade viral e suas características.

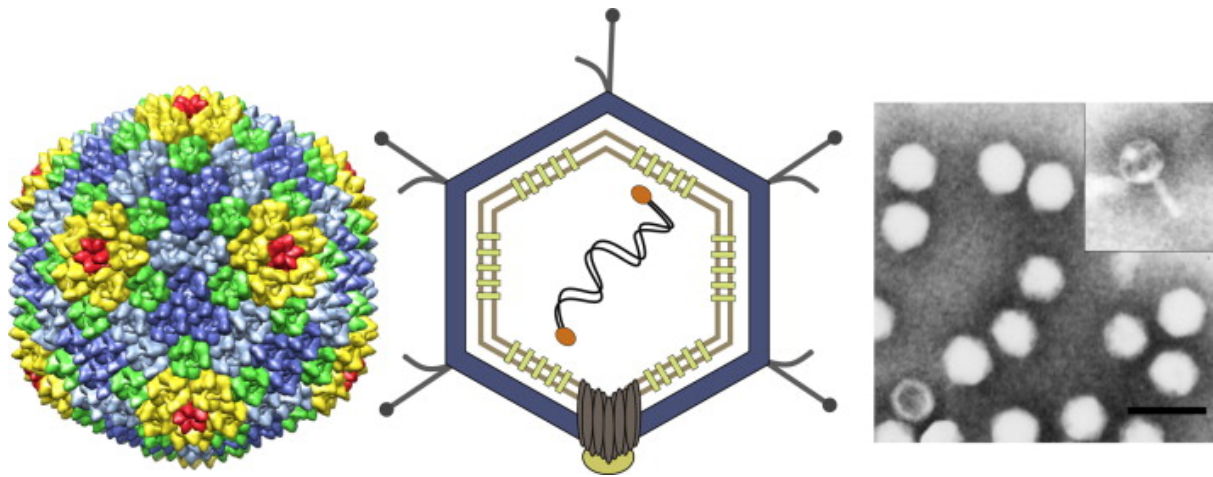


Figura 10: Bacteriófago da família *Tectiviruses*. Fonte: Virus Taxonomy, 2012, pp. 317-321

4.7.1 Bacteriófagos com genoma de DNA de fita dupla

Fago T4

Esse vírus apresenta uma estrutura relativamente complexa, possuindo cabeça icosaédrica proteica que envolve um DNA linear de fita dupla (que se apresenta enovelado), cauda helicoidal longa, placa basal com pontas curtas e seis longas fibras que garantem a aderência à parede celular da bactéria, como sugere a Figura 11. O fago T4 é o mais estudado, tendo como hospedeiro a enterobactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Madigan et al., 2010).

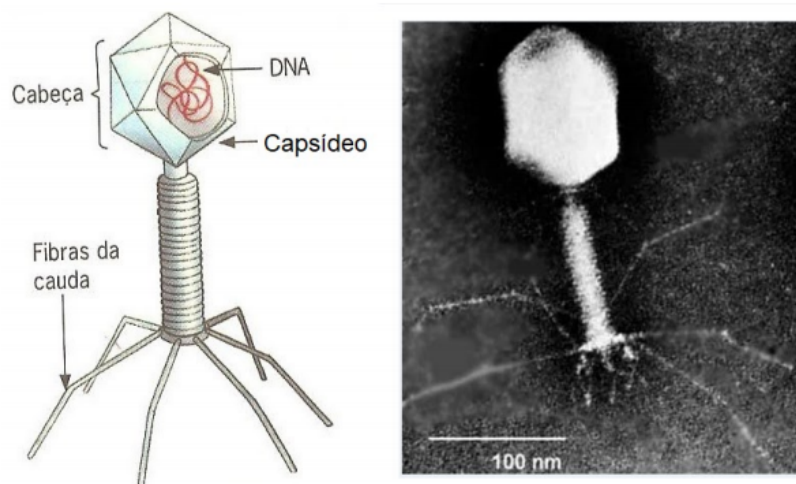


Figura 11: Imagem esquemática da estrutura de um bacteriófago do lado esquerdo, e uma foto de microscopia eletrônica do bacteriófago T4 do lado direito.

Fonte: <http://profkaren.blogspot.com.br/2013/03/virologia-1.html>

Em vez da citosina, o DNA do fago T4 contém a base 5- hidroximetilcitosina que corresponde a resíduos de glicosídeos. Moléculas de DNA com esta modificação são mais resistentes às enzimas de restrição, estando mais protegido contra as defesas do hospedeiro (Madigan et al., 2008, Petrov et al., 2010).

O bacteriófago T4 é transportado pela água ou ar, até que se encontre com uma bactéria *E. coli* viva, a qual será sua hospedeira.

T3 e T7

Estes são denominados de colifagos. Como a Figura 12 mostra, são vírus relativamente pequenos apresentando uma curta cauda e um genoma corresponde a uma molécula de DNA linear de fita dupla. Estes colifagos infectam *E. coli* e algumas linhagens dos gêneros *Shigella* e *Pasteurella*. O genoma do fago T7 contém cerca de 39.936 pares de base (pb) que se distribuem em uma molécula de DNA linear de fita dupla (Petrov et al., 2010).

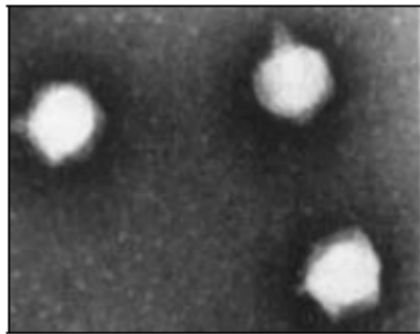


Figura 12: Microscopia eletrônica do Fago T3 e T7; Fonte: ICTV, 2009.

MU - vírus transponível

Este bacteriófago também apresenta DNA dupla fita, e corresponde a um vírus grande com cabeça icosaédrica com cerca de 54 nm de largura, e no qual a maior parte da informação genética está envolvida na síntese das proteínas da cauda e cabeça (Figura 13). É um vírus da família *Myoviridae* e foi denominado como MU por ser mutador, ou seja, é capaz de induzir mutações no genoma de seu

hospedeiro. Esse fago é muito utilizado na engenharia genética por apresentar elementos transponíveis que são sequências de DNA que exibem habilidade de se mover de um local para outro no genoma do hospedeiro (Pato & Oram, 2004).

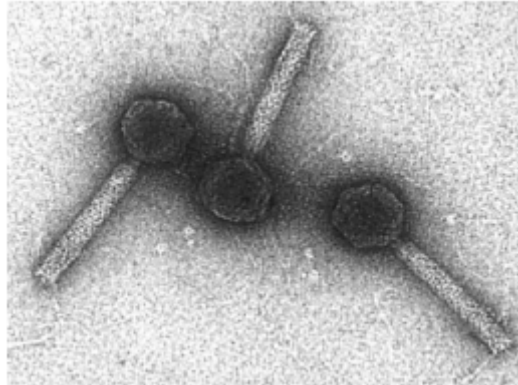


Figura 13: Microscopia eletrônica do Fago MU; Fonte: Pereira, 2011.

Bacteriófago lambda

O bacteriófago lambda infecta *E.coli* e *Citrobacter freundii*. É um dos vírus mais estudados e amplamente utilizado na engenharia genética como vetor de clonagem de DNA recombinante (Fogg *et al.*, 2010). Como mostra a Figura 14, as partículas do fago lambda são similares às de muitos outros bacteriófagos. O DNA de lambda é uma fita dupla linear com pequenas regiões de fita simples nos terminais 5'. Esses terminais de fita simples são complementares (extremidades coesivas) e assim eles podem parear base a base e produzir uma molécula circular. No interior da célula as extremidades livres do círculo podem ser ligadas para formar um círculo covalentemente fechado (Madigan *et al.*, 2008, Pal *et al.*, 2007).

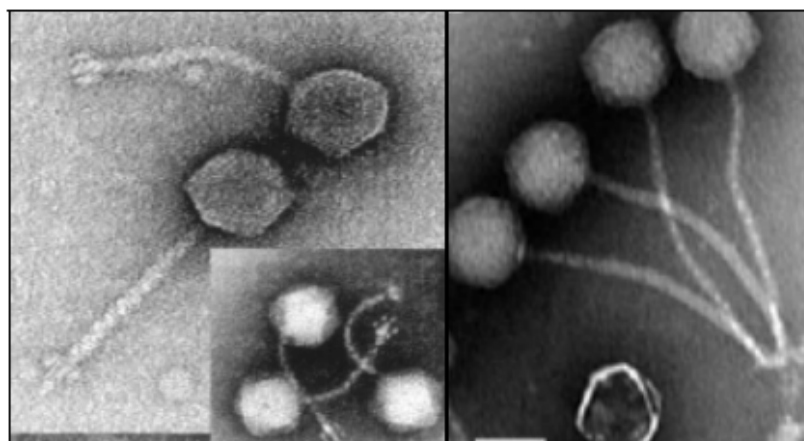


Figura 14: Microscopia eletrônica do Fago lambda; Fonte: Chibani-chennouf *et al.*, 2004

4.7.2 Bacteriófagos de DNA de fita simples: vírions icosaédricos

Segundo o sistema de Classificação de Baltimore, bacteriófagos de DNA de fita simples correspondem aos vírus da classe II. Os bacteriófagos pertencentes a essa classe são senso positivo e apresentam genoma de DNAfs que utiliza um intermediário de DNAfd para sintetizar RNAm. Antes que o genoma seja transcrito a fita complementar deve ser sintetizada. Ø X174 é um dos fagos desta classe e apresenta uma ferramenta de grande importância na engenharia genética, devido a replicação do DNA (Tiemann et al., 2004). Esse bacteriófago foi o primeiro a ser completamente sequenciado. Em seu genoma apresenta cerca de 5.836 nucleotídeos e sequências de codificação para pelo menos 10 proteínas importantes para sua replicação. São fagos de tamanho pequeno de 25 nm e DNA circular, que possuem apenas uma quantidade limitada de informação genética em seu genoma, utilizando a maquinaria de replicação de DNA da célula hospedeira na replicação do DNA viral (Figura 15). *E. coli* é o hospedeiro específico deste fago (Madigan et al., 2008).

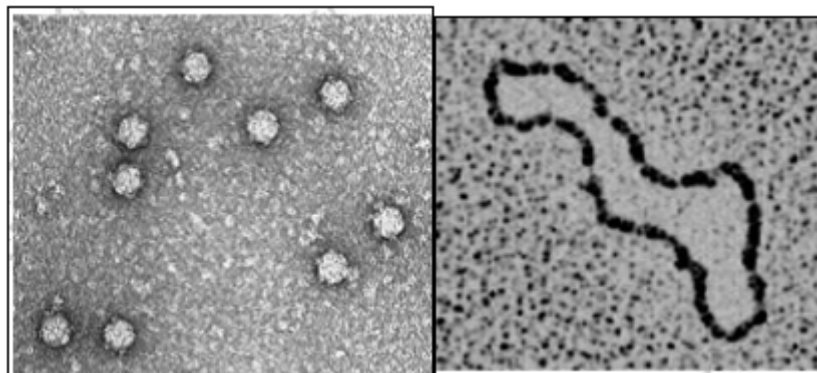


Figura 15: Microscopia eletrônica de partículas e DNA do fago Ø X174 Fonte: ICTV, 2009

4.7.3 Bacteriófagos de DNA de fita simples: Vírions filamentosos

O fago mais estudado desse grupo é o M13 (Figura 16). Esse bacteriófago é um fago filamentososo de simetria helicoidal e contém uma única fita de DNA envolvida por proteínas virais (Straus et al., 2008). Apesar de apresentar uma estrutura linear, seu DNA é circular. Responsável por infectar *E. coli*, penetrando

após se ligarem ao pilli da bactéria. São muito interessantes, pois a célula hospedeira pode continuar se multiplicando enquanto libera as partículas virais, ou seja, são liberadas sem matar a célula hospedeira (Hemminga et al., 2010). Tem grande utilização como vetor de clonagem e também como modelo biológico para a nanotecnologia. O fago M13 é composto por cinco proteínas modificadas envolvidas na formação do capsídeo e apresenta uma alta taxa de reprodução.



