UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS- GRADUAÇÃO,