Figura 16: Microscopia eletrônica do fago filamentosso M13; Fonte: ICTV, 2009

4.7.4 Bacteriófagos de RNA

São fagos relativamente pequenos, com aproximadamente 26nm e de simetria icosaédrica, com 180 cópias da proteína do capsídeo por partícula viral. Um exemplo é o bacteriófago MS2 (Figura 17), que infecta *E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae, sendo muito utilizado no controle de contaminação da água. O genoma do MS2 é um dos menores conhecido, com 3.569 nucleotídeos de RNA de fita simples. Onde codifica apenas quatro proteínas: proteínas de maturação (proteína A), capsídeo, lise e RNA ligase (Madigan et al., 2008). Muitos bacteriófagos apresentam genoma de RNA na configuração positiva, mas o grupo de bacteriófagos de RNA que infectam bactérias entéricas somente as infecta quando estas apresentam plasmídeo conjugativo que permite a bactéria atuar como célula doadora (F+) no processo de transferência de genes (Shin & Sobsey 2003).

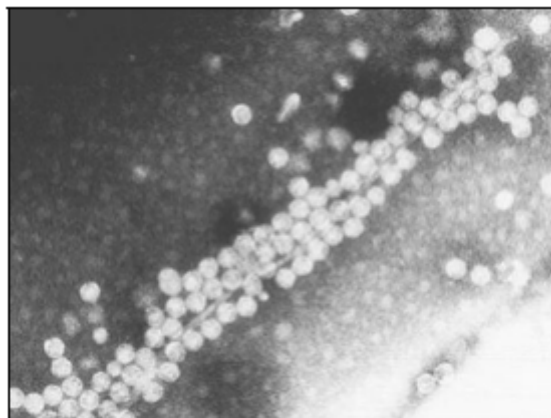


Figura 17: Microscopia eletrônica de partículas do fago MS2; Fonte: ICTV, 2009

5. Aplicações biotecnológicas dos bacteriófagos

A utilização dos bacteriófagos em várias áreas do domínio da engenharia genética está se tornando muito promissora. Sua aplicação vai além do tratamento e prevenção de doenças infecciosas. Atualmente há diversas pesquisas que revelam um aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos. Dessa maneira, despertou novamente o interesse e a atenção para a terapia com utilização de fago. Por serem uma ferramenta natural, não tóxica e viável para o controle de patógenos, esta alternativa foi reavaliada como terapêutica biológica para eliminar bactérias patogênicas. O procedimento para a utilização de fagos como agentes terapêuticos apresenta muitas vantagens, além de ser bastante simples. Dessas vantagens, pode-se citar a especificidade contra um hospedeiro ou vários hospedeiros, não afetando a microbiota natural e a capacidade de autorreplicação no local da infecção sem efeitos colaterais graves. Com isso é visível os benefícios ao meio ambiente e a saúde, pois a produção dos fagos é simples, barata e ecologicamente correta (Sulakvelidze et al., 2001).

A utilização dos fagos vem sendo estudada e aplicada em diversas áreas. Na indústria alimentícia, tem sido utilizado como ferramenta para conservação e melhoramento de alimentos e a saúde de animais. Há estudos sobre a aplicabilidade em produtos alimentares de origem animal e vegetal (Sillankorva et al., 2008). Na agropecuária, os fagos têm sido aplicados com sucesso na criação de gado bovino e de ovinos, pois tendem a diminuir a população de bactérias patogênicas e minimizar as doenças dos animais (Loc Carrillo et al., 2005; Atterbury

et al., 2007; Wagenaar et al., 2005; Sheng et al., 2006; Raya et al., 2006). Em pesquisas para recuperação de áreas contaminadas por substâncias derivadas de petróleo, a utilização dos bacteriófagos também é registrada (PuaperUAPERMPOONSIRI et al., 2009).

5.1 Bacteriófagos como controle microbiológico de alimentos

Os surtos de doenças alimentares normalmente são associadas ao consumo de alimentos que não foram preparados corretamente e contaminados com agentes bacterianos patogênicos (Ackers, et al., 1998). Um grande desafio tecnológico é a descontaminação de frutas, legumes e carnes, pois as técnicas empregadas utilizam produtos químicos antibacterianos, que por sua vez são eficazes, mas sua intensa utilização fez com que os microrganismos criassem um mecanismo de resistência, diminuindo sua eficácia. Além disso, são substâncias consideradas com um potencial prejudicial à saúde humana. Há diversos agentes patogênicos, os quais estão relacionados com os surtos de infecção alimentar em nível mundial. As carnes de varejo são um depósito de agentes patogênicos como a *E. coli* e *Salmonella* sp. Essas cepas são as mais comumente relacionadas aos surtos de contaminação alimentar, causando infecções extra-intestinais em humanos (Vicente et al., 2010). Na Inglaterra no ano de 2000, foram registrados cerca de 350 mil casos da doença entérica, sendo o *Campylobacter jejuni* um dos principais agentes causadores. Essa doença pode ser adquirida por meio do consumo de carne de frango mal cozida, pois seu reservatório natural são as aves de capoeira (Newell & Fearnley, 2003). A utilização de antibióticos para controle desse agente é limitada devido à grande diversidade genômica do *C. jejuni* (Dworkin & Blaser, 1997).

A listeriose é causada pela *Listeria monocytogenes*, a qual está ligada a vários surtos alimentares graves, podendo ser isolada de diversos alimentos prontos para o consumo. Por apresentar um grande risco à saúde pública, a legislação europeia estabelece como critério de segurança alimentar a ausência do microrganismo em 25 g de alimento (Dupont & Augustin 2009). Nos EUA, estima-se que anualmente há cerca de 2.000 internações e 500 mortes devido a contaminação por *Listeria monocytogenes* (Guenther et al., 2009). No Brasil, a listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada (Silva et al., 2007), não havendo registros de

casos transmitidos por alimentos (Destro, 2006), embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos, sobretudo em derivados lácteos (Carvalho *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2008). É provável que a maioria dos casos humanos esporádicos tenham o alimento como veículo de transmissão da *L. monocytogenes* (Hofer *et al.*, 2006) o que reforça a necessidade de identificar as fontes de infecção e os possíveis alimentos envolvidos, principalmente o leite e derivados.

Um relatório sobre os riscos biológicos para a segurança dos alimentos foi publicado em 2009 pela Autoridade Europeia da Segurança dos Alimentos (AESA), afirmando que os bacteriófagos podem ser uma alternativa eficaz de eliminar patógenos específicos dos alimentos. O relatório visou analisar a aplicação da fitoterapia nos alimentos mais importantes de origem animal, como carne e produtos à base de carne, leite e derivados. Como resultado obtiveram que os bacteriófagos tendem a persistir mais tempo do que as bactérias e se comportam como partículas inertes no ambiente. Outro ponto indicado no relatório foi que a atividade antibacteriana dos bacteriófagos a longo prazo é reduzida em superfícies secas e para cada tipo de fago a persistência nos alimentos varia. A dosagem e fatores físico-químicos intrínsecos e extrínsecos associados ao alimento, tais como pH, umidade e temperatura, são fatores importantes quanto a eficácia do uso dos bacteriófagos. Para produtos como carne e lácteos, a refrigeração aumenta a persistência dos bacteriófagos sobre a superfície destes alimentos (Weekly, 2009).

Um estudo de Atterbury *et al.*, (2007) apresentou que a utilização da fagoterapia reduziu a colonização de *Salmonella* em frangos. Para a realização deste estudo, os autores administraram nas aves, bacteriófagos que foram isolados de vários sorotipos de *Salmonella*. A avaliação das aves foi por meio da contagem de amostras de *Salmonella* e do fago do ceco, após 36 a 38 dias da administração dos fagos, onde os resultados obtidos mostraram que há diminuição de *Salmonella* quando administrado em uma maior dosagem do fago específico ao seu hospedeiro. Além disso, o trabalho aborda alguns questionamentos quanto à fagoterapia e que se referem ao período de aplicação, idade e dose e, em especial, destaca a possível resistência das bactérias aos fagos. De acordo com a OMS (2002), a contaminação por bactérias patogênicas de equipamentos, instalações de processamento na

indústria de alimentos é algo de grande preocupação. Usualmente se faz a utilização de químicos para desinfecção de superfícies duras, ao qual se faz muito eficaz, mas muitos apresentam atividade corrosiva e tóxica. Abulazed *et al*, em 2008 descreve a redução experimental de *E. coli* O157:H7 na contaminação de superfícies duras como lamelas de vidro e placas de gesso e alimentos como , tomates, espinafre, brócolis e carne moída. Foi preparado um coquetel de bacteriófagos específicos da *E. coli* O157 : H7 denominado ECP-100, contendo tres fagos líticos (ECML-4, ECML-117 e ECML-134) em diferentes concentrações (10^{10} , 10^9 e 10^8 PFU/mL), onde a atividade lítica foi avaliada. Uma redução de 94% a 99% de cepas de *E. coli* O157:H7 viáveis foi obtido como resultado. As Figuras 18a e 18b demonstram os resultados obtidos pelo autor.

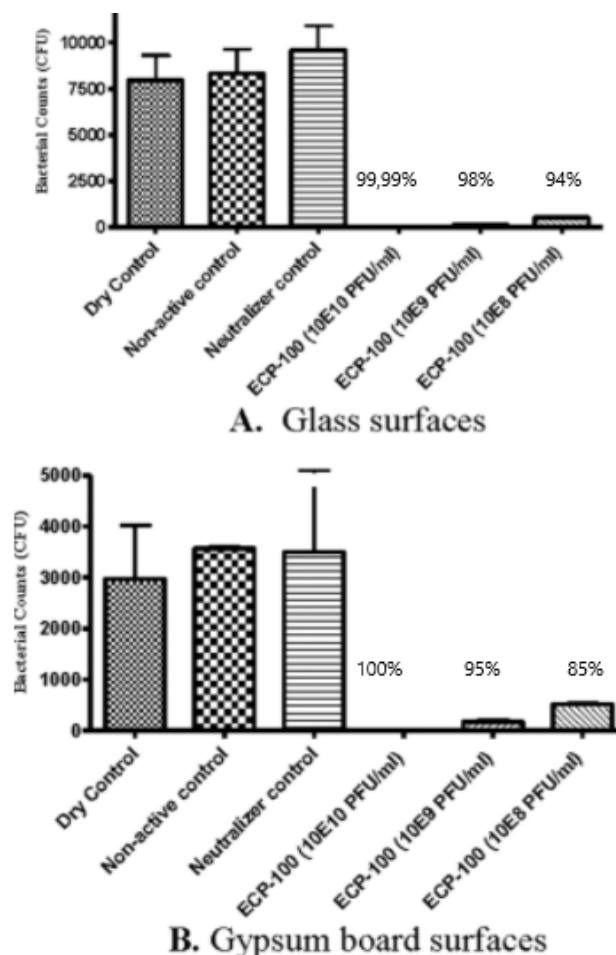


Figura 18a : Redução da contaminação por *E. coli* de lamelas de vidro e placas de gesso tratadas com ECP-100 (com base em amostras triplicadas; barras, erros padrão das médias). Controle não ativo, matrizes tratadas com PBS; controle seco, matrizes não tratadas; controle de neutralizador, controle da ausência de fagos livres nos filtros Nalgene após enxágue com PBS. O formato 10E10, 10E9, 10E8 e PFU / ml é utilizada para transmitir concentrações de fagos de 10^{10} , 10^9 , e 10^8 PFU / ml, respectivamente.

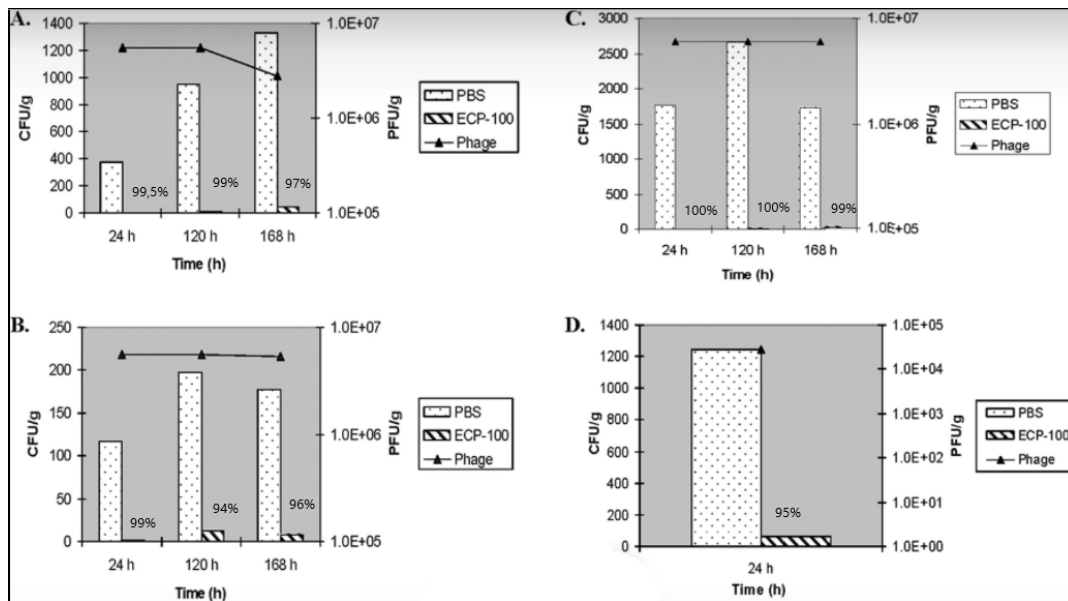


Figura 18b : Redução da contaminação por *E. coli* de (A) brócolis, (B) tomate, (C) espinafre e (D) carne moída tratada com ECP-100 (com base em valores médios; títulos de fago são mostrados em escala logarítmica). O formato 1.0E + 7, 1.0E + 6, etc., PFU / g é usado para transmitir concentrações de fago de 10^7 , 10^6 , etc., PFU / g, respectivamente.

El Shibiny *et al* (2005) avaliou a diversidade de espécies de *Campylobacter* em frangos de criação ao ar livre e orgânicos, assim como a susceptibilidade deste agente frente ao bacteriófago. Como resultado, obtiveram que o *C. jejuni* foi a espécie predominante, e que no 28° dia da terapia fágica houve uma redução significativa do *C. jejuni* no rebanho orgânico. No entanto, há trabalhos que relatam uma certa resistência aos bacteriófagos em frangos de corte devido a rearranjos genômicos, que causam inversões intra genômicas levando à resistência aos bacteriófagos. Como, por exemplo, o trabalho de Scott e colaboradores em 2007, que avaliaram a dinâmica do genoma de *C. jejuni* e a resposta na predação de bacteriófagos, ao qual realizaram um teste *in vitro* e obtiveram como resultado que 91% dos agentes isolados apresentam resistência aos fagos devido às inversões intra genômicas. Há uma certa preocupação na utilização dos fagos MU na terapia fágica em frangos para o *C. jejuni*, pois este fago apresenta a possibilidade de induzir mutações e estarem associados a determinantes de virulência (Nechaev & Severinov, 2009). Com estas hipóteses o principal benefício terapêutico seria uma redução do *C. jejuni* e uma diminuição temporária da transmissão em vez de eliminá-lo definitivamente.

Nos EUA as fábricas de processamento de alimentos apresentam frequentes contaminações por *Listeria monocytogenes*, bactérias formadoras de biofilmes e resistentes a vários tipos de desinfetantes. Kim et al, 2008, analisaram que algumas cepas de *L. monocytogenes* apresentaram resistência aos fagos diminuindo a capacidade de adsorção do vírus, assim como identificaram 12 tipos de fagos com seus respectivos hospedeiros, sendo diversas espécies de *Listeria* e principalmente *L. monocytogenes*. Em outro estudo apresentado por Guenther e colaboradores (2009), foi analisado a utilização de fagos virulentos para biocontrole de *L. monocytogenes* em alimentos prontos, onde foram selecionados 8 tipos de alimentos, como por exemplo salsichas, queijos, leites fermentados, mariscos cozidos, carnes de peito de peru, e entre outros que são frequentemente contaminados com *L. monocytogenes*. Para a realização do estudo, os alimentos foram primeiramente contaminados experimentalmente com o agente patogênico e, em seguida, foram inoculados os fagos na concentração de 10^8 PFU/g ou ml de alimento. Os alimentos foram incubados em duas temperaturas distintas, sendo a temperatura própria de armazenamento e uma temperatura mais elevada, próxima a do ambiente. Por fim, após o tempo de incubação as bactérias viáveis foram quantificadas e os resultados foram demonstrados em gráficos, como mostra a Figura 19.

Na Figura 19 está representada a redução da *L. monocytogenes* na salsicha e leite achocolatado. Primeiramente, o teste foi realizado a uma temperatura de 6°C durante 3 dias (Figura 19a), havendo uma redução de *L. monocytogenes* na salsicha de 10^7 para 10^2 UFC/ml e no leite achocolatado a redução foi de 10^8 para zero UFC/ml. Na Figura 19b o teste foi realizado a 20°C por 6 dias, e como resultado se obteve que a fagoterapia não foi tão eficaz como no primeiro teste, havendo uma redução na salsicha foi de 10^9 para aproximadamente 10^6 UFC/ml e no leite achocolatado de 10^9 para aproximadamente 10^3 UFC/ml.

Para a obtenção de resultados satisfatórios da fagoterapia no controle microbiológico de alimentos existem diversos fatores a serem cumpridos e analisados como, por exemplo, a carga viral utilizada, pois quanto maior o título utilizado maior será a redução de microrganismos. Além disso, há outros fatores importantes como o tipo de alimento, pH, umidade, temperatura e fatores intrínsecos

como força iônica que podem prejudicar na adsorção do fago à superfície bacteriana. Os parâmetros citados são definidos para cada alimento e podem ser alterados durante o processo de produção (Carlton et al.,2005). Segundo os autores em estudos anteriores foi relatada a ineficácia da terapia devido a utilização de fagos temperados incapazes de realizar o ciclo lítico.

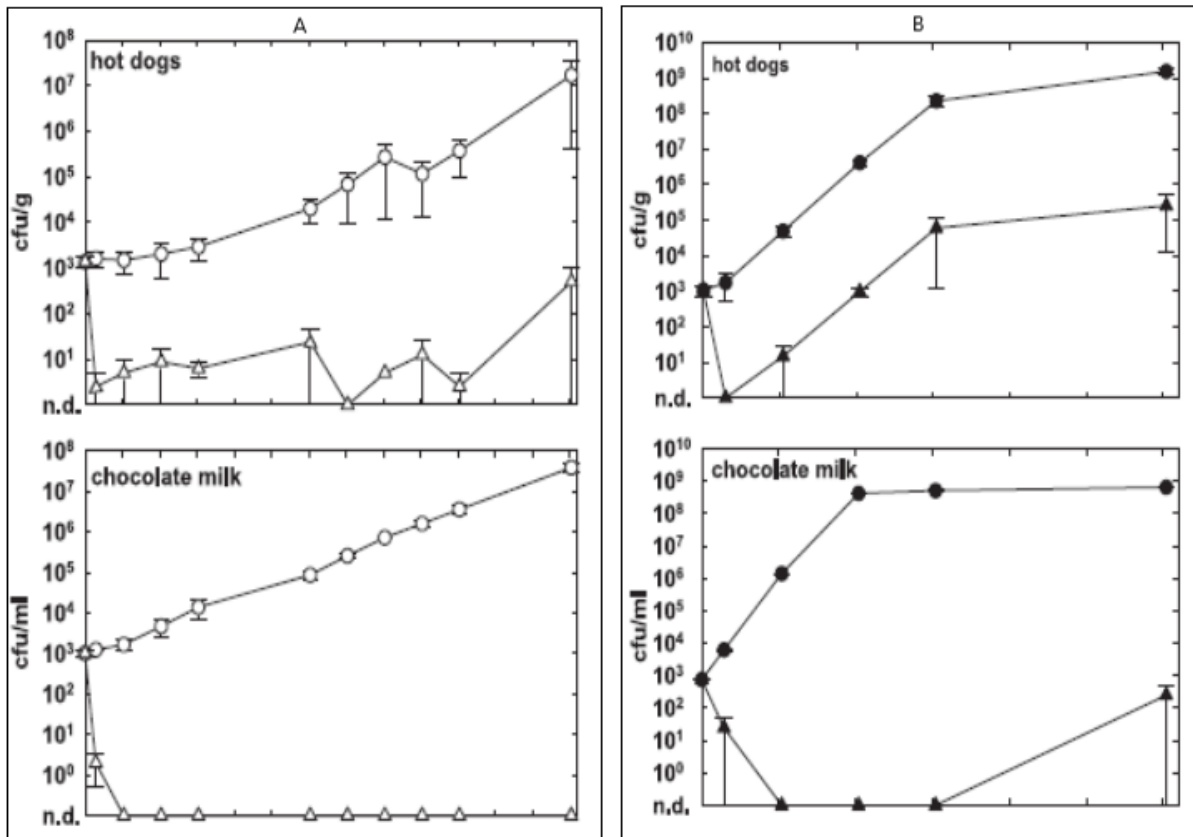


Figura 19a: Efeito do fago no crescimento de *L. monocytogenes*. Amostras armazenadas por 13 dias a 6°C. Círculos abertos controles sem o fago e triângulos abertos amostras de alimentos tratados com fagos. Fonte: Guenther *et al.*, 2009

Figura 19b: Efeito do fago no crescimento de *L. monocytogenes*. Amostras armazenadas por 6 dias a 20°C. Círculos fechados controles sem o fago e triângulos fechados, amostras de alimentos tratados com fagos. Fonte: Guenther *et al.*, 2009

5.2 Bacteriófagos como controle microbiológico de biofilmes

O biofilme bacteriano se desenvolve em diversos ambientes como materiais cirúrgicos em hospitais, sistemas de obtenção de água em indústrias, entre outros. Além disso, há vários problemas vinculados à formação deste biofilme, pois são importantes na patogênese de infecções. Existem dois principais microrganismos formadores que biofilme, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescense*

(Figura 20a). Devido a produção de lipases termoestáveis, proteases e lecitinases, esses microrganismos apresentam uma grande capacidade de deterioração e formação de biofilme por meio do aumento da colonização de superfícies inertes por outros microrganismos, sendo de difícil erradicação devido a resistência destes microrganismos aos produtos químicos utilizados para sua remoção (Dogan & Boor, 2003). Outro microrganismo que requer atenção quanto a formação de biofilmes é *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (Figura 20b), pois são os principais causadores de endocardite e infecções renais, sendo frequentemente isolados de cateter no ambiente hospitalar. A estimativa de morte devido a formação de biofilmes em instrumentos cirúrgicos é de 12-25 % nos EUA. Neste sentido, a utilização de fagos para o controle da formação de biofilmes é de grande interesse, pois os métodos de esterilização utilizados para a destruição de biofilmes em instrumentos hospitalares nem sempre são eficazes e a resistência intrínseca dos microrganismos às drogas é algo de grande preocupação (Jikia et al., 2005).

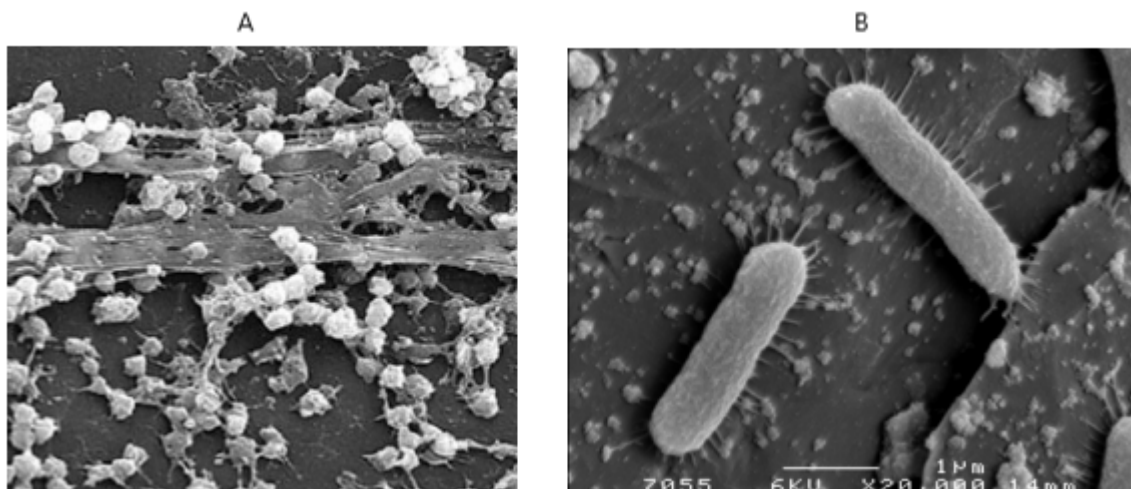


Figura 20a: Microscopia eletrônica de biofilme formado por *Staphylococcus aureus*. Fonte: Dolan, 2002. Figura 20b: Microscopia eletrônica de *P. fluorescens* e fagos em lâmina de aço inoxidável. Fonte: Silankorva, 2008

A Europa Ocidental é um dos principais lugares onde tem-se feito a utilização de bacteriófagos para tratar infecções bacterianas (fagoterapia) desde o início do século 20. E, segundo Curtin e Donlan (2006), o tratamento com bacteriófagos tem sido um método para controlar o biofilme bacteriano. No entanto, a fagoterapia deve ser considerada um complemento para as demais terapias já utilizadas para o controle de biofilmes (Merril et al., 2003). Em 2006 o FDA autorizou a utilização de fagos para o controle de bactérias patogênicas em ambientes industriais.

Há diversos estudos apresentados relacionado à utilização da fagoterapia para tratamento de biofilmes. A enzima produzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é a Dpsb, que hidrolisa adesinas necessárias para a formação do biofilme. O trabalho apresentado por Lu & Collins em 2007, teve por objetivo desenvolver bacteriófagos para produzir uma enzima degradadora de biofilmes, por meio da engenharia enzimática. A necessidade de um coquetel de bacteriófagos foi requerido para a dispersão do biofilme, devido a variação da população bacteriana do biofilme (Andrianantoandro et al., 2006). O fago T7 de *E. coli* foi utilizado por Lu & Collins em 2007 para codificar a enzima Dpsb intracelular durante a infecção nas células de *A. actinomycetemcomitans*, de modo que a enzima seria liberada na lise celular para o meio extracelular (Figura 21).

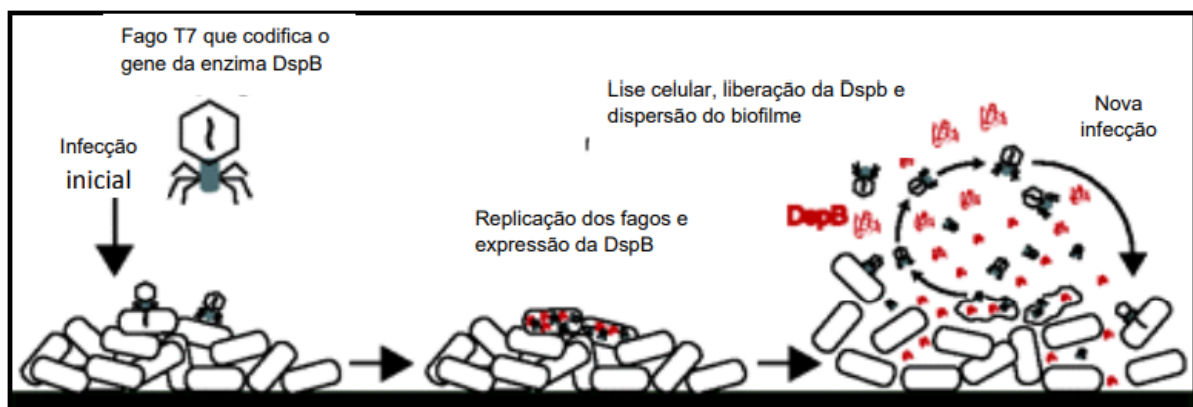


Figura 21: Processo de redução de biofilme utilizando engenharia enzimática de bacteriófagos. Fonte: Adaptado de Lu e Collins, 2007.

Silankorva em 2004, apresentou em sua dissertação de mestrado o estudo do controle de biofilme de *Pseudomonas fluorescense* por meio da terapia com fago Φ S1. Como resultado desse estudo, os bacteriófagos apresentaram uma porcentagem de remoção de 80% de biofilmes em seu estado inicial (células aderidas a superfícies) e biofilmes maduros, sendo os hospedeiros crescidos à temperatura e meio de crescimento ótimo. A condição da infecção fágica é regida por diversos fatores como a temperatura, fase e meio de crescimento do hospedeiro. A Figura 22 demonstra o experimento de Silankorva em 2004. O biofilme foi formado em uma placa de vidro e infectado por fagos específicos de *P. fluorescense* a uma temperatura de 26° (Figura 22).

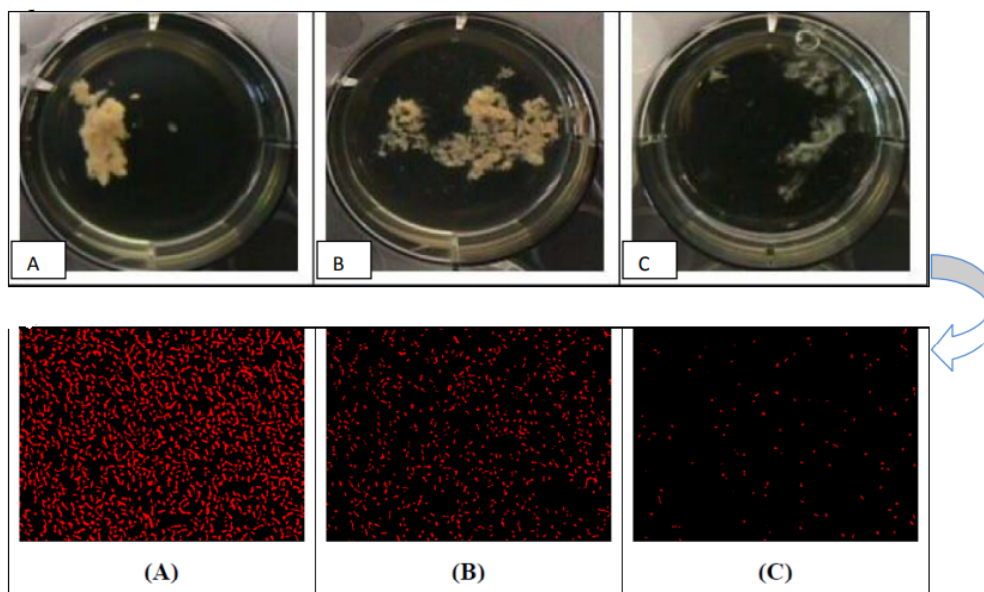


Figura 22: Infecção fágica de células de *Pseudomonas fluorescens*, aderidas à superfície de vidro a 26°C. (A- 0 minuto, B – 90 minutos, C – 200 minutos). Fonte: Adaptado de Silankorva 2004

Em 2008 Silankorva e colaboradores realizaram um outro estudo, onde os resultados corroboram com os dados apresentados por Silankorva em 2004. O trabalho teve por objetivo a realização de experimentos com a cepa de *P. fluorescens* isolada de biofilme formado em teteira de aço inox, em uma indústria de laticínios. A eficácia da fagoterapia foi analisada utilizando fagos T7 em biofilmes de condições estáticas e dinâmicas e também nos biofilmes novos e velhos. A concentração de fagos aplicada foi 10^7 UFP/ml. Como resultado obtiveram uma redução mais rápida em biofilmes mais novos, apresentando uma redução celular máxima dentro de 4 h para biofilmes formados entre 24 e 72 h. Já para biofilmes mais velhos, formados entre 120 e 168 h, o processo de redução foi mais lento, devido ao fato das células já estarem na fase estacionária atrasando o processo de lise celular e também a replicação viral. Os trabalhos demonstraram o potencial do fago T7 como agente de controle de biofilmes, sendo que em todas as condições testadas ocorreu uma redução de 3-5 unidades logarítmicas da contagem de células viáveis. Mas a erradicação completa não foi atingida em nenhum dos estudos.

Em 2006 Curtin & Donlan analisaram a possibilidade de utilização de fagos em cateteres para prevenir a formação de biofilmes por *S. epidermidis* e *S. aureus*. O objetivo foi avaliar em sistemas *in vitro* se um pré-tratamento de um cateter de hidrogel, com fagos, poderia prevenir ou reduzir a formação de biofilme. Como

resposta estes autores obtiveram uma redução do biofilme em cateter revestido com hidrogel significativa após 24 h de infecção, sugerindo assim que os fagos podem ser utilizados para reduzir o crescimento de cepas de estafilococos crescidas em biofilmes. No entanto, a capacidade dos fagos de infectar e lisar células em biofilmes não foi avaliada, pois o biofilme de *S. epidermidis* ocorre em duas fases. Na primeira fase ocorre a adesão das células bacterianas à superfície, seguida pelo seu acúmulo e múltiplas camadas de bactérias formando o glicocálice (Gotz, 2002).

A utilização de endolisinas de fagos (endopeptidase e amidase) é outro tipo de aplicação para controle microbiológico de biofilmes de *S. aureus*, pois estas são enzimas hidrolases da parede celular bacteriana. Em 2006, Sass & Bierbaum clonaram o gene que codifica as endolisinas 11 e 12, onde foram produzidas e testadas em microplacas para avaliar a capacidade lítica. Estas enzimas apresentam dois domínios com funções distintas, um domínio catalítico e um domínio de ligação à parede celular. Segundo os resultados obtidos, apenas a endolisina 11 foi eficaz na redução do biofilme constituindo-se em uma estratégia promissora para combater *S. aureus* nas infecções hospitalares mediadas por biofilmes. A endolisina 12 não apresentou nenhuma atividade hidrolítica em biofilmes. Outro ponto a ser ressaltado em relação a utilização das enzimas em relação aos antibióticos, é seu espectro de ação, pois possuem a mesma especificidade do fago a qual ela deriva, já os antibióticos apresentam um espectro de ação muito amplo não distinguindo as bactérias comensais das patogênicas (Dancer, 2004).

5.3 Bacteriófagos como controle microbiológico no meio ambiente

Aproximadamente 1,7 milhões de mortes anuais são registradas no mundo devido a água contaminada por diversos microrganismos patogênicos e água insalubre sem saneamento. A qualidade da água é uma preocupação pública mundial, devido ao uso inadequado de água potável e suas fontes, principalmente em países em desenvolvimento. O índice de poluição das águas tem-se elevado

devido ao aumento populacional e, conseqüentemente, o crescimento desordenado das cidades em que o despejo incorreto de esgotos industriais e domésticos tem aumentado. Estes aspectos, além de aumentarem a dificuldade de tratamento, aumentam também doenças transmissíveis por fontes de águas contaminadas como a cólera, diarreia infecciosa, etc. (Craun et al., 2005).

A potabilidade da água é avaliada através de microrganismos indicadores como os coliformes fecais, *E. coli* e *Enterococcus* (Poullis et al., 2005). Mas segundo pesquisadores, as bactérias não são indicadores confiáveis e os vírus apresentam maior resistência tanto em águas salgadas, doces e em águas em tratamento (Jofre et al., 1995). Em vez da utilização de vírus patogênicos para bioindicadores da qualidade das águas, os peritos da união Europeia recomendaram a pesquisa de bacteriófagos como bioindicadores, pois às técnicas de detecção de vírus patogênicos são dispendiosas, complexas e demoradas. Para muitas destas espécies virais não é possível aprofundar o diagnóstico de rotina para a identificação de amostras diferentes de uma mesma espécie e, além disso, alguns vírus patogênicos podem apresentar distribuição sazonal o que dificultaria sua identificação ao longo de todas as estações do ano (Espinosa et al., 2009).

Segundo Colford et al., (2007), um bom indicador fecal deve ser de fácil e rápida detecção, deve estar sempre presente quando o patógeno associado estiver, as características de crescimento e persistência de ambos devem ser semelhantes, o número do indicador deve estar presente na fonte de poluição correlacionando-se ao do patógeno, deve ser resistente ao ambiente e aos desinfetantes. Um ponto principal e crucial a ser alcançado é novas rotas e técnicas de tratamento para poupar o uso das fontes naturais e tratar o esgoto para sua reutilização, sem causar danos à saúde do homem. Há vários pontos que indicam que os bacteriófagos podem ser bons indicadores de contaminação fecal, pois apresentam uma sobrevivência no ambiente por longos períodos e a tolerância às mudanças das condições ambientais, assim como a sua morfologia, tamanho, estrutura e composição, semelhantes aos vírus entéricos na água. Outro ponto favorável é que os métodos utilizados para a sua detecção são mais rápidos e baratos. Assim, os colifagos apresentam uma estrita correlação com as bactérias coliformes, sendo os bacteriófagos mais utilizados como indicadores da qualidade da água.

Em duas praias nas áreas de Barcelona, Livina e colaboradores em 2005 avaliaram a presença dos bacteriófagos, e os resultados obtidos confirmaram a tese de que podem atuar como bons indicadores de contaminação fecal, pois houve a presença de colifagos em todas as amostras avaliadas.

A transmissão do *vibrio cholerae* foi estudada por Nelson *et al* (2008), onde houve a infecção de fagos líticos em águas. Como resultado, estes autores verificaram que os fagos exercem um impacto negativo sobre a colonização nas águas e no homem. Esse agente é de grande preocupação, pois é responsável pela causa de morte em crianças menores de 5 anos a nível mundial, além de atingir vários milhões de casos por ano na Ásia e na África (Bryce *et al* 2005). Segundo Jensen *et al* (2006), os surtos de cólera somente podem ser limitados com bacteriófagos líticos, matando as bactérias presentes nos reservatórios e em indivíduos infectados.

Um estudo de comparação foi apresentado por Skraber e colaboradores em 2004, onde o objetivo foi a comparação entre coliformes e colifagos como ferramentas para avaliação da contaminação viral da água do rio de Mosela (Alemanha). Para a realização do trabalho foram utilizados três indicadores bacterianos de poluição fecal (coliformes termotolerantes, enterococos e esporos de anaeróbio sulfito redutores) com três bacteriófagos (colifagos somáticos que são um grupo heterogêneo de vírus com morfologia variada e boa resistência ambiental, bacteriófagos específicos que se constituem em um grupo não homogêneo do ponto de vista morfológico com hospedeiros específicos e fagos de *B. fragilis*), com o intuito de definir quais indicadores seriam os mais adequados para avaliar a contaminação viral da água. Como resultados, estes pesquisadores observaram que os coliformes termotolerantes e colifagos somáticos representaram a maioria, indicando a poluição fecal, e que os coliformes termotolerantes foram mais sensíveis a variações de temperatura do que os fagos. Neste mesmo estudo houve também a avaliação dos vírus patogênicos, *Enterovirus* e *Norovirus*, em 90 amostras de 1L de água, no qual 38% foram positivas para *Enterovirus* e 27% para *Norovirus*. As amostras positivas com os vírus patogênicos foram testadas com a presença de colifagos, onde os resultados mostraram que houve uma redução do número de amostras de vírus com a diminuição de colifagos. Os autores

ressaltaram a relação entre as concentrações de indicadores e contaminação viral, mas esta tese deve ser estudada pela biologia molecular. Como conclusão final deste trabalho, os autores avaliaram que os bacteriófagos podem ser tanto indicadores de contaminação bacteriana quanto de vírus entéricos patogênicos.

Reis em 2004, estudou em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) a aplicação de fagos líticos para o controle biológico bacteriano e tratamento de afluentes. Neste trabalho, Reis (2004) utilizou fagos mutantes capazes de realizar apenas o ciclo lítico, com o objetivo na redução de unidades formadoras de colônias de bactérias potencialmente patogênicas. Esses fagos apresentam a capacidade de infectar *S. aureus*. Os resultados demonstraram que, em comparação a um fago não mutante, fagos lítico mutantes reduziram potencialmente o número de células viáveis de *S. aureus*, comprovando que podem ser utilizados nas ETEs para diminuir a carga bacteriana contaminante, como ilustra o gráfico da Fig. 23.

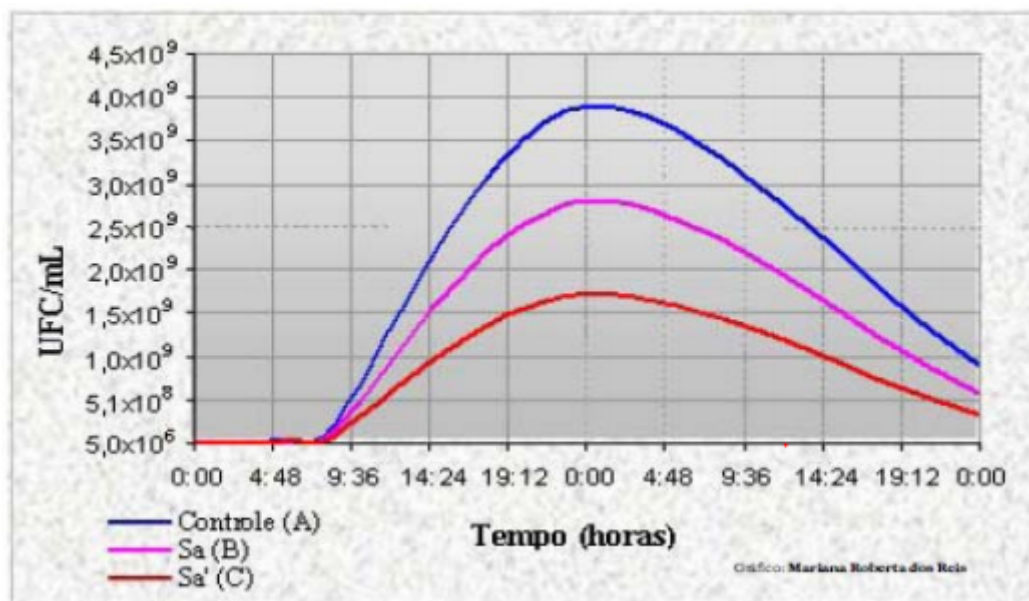


Fig. 23: Curva de avaliação de morte celular bacteriana de *S. aureus*. (A) Curva contendo apenas *S. aureus*, (B) Curva contendo *S. aureus* e fago não mutante. (C) curva contendo fago mutante lítico e *S. aureus*. Fonte: Reis, 2004

5.4 Aplicações de bacteriófagos na antibioticoterapia

O desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos é algo crescente, tornando este um grande problema de saúde pública atingindo níveis

preocupantes (Coates *et al*, 2002). Cerca de 25% das cepas de *Streptococcus pneumoniae* apresentam resistência à penicilina, ao qual era altamente sensível. Nos EUA aproximadamente 70% das infecções hospitalares bacterianas apresentam resistência a um ou mais antibióticos e cerca de 50% das cepas de *S. aureus* isolados no Japão são multirresistentes. Para melhorar a potência e o espectro de ação, as resoluções de curto prazo permitem a modificação das drogas utilizadas. Nos EUA os impactos econômicos são de aproximadamente 24 bilhões por ano devido às infecções resistentes aos antibióticos (Hall, 2004).

Em 2006 e 2007, Yacoby e colaboradores apresentaram um estudo de uma nova aplicação de fagos filamentosos M13, que poderiam inibir parcialmente a multiplicação de bactérias como o *S. aureus*. O estudo sugeriu utilizar o bacteriófago como uma plataforma para carregamento de drogas para a bactéria alvo. Os estudos apresentaram como objetivo a elaboração de uma conjugação química baseada na ligação de drogas hidrofóbicas como o cloranfenicol, que apresenta características como a facilidade de conjugação ao fago através de antibióticos aminoglicosídeos. A capacidade da droga alvo foi testada para inibir o crescimento de bactérias patogênicas mais comuns, como *S. aureus* resistente à meticilina, *S. pyogenes* e *E coli*, em que seu transporte se deu através de nanopartículas de fagos. Como resultado no trabalho de Yacoby *et al.*, (2006), a conjugação de apenas cloranfenicol e fago não se mostrou eficaz, pois houve a precipitação dos bacteriófagos devido a característica hidrofóbica da droga, com isso houve apenas um retardamento do crescimento da bactéria. Mas os resultados do trabalho de Yacoby *et al.*, (2007) foram mais satisfatórios levando a inibição do crescimento bacteriano, onde um novo modelo de conjugação química foi proposto, adicionando um aminoglicosídeo (Neomicina) à plataforma causando a solvatação de materiais hidrofóbicos. Como conclusão final, os autores afirmaram que a genômica de bactérias e fagos apresentam uma nova alternativa para a melhoria da antibioticoterapia.

O experimento realizado por Yacoby e colaboradores em 2006 está ilustrado na Figura 24a. Em (1) está representado a preparação da pró-droga (Cloranfenicol), (2) Conjugação da pró-droga e fago, em (3) os fagos transportam a droga para o interior das células alvo e (4) a liberação da droga potencializando o efeito através

da internalização do antibiótico . A Figura 24b apresenta a adição de neomicina ao fago M13, para potencializar a ação do cloranfenicol.

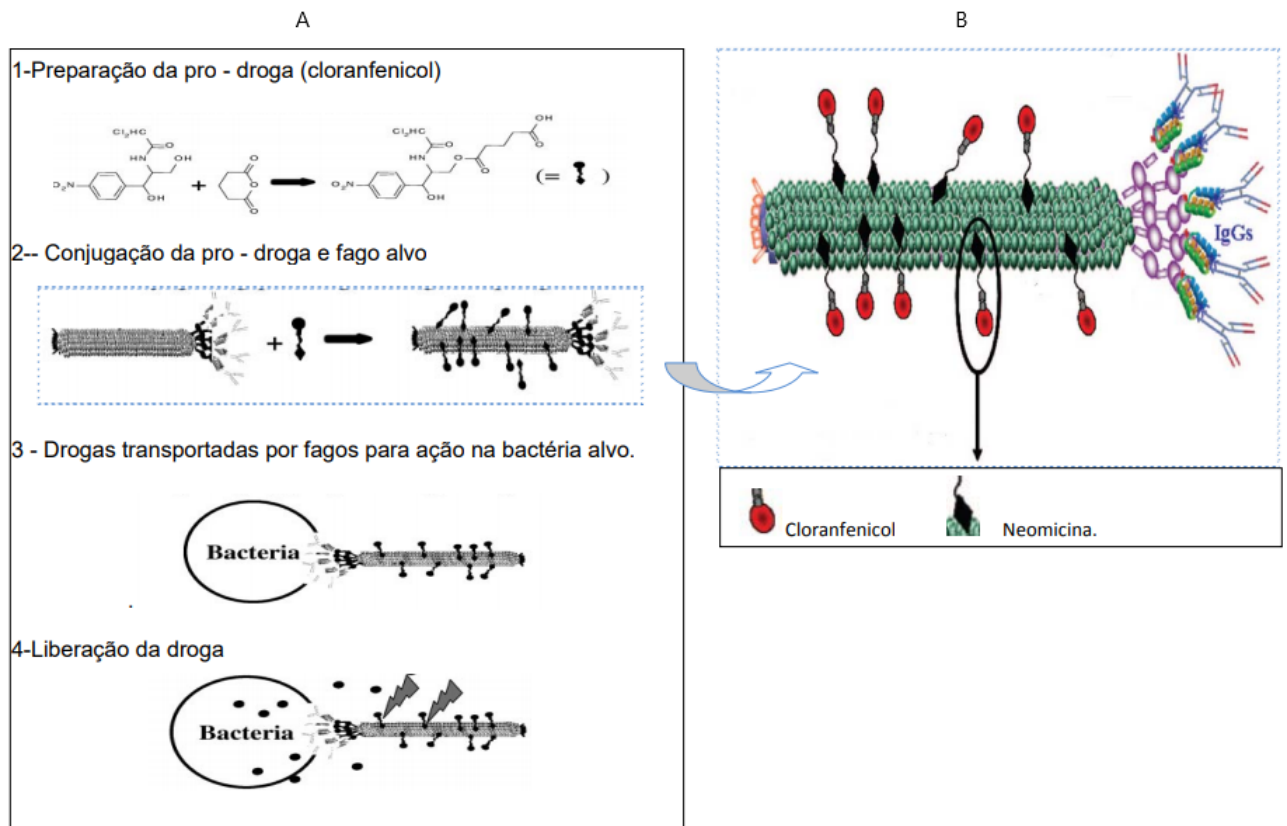


Figura 24a: Conjugação química e liberação da droga. Fonte: Yacoby et al em 2006

Figura 24b: Fago filamentosso M13 e conjugação da pró droga cloranfenicol e neomicina. Fonte: Yacoby et al em 2007

A resposta SOS, exclusiva de células procarióticas, têm a função de responder a danos na molécula de DNA cujo antibiótico danificou, de forma a permitir a sobrevivência do organismo, tornando desta forma a bactéria resistente à droga. Lu & Collins (2009) projetaram um bacteriófago para codificar proteínas alvo com a finalidade de melhorar a morte bacteriana por antibióticos. LexA3 é uma proteína repressora da atividade de resposta SOS, levando a uma potencialização da ação da droga e conseqüentemente a morte bacteriana. Para a realização do estudo o fago utilizado foi o M13, projetado para expressar o gene LexA3, onde a Figura 25 está representado o mecanismo de inibição da resposta SOS. Em (1) está representado o bacteriófago M13 que expressa o gene da proteína LexA3, em (2) o gene codifica a proteína LexA3, a proteína interfere no sistema SOS (3), que inibe o reparo do DNA (4). As partículas do antibiótico agem no DNA bacteriano (5), e

consegue manter sua atividade provocando a morte celular (6), pois o sistema de reparo foi inibido. Os autores obtiveram como conclusão que a combinação de fagoterapia funciona como um adjuvante que facilita a ação da droga no DNA da célula hospedeira.

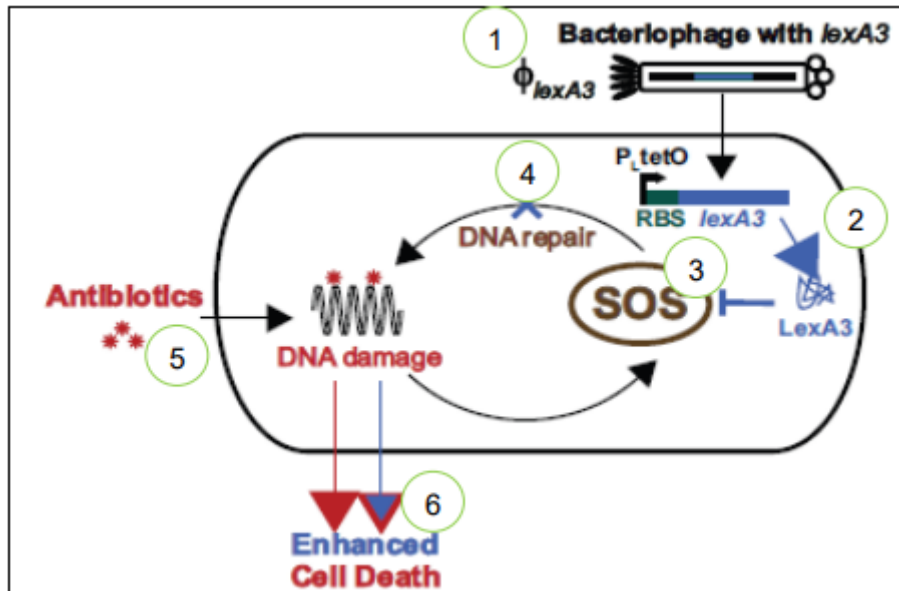


Figura 25: Desenho reacional do processo de inibição da resposta SOS pelo fago M13. Fonte: Lua & Collins (2009)

A multirresistência de bactérias às drogas para tratamento de tuberculose, principalmente da rifampicina e isoniazida, é uma preocupação da Organização Mundial de Saúde. Para detectar a resistência às drogas são utilizados métodos fenotípicos, porém são técnicas demoradas. Com isso, tem-se empregado técnicas de biologia molecular para avaliar mutações que induzem a resistência à rifampicina, mas em âmbito de recursos limitados estes testes não foram implementados (MCNerney *et al.*, 2000). Com isso se faz necessário métodos mais simples, baratos e rápidos para investigar a suscetibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina. Para países em desenvolvimento Traore *et al* (2007) desenvolveram um método simples a ser aplicado. Para o estudo utilizaram um micobacteriofago, no qual o sucesso da replicação do fago indicaria a presença de micobactérias viáveis e resistentes. A droga interrompe a replicação do fago impedindo a síntese de RNAm bacteriano, demonstrando que as bactérias são sensíveis às drogas. Para a detecção de cepas de *M. tuberculosis* e a resistência à

rifampicina, os autores utilizaram dois métodos com o propósito de comparar a eficácia com fagos e o método atualmente utilizado para a detecção das cepas (BACTEC 460). Os resultados obtidos demonstraram que das 149 amostras testadas na concentração de 2mcg/ml de rifampicina, 91 foram susceptíveis e 58 resistentes no ensaio com fagos, e no BACTEC 460, 35 amostras foram resistentes. Mas com o aumento da concentração da droga para 4 e 10 mcg/ml o número de resistentes foi de 39 no ensaio com o fago comparado com 35 resistentes no Bactec 460, como mostra a tabela a seguir.

Assay	Drug concentration µg/ml	Susceptible Isolates	Resistant isolates
BACTEC 460	2	114	35*
Phage	2	91	58
Phage	4	110	39
Phage	10	110	39

Tabela 2: Suscetibilidade dos isolados no teste Bactec 460 e no fago ensaio.*Os 35 isolados resistente no BACTEC 460, também foram resistentes pelo fago ensaio em todas as concentrações. Fonte: Adaptado de Traore et al., 2007

A incapacidade do BACTEC 460 em detectar quatro isolados resistentes à rifampicina é preocupante, pois o teste constitui-se no padrão ouro utilizado. Os autores concluem que o BACTEC 460 pode apresentar resultados falsos negativos e que a utilização de 52 fagos para detectar cepas resistentes pode ser mais eficaz, pois apresentou maior sensibilidade e especificidade.

6. Mecanismos de resistência x fagos

Alguns aspectos na terapia fágica devem ser analisados cautelosamente apesar dos potenciais benefícios descritos. Dentre eles ressalta-se a imunogenicidade do fago, eficácia e identificação da célula hospedeira, especificidade de hospedeiro, liberação de toxinas e concentração de partículas virais (Hagens et al., 2004, Merril et al., 2003).

Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição, são proteínas encontradas em bactérias que reconhecem uma curta sequência de DNA específica e clivam a dupla fita em um ponto específico. Estas enzimas fazem parte de um sistema de defesa contra DNA de fagos, sendo o mecanismo mais antigo que as bactérias utilizam para resistir à infecção pelos bacteriófagos. Como forma de resposta, os fagos têm desenvolvido estratégias para evitar a clivagem no DNA ocasionado por estas enzimas, pois quando o DNA do fago é metilado este fica protegido contra as enzimas, outra forma é a falta de reconhecimento da endonuclease devido a mutações pontuais no genoma (Pingoud et al., 2005).

A produção de matriz extracelular e produção de inibidores competitivos se caracterizam como bloqueadores dos receptores dos fagos, onde as bactérias desenvolvem diversas barreiras para impedir a adsorção do fago (Labrie et al., 2010). A Figura 26 mostra de forma esquemática os mecanismos de resistência das bactérias e o contra-ataque dos fagos para driblar cada mecanismo.

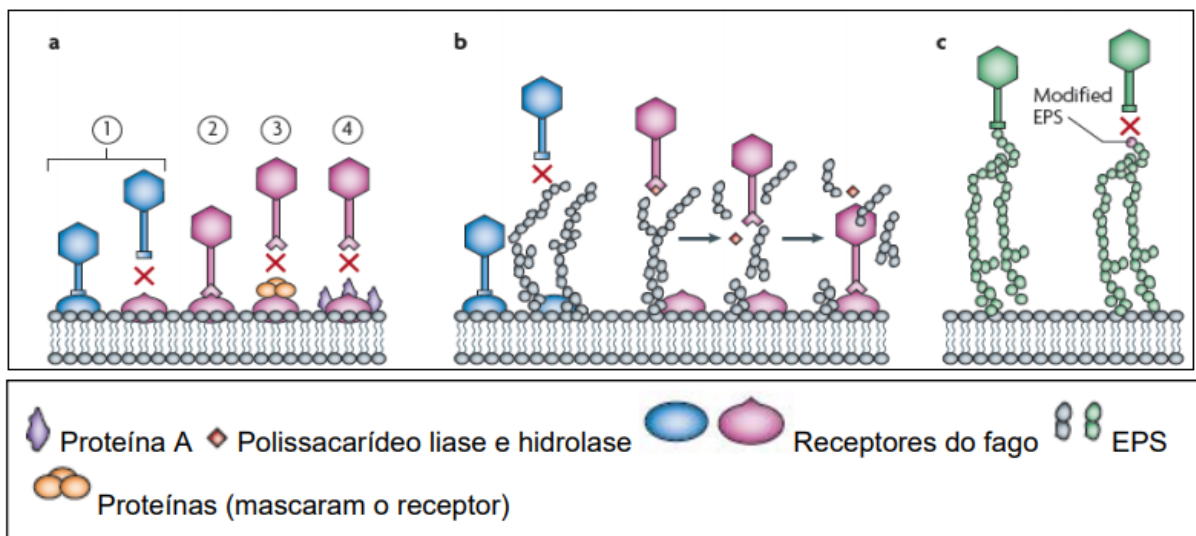


Figura 26: Forma esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana. A – 1 e 2) modificação de receptores da superfície celular e adaptação do fago e reconhecimento do receptor. 3) Produção de proteínas que mascaram o receptor do fago. 4) Produção de proteína A. B) Produção de EPS(polissacarídeos extracelulares) e bloqueio dos fagos, produção de polissacarídeo liase e hidrolase e ligação no receptor da célula. C) os fagos podem reconhecer antígeno K modificado. Fonte: Labrie et al., 2010

A produção de proteínas que bloqueiam a entrada do DNA do fago é outro exemplo de mecanismo utilizado pelas bactérias para a prevenção da injeção do material genético do fago no interior da célula bacteriana, desta forma conferindo

imunidade a fagos específicos. A infecção de bactérias gram-negativas pelo colifago T4 é um exemplo disto. A proteína Imm impede a transferência do DNA do fago para o citoplasma bacteriano alterando a conformação do local da injeção, mas sozinha não confere imunidade completa, por isso é associada à proteína de membrana Sp que inibe a atividade da lisozima de T4, que impede a degradação do peptidoglicano e posterior injeção do DNA do fago (Figura 27) (Labrie et al., 2010).

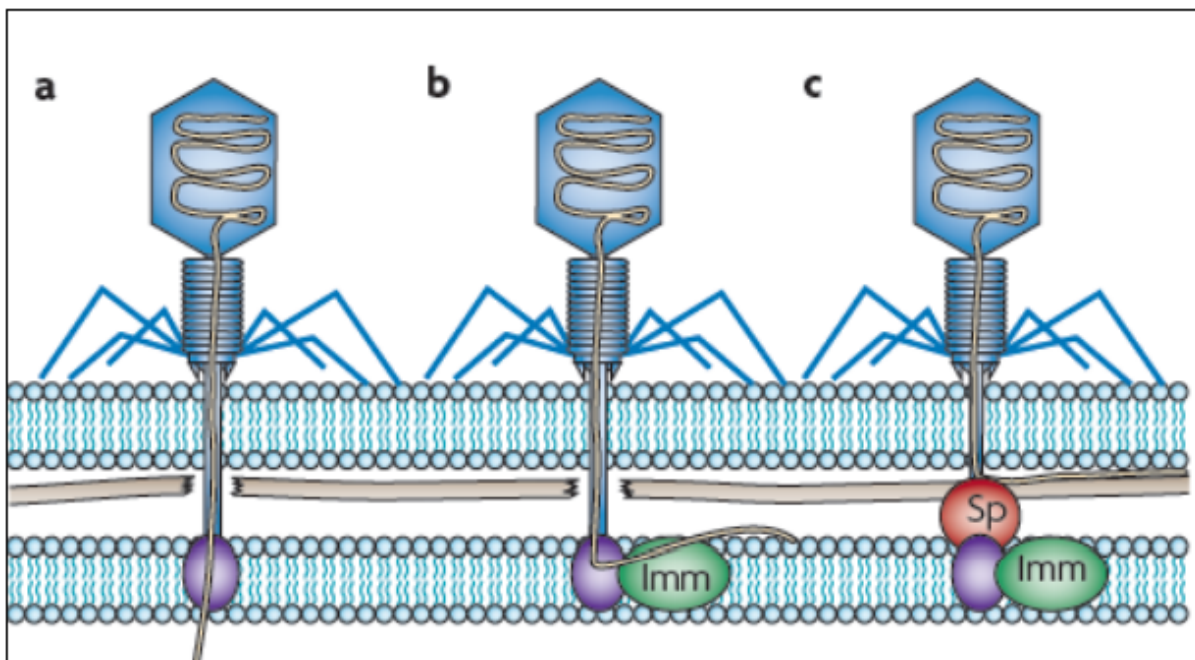


Figura 27: Forma esquemática de prevenção da injeção do DNA do fago. A) Infecção normal de fago T4. B) Produção da Proteína Imm que bloqueia a translocação de DNA para o citoplasma. C) Proteína Sp inibe degradação dos blocos de peptidoglicano deixando o DNA entre a camada de peptidoglicano e a membrana externa. Fonte: Labrie et al., 2010

Desta forma, muitas barreiras de resistência aos fagos podem ser descobertas assim como muitos mecanismos deste vírus para a continuidade de sua replicação (Labrie et al., 2010). Por exemplo, outro mecanismo de resistência foi analisado por Zegans et al. (2009), onde hospedeiros com uma sequência de DNA CRISPR são capazes de bloquear plasmídeos e DNA do Vírus impedindo sua multiplicação. Mas podem ocorrer perdas dessa resistência devido a mutações nestas regiões do genoma.

7. Vantagens, desvantagens, mercado e perspectivas futuras

O interesse pela utilização de bacteriófagos é crescente na área tecnológica, devido à grande procura dos consumidores por produtos mais naturais, ou seja, sem aplicações de antibióticos. Os campos de aplicação dos bacteriófagos para combater bactérias patogênicas são diversos, nas áreas de saúde, alimentos e ambiental. Um exemplo de produto de uso comercial aprovado pelo U.S. *Environmental Protection Agency* é o Agriphage, usado para o controle de bactéria patogênica em ambientes. No setor alimentício, em 2006 o FDA aprovou o uso do bacteriófago P100 (Listex P100) para o controle de *L. monocytogenes* em carnes e queijos. Composta por seis bacteriófagos, o Listex P100 é uma cultura de microrganismos específicos para o patógeno, podendo ser usada na produção de alimentos como um aditivo natural do processo. O Listex ganhou um prêmio na Europa em novembro de 2007 como ingrediente alimentar, por ser a melhor inovação na indústria (García *et al.*, 2008).

Um trabalho de pesquisa para avaliar a eficácia do agente antimicrobiano Litex P100 para o controle de *L. monocytogenes* foi realizado em Salvador-BA. O bacteriófago foi introduzido nos alimentos prontos, nas embalagens, superfícies onde os alimentos são processados e em dispositivos usados para armazenamento e transporte dos insumos para o combate dessa bactéria. Os resultados indicaram que o P100 pode fornecer uma medida efetiva e segura para o controle da contaminação de *L. monocytogenes* em alimentos e equipamentos de produção (Ramos, 2009).

Um teste sanguíneo para detectar infecção por *S. aureus* foi aprovado pelo FDA, que recorre a fagos marcados com fluoróforo e por expressão da luciferase, esta última transmitida por fagos através da lisogenia. Na agricultura houve o desenvolvimento de fagos contra a *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae* – Omnilytics Agriphage. Outra aplicação é na agropecuária, que desenvolveu fagos contra bactérias que infectam o gado, como *Campylobacter*, *E. coli* e *Salmonella*. (Golkar *et al*, 2014; Ly-Chatain, 2014; Lu TK & Koeris MS, 2011)

Destaca-se ainda o crescente interesse no tratamento de águas residuárias, pois devido a especificidade apresentada pelos bacteriófagos haverá apenas a eliminação de microrganismos patogénicos sem impacto nos benéficos. Um dos exemplos de bactéria-alvo dos fagos nesta situação é a *E. coli*, considerada um marcador de contaminação fecal. (Potera, 2013; Maal et al., 2015)

Verifica-se também o potencial de aplicação de bacteriófagos no combate aos biofilmes que contaminam muitos biomateriais utilizados em instrumentos médicos como *pacemakers*, válvulas cardíacas, algalias, próteses articulares, cateteres de diálise e hemodiálise e tubos de intubação (Parasion et al., 2014).

Atualmente existem várias companhias internacionais produzindo fagos ou produtos relacionados, entre as quais a Innophage®, sediada no Porto - Portugal, que se especializou em infeções bacterianas, assim como produtos cosméticos e ambientais. A Technophage, também situada em Portugal, tem 4 produtos desta área em desenvolvimento, contudo não há informação disponível sobre os estudos destas empresas (Housby & Mann, 2009).

Atualmente, a Intralytix, uma empresa norte americana direcionada para a indústria alimentar, para a saúde humana e veterinária, bem como para as questões ambientais, desenvolveu várias preparações fágicas utilizadas no controlo e prevenção de bactérias responsáveis por contaminar os alimentos, nomeadamente: i) ListShield™, para o controlo da listeriose, aceite pela FDA em Agosto de 2006); ii) EcoShield™, utilizada na prevenção de contaminações dos alimentos por *Escherichia coli* e a iii) SalmoFresh™, que reduz contaminações nos alimentos provocadas por *Salmonella* e no corrente ano foi considerada uma substância “generally recognized as safe” (GRAS) pela FDA (Atterbury, 2009; Balogh et al., 2010; Hagens e Loessner, 2010; Intralytix, 2013).

Segundo apresentado na Revista Istoé, 2019, uma *start-up* na França, Pherecydes Pharma, vem trabalhando há dez anos em fagos capazes de acabar com o *S. aureus*, *P. aeruginosa*, e *E. coli*. Nos Estados Unidos, a AmpliPhi Biosciences se lançou neste setor. Mas, no momento, não há grandes laboratórios envolvidos, porque os fagos não são patenteáveis, ao contrário dos antibióticos. Ainda, segundo a revista, em 2016 a Agência Nacional Francesa de Segurança de Medicamentos (ANSM) admitiu vinte tratamentos com fagos, usados como último

recurso. Além disso, a França, os Estados Unidos e a Bélgica estão se unindo lentamente ao movimento, devido aos fagos representam uma enorme esperança contra infecções resistentes aos antibióticos, que está cada vez mais frequente.

No Brasil verificou-se que alguns laboratórios estão em processo de desenvolvimento de produtos com bacteriófagos. O laboratório de Biofilme e Bacteriófagos da Uniso (Sorocaba, SP), o Phage Lab, isolou bacteriófagos a partir de fontes ambientais sob orientação do Prof. Dr. Victor Balcão, visando o desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos inovadores. O bacteriófago isolado foi o fago JG004, que ataca a *P. aeruginosa*, causadora de problemas no aparelho respiratório (Profeta, 2016). A produção deste vírus que mata as bactérias ainda é escassa no Brasil, mas empresas que atuam na área da biotecnologia, como a Neopropecta de Florianópolis-SC, realizam estudos acerca dos bacteriófagos e o seu largo mercado (Neopropecta, 2020).

Uma outra *startup*, aqui no Brasil, é a Bioprocess Improvement localizada em Campinas, SP. Essa *startup* apresenta um recurso da Fapesp na chamada pipe fase 1, onde desenvolvem uma solução em bacteriófagos para controle da contaminação de fermentação alcoólica industrial. A produção ainda é em escala piloto, mas com visionamento de expansão. Atualmente possuem a maior coleção de bacteriófagos para o controle da fermentação alcoólica do mundo, com um pedido de patente depositado no Brasil sobre o tema (Bioprocess Improvement, 2018).

Com a tendência de novas pesquisas e o aumento de empresas biotecnológicas focando no tema é possível verificar que as perspectivas futuras para a aplicação dos fagos em diversas áreas, assim como na conservação de alimentos, são muito favoráveis. Esse crescente interesse é devido às suas favoráveis vantagens como ser eficaz tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, incluindo os microrganismos com multirresistências. Ao contrário dos antibióticos, que persistem no ambiente após o seu uso, os fagos são destruídos após a cura da infecção. Além disso, apresentam poucos efeitos secundários, pois não infectam células humanas nem células animais, sendo assim seguros para a utilização clínica. E em caso de alergia aos antimicrobianos, os bacteriófagos podem ser úteis. Outra vantagem de grande interesse é na questão monetária, pois comparando o custo dos antibióticos com o custo dos fagos, estes

últimos, são cerca de 50% mais acessíveis (Verbeken *et al*, 2014; Jassim *et al*, 2014; Verbekenv *et al*, 2014; Ghannad *et al*, 2012).

Apesar destas vantagens excepcionais, alguns autores têm desenvolvido argumentos questionando a eficácia de bacteriófagos como agentes antimicrobianos (Joerger, 2003; Sklar & Joerger 2001). A transdução dos bacteriófagos pode transferir características indesejáveis, tais como genes virulentos, de um organismo para outro, e a conversão lisogênica pode produzir células bacterianas que não são mais suscetíveis a ataques. Bacteriófagos por si só podem sofrer mutações de bacteriófagos líticos virulentos para bacteriófagos temperados, que geralmente formam uma associação não lítica com as bactérias hospedeiras, resultando em lise de apenas uma pequena proporção da população (Ackermann *et al*, 1988). Portanto, para serem usados em qualquer aplicação de biocontrole, os bacteriófagos devem ser cuidadosamente caracterizados para determinar se eles podem executar transdução generalizada, ou se eles carregam qualquer gene de virulência que poderia ser expresso no hospedeiro antes da morte (Hudson *et al*, 2005).

Uma outra preocupação é em relação às condições ambientais, pois estas podem alterar as interações entre o fago e o hospedeiro, devido os dados sobre fagos serem extrapolados de *in vitro* para *in vivo*, pois uma bactéria produzida em condições laboratoriais não irá obrigatoriamente comportar-se da mesma forma no corpo humano, podendo neste alterar-se de fago lítico para fago lisogénico (Jassim *et al*, 2014; Ghannad *et al*, 2012).

8. Conclusão

Devido ao seu enorme potencial, os fagos atualmente são reconhecidos como grandes ferramentas biológicas em várias áreas. Difundidas pelo mundo, as técnicas de conservação de alimentos utilizando bacteriófagos representam uma vertente ambientalmente amigável, tendo sua origem quase sempre encontrada em solos e água, são de fácil manipulação e pouco invasivas aos alimentos, se tornando uma alternativa para as abordagens tradicionais. Os estudos avaliados aqui revelaram a eficácia desta abordagem na redução de microrganismos

patogênicos em alimentos, e também na redução de biofilmes, utilizando não só fagos líticos para realizar infecção da célula hospedeira, como as endolisinas produzidas pelos fagos. Como controle microbiológico do ambiente os artigos apresentaram várias aplicações, como a melhoria de indicadores de contaminação fecal, que de acordo com os resultados os fagos apresentaram melhor eficácia para avaliação de contaminação bacteriana e viral em água. Os fagos também foram avaliados como ferramentas para melhorar a ação de drogas antimicrobianas, através de terapia combinada e expressão de enzimas específicas para aumentar a atividade do fármaco. De uma maneira geral os fagos são ferramentas promissoras, mas muitos estudos devem ser realizados, pois necessitam de condições adequadas para manutenção de sua replicação na célula alvo. Os mecanismos de resistência bacterianos ainda é o ponto crucial para o insucesso da fagoterapia, assim como o estudo dos mecanismos dos fagos para resistir às células hospedeiras. Outros aspectos que devem ser considerados são a transferência de genes de resistência a antibióticos para outras linhagens de hospedeiros, assim como a indução de fatores de virulência como a verotoxina em *Escherichia coli*, influência na imunidade inata quando aplicada a terapia humana e problemas ambientais como o desequilíbrio ecológico bacteriano quando utilizados no meio ambiente.

Contudo ainda é necessário que haja uma aplicação mais abrangente dos bacteriófagos para que permita uma avaliação robusta do seu potencial de biocontrole. Além da aplicação mais extensa de hospedeiros para os fagos, verificando a repercussão destes em atividades complementares, por exemplo em sinergismo com agentes antibacterianos já difundidos no mercado.

9. BIBLIOGRAFIA

- Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Szwajcer Dey, E. & Novik, G.I. (2010). Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. Polish Journal of Microbiology 59:3, 145-155.
- Chatterjee, S.N. & Chaudhuri, C. (2012). Outer Membrane Vesicles of Bacteria. Gram-Negative Bacteria: the cell Membranes. SpringerBriefs in Microbiology 2. Doi: 10.1007/978-3-642-30526-9_2
- Chaturongakul, S. & Ounjai, P. (2014). Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology 5, art.442.
- Leiman, P.G.; Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F. & Rossmann, M.G. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. Cellular and Molecular Life Sciences 60, 2356-2370. Doi: 10.1007/s00018-003-3072-1.
- Chapot-Chartier, M.P. (2014). Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. Frontiers in Microbiology. Doi: 10.3389.
- Choi, Y. Shin, H. Lee, J. & Ryu, S. (2013). Identification and Characterization of a Novel Flagellum-Dependent Salmonella-Infecting Bacteriophage, iEPS5. Microbiology 79:16, 4829-4837
- Farrag, S A and Marth EH: Behavior of *Listeria monocytogenes* When Incubated Together with *Pseudomonas* Species in Tryptose Broth at 7-Degrees-C and 13- Degrees-C. Journal of Food Protection 1989
- Hendrix, R W. Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol. 2002
- Hanlon, G W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. Int J Antimicrob Agents. 2007
- Simões M, Pereira M O and Vieira, M J: Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. Water Research 2005
- Wagenaar, J A; Van Bergen, MA; Mueller, M A; Wassenaar, T M and Carlton, R M. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol 2005
- Ackermann H W. 5500 phages examined in the electron microscope. Arch Virol. 2007
- Raya, R R; Varey, P; Oot, R A; Dyen, M R; Callaway, T R; Edrington, T S; Kutter EM, and Brabban AD: Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. Appl Environ Microbiol 2006

Breitbart, M; Wegley, L; Leeds, S; Schoenfeld, T and Rohwer, F. Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol.* 2004

Caroli, G; Armani, G; Levre, E and Jefferson, T O. Finding of *E. coli* phage in urinary tract infections. *Ann Sclavo.* 1980.

Bachrach, G; Leizerovici-Zigmond, M; Zlotkin, A; Naor, R and Steinberg, D. (2003) Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Appl Microbiol.* 2003.

Davis, C; Silveira, N F A and Fleet, G H. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol.* 1985.

Gantzer, CH; Henny, J and Schwaetzbrod, L. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages in human feces. *Int J Hyg Environ Health.* 2002.

Lucema, F; Ribas, F; Duran, A E; Skrabber, S; Gantzer, C; Campos, C; Moron, A; Calderón, E and Jofre, J. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in ground water in different geographical areas. *J Appl Microbiol.* 2006.

Lin, L; Honh, W; Ji, X; Han, J; Huang, L and Wei, Y. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tegchong hot springs in China. *J Basic Microbiol.* 2010.

Frenkel, D and Solomon, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002.

Keller, R and Traub, N. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bactericides phage carrier cultures. *J Gen Virol.* 1974.

Kameyama, L; Fernandez, L; Bermudez, R M; Garcia-Mena, J; Ishida, C; Guarueros, G. Properties of a new coliphage group from human intestinal flora. *Rec Res Develop Virol.* 2001.

Kumari, S; Harjai, K and Chibber S. Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. *Folia Microbiol.* 2010.

Yoon, S S; Barrangou-Pouey, R; Breidt, F J R; Klaenhammer, T R and Fleming, H P. (2002) Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Appl Environ Microbiol.* 2002.

Weinbauer, M. Ecology of procaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2004.

Sawstrom, CH; Lisle, J; ANESIO, A M; PRISCU, J C and LAYBOURN-PARRY, J. Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles.* 2008.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; and Clark, D. P. (2010). *Microbiologia de Brock*, 12a edição. Artmed Editora S/A. Porto Alegre, RS.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; and Clark, D. P. (2008). *Microbiologia de Brock*, 10a edição. Artmed Editora S/A. Porto Alegre, RS.

Petrov et al. Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology Journal*, 7:292, 2010.

Pato, M. L.; Oram M. MU- Like Strong Gyrase Site sequences: Analysis of Properties Required for Promoting Efficient UM DNA Replication. *Journal of Bacteriology*, p. 4575-4584, 2004.

Pal C, Macia M, Oliver A, Schachar I, Buckling A. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450:1079–81. 2007.

Foog, P.C. et al. Bacteriophage Lambda: a Paradigm Revisited. *Journal of Virology*, p.6876 – 6879, 2010.

Chibani-Chennoufi et al. Isolation of Escherichia coli Bacteriophages from the Stool of Pediatric Diarrhea Patients in Bangladesh. *Journal of Bacteriology*, p. 8287– 8294, 2004

Tiemann, B., Depping, R., Gineikiene, E., Kaliniene, L., Nivinskas, R., Ruger, W. (2004). ModA and ModB, Two ADP-Ribosyltransferases Encoded by Bacteriophage T4: Catalytic Properties and Mutation Analysis. *J. Bacteriol.*

Straus S, Scott W, Symmons M, Marvin D. On the structures of filamentous bacteriophage Ff (Fd, F1, M13). *Eur Biophys J*, 37: 521-527, 2008.

Hemminga, M. A. et al. Viruses:incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *Eur Biophys J*, 39: 541-550, 2010.

Shin, G.A., and M. D. Sobsey. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003.

Uminho|2015, Maria ; Ferreira De Sá, Maria José Ferreira de Sá Universidade do Minho Escola de Ciências, [s.l.: s.n.], 2015.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr JG. Bacteriophages therapy. *Antimicrob agents Chemotherapy*, 45 (3): 649-59, 2001.

Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Azeredo J: Real-time quantification of *Pseudomonas fluorescens* cell removal from glass surfaces due to bacteriophage phiS1 application. *Journal of Applied Microbiology*. 2008.

Loc Carrillo, C; Atterbury, R J; El-Shibiny, A; Connerton, P L; Dillon, E and Scott, A, Connerton IF: Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2005, p. 71: 6554-6563.

Puapermpoonsiri, U.; Spencer, J.; Van Der Walle, C.F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009. p.72:26–33

Ackers, M. L., et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis*, 177:1588–1593, 1998.

Vicente, C. et al. Food Reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infections Diseases*. www.CDC.gov/eid. v .16 2010.

Newell, D. G., and C. Fearnley.. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiology*, 69:4343–4351, 2003.

Dworkin J, Blaser MJ Nested DNA inversion as a paradigm of programmed gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 985–990, 1997.

Dupont Claire, Augustin Jean-Christophe. Influence of Stress on Single-Cell Lag Time and Growth Probability for *Listeria monocytogenes* in Half Fraser Broth_ *Applied and Environmental Microbiology*, No. 10, Vol. 75, p. 3069–3076, 2009.

Guenther, S. et al. Virulente Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready- To-Eat- Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p.093-100, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos* 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final* 2006. 74f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYNE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, v.18, n.2, p.262-267, 2007.

BRITO, J.R.; SANTOS, E.M.P.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P. SOUZA, G.N.; CERQUEIRA, M.M.P.O. MARCELA SOTO BELTRAN, J.; CALL, J.E.; LIU, Y.; PROTO-FEET, A.C.S.; LUCHANSKY, J.B. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of

Listeria monocytogenes isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, n.15, p.4954-4961, 2008.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

Atterbury R. J., M. A. P. Van Bergen, F. Ortiz, M. A. et al. Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.*, 73(14): 4543–4549, 2007.

Abuladze T., et al. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 74(20): 6230–6238, 2008

El- Shibiny et al. Enumeration and Diversity of campylobacter and Bacteriophages isolated during Rearing Cycles of Free – Range and Organic Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1259-1266, 2005.

Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, et al. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Pathog.* 2007.

Nechaev S and Severinov K. The Elusive Object of Desire - Interactions of Bacteriophages and Their Hosts. *Curr Opin Microbiol.* Author manuscript; available in PMC 2009.

Kim, J.W et al. Host Ranges of *Listeria monocytogenes* specific Bacteriophages from the Turkey Processing Plant Environment in the United states. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6623-6630. 2008.

Guenther, S. et al. Virulente Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready- To-Eat- Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p.093-100, 2009.

Carlton, R. M, W. H. Noordman, B. Biswas, E. D. de Meester, and M. J.Loessner.. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43:301–312, 2005.

Dogan B, Boor KJ: Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:130-138, 2003.

Jikia, D., N. Chkhaidze, E. Imedashvili, I. et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr 90. *Clin. Exp. Dermatology*, 30:23–26, 2005.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2002

Curtin JJ, Donlan RM. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1268-1275, 2006.

Lu T. K., Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Applied Biological Sciences PNAS*, vol. 104 no. 27 11197–11202, 2007.

Curtin JJ, Donlan RM. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1268-1275, 2006.

Sass P, and Bierbaum G. Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage 11 and 12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Applied Environmental Microbiology*. No. 1, p. 347–352 Vol. 73, 2007.

Dancer, S. J. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis*. 4: 611-619, 2004.

Craun, G. F., R. L. Calderon, and M. F. Craun.. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res*. 15:243–262, 2005.

Poullis, D. A., R. W. Atwell, and S. C. Powell. The characterization of waterborne-disease outbreaks. *Rev. Environ. Health*, N.20 p.141–149, 2005.

Jofre, J., E. Olle, F. Ribas, A. Vidal, and F. Lucena. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiology*, 61:3227–3231, 1995.

Espinosa A.C., et al Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude System. *Environmental Health*, 8:49, 2009.

Colford, J. M., Jr., T. J. Wade, K. C. Schiff, C. C. Wright, J. G. Griffith, S. K. Sandhu, S. Burns, J. Hayes, M. Sobsey, G. Lovelace, and S. B. Weisberg. Water quality indicators and the risk of illness in non-point source impacted recreational waters. *Epidemiology* 18:27–35, 2007.

Llivina L. M, Lucena F., and Jofre J. Enteroviruses and Bacteriophages in Bathing Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, p. 6838–6844, 2005.

Nelson EJ, Chowdhury A, Flynn J, Schild S, Bourassa L, et al. Transmission of *Vibrio cholerae* Is Antagonized by Lytic Phage and Entry into the Aquatic Environment. *PLoS Pathog*, 2008.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO. Estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365: 1147–1152, 2005

Jensen M. A, et al. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Applied Biological Sciences PNAS.*, vol. 103, no. 12, 4653, 2006.

Skraber, B. Gassilloud, and C. Gantzer. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. *Applied and Environmental Microbiology*, No. 6, Vol. 70, p. 3644–3649, 2004.

Reis, M.R. Controle biológico bacteriano e tratamento de efluentes através do uso de bacteriófagos. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Ed 33^o Universidade Estadual de Campinas. 2004.

Coates, A., Y. Hu, R. Bax, and C. Page.. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1:895–910, 2002

Hall B. G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5):430–435, 2004.

Yacoby, I., H. Bar, and I. Benhar.. Targeted drug bacteriophages. as antibacterial Nanomedicines. *Antimicrob Agents Chemother*, p.2156-2163, 2007.

Yacoby, I., M. Shamis, H. Bar, D. Shabat, and I. Benhar. Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2087–2097, 2006.

McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG: Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 4(1):69-75, 2000.

Traore H, Ogwang S, et al. Rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.*, 2007.

Hagens S, Habel AvAU, von Gabain A, Blasi U .Therapy of experimental pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10):3817–3822, 2004.

Merril CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discover* , 2(6):489–497, 2003.

Pingoud, A., Fuxeiter, M., V& Wend, W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell .Mol. Life Sci.* 62, 685-707, 2005.

Labrie Simon J., E. S. Julie, Moineau Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews Microbiology.* V8, 2010

Zegans, M. E.Jeffrey C. Wagner, Kyle C. Cady, Daniel M. Murphy. Interaction between Bacteriophage DMS3 and Host CRISPR Region Inhibits Group Behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, No. 1, Vol. 191, p. 210–219,. 2009.

GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRÍGUEZ, A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(6):479-485.

Ramos, L. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. *Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL VENDIDAS A VAREJO NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA E EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO PELO PATÓGENO, 2009.

Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistant crisis. *J Infect Dev Ctries.* 2014. 8(2):129-136.

Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:51.

Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011 Out;14(5):524-31.

Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*. 2013 Feb;121(2):a48-53.

Maal KB, Delfan AS, Salmanizadeh S. Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform's Phage Therapy. *Jundishapur J Microbiol*. 2015 Mar; 8(3).

Parasion S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol J Microbiol*. 2014;63(2):137-45.

Housby JN, Mann NH. Phage therapy. *Drug Discov Today*. 2009 Jun;14(11-12):536-40

Atterbury, R.J. (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microbial Biotechnology*, 2(6), pp. 601-612.

Balogh, B.; Jones, J. B.; Iriarte, F. B. et al. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*., 11(1), pp. 48-57.

Hagens, S. e Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp. 58-68.

Profeta, G. Bacteriófagos são alternativa no combate às bactérias multirresistentes, 2016.

Verbeken G, Huys I, Pirnay JP, Jennes S, Chanishvili N, Scheres J, Górski A, De Vos D, Ceulemans C. Taking bacteriophage therapy seriously: a moral argument. *Biomed Res Int*. 2014;621316.

Jassim SA, Limoges RG. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Ag;30(8):2153-70.

Ghannad MS, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. Iran J Basic Med Sci. 2012 Mar;15(2):693-701.

Ackermann HW, Greer GG, Rocourt J. Morphology of Brochothrix thermosphacta phages. Microbios. 1988; 56(226):19-26.

Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poult Sci. 2003; 82(4):640-7

Sklar IB, Joerger RD. Attempts to utilize bacteriophage to combat Salmonella enterica serovar Enteritidis infection in chickens. J Food Saf. 2001; 21(1):15-29.

Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. J Food Prot. 2005; 68(2):426-37.

Ghannad MS, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. Iran J Basic Med Sci. 2012 Mar;15(2):693-701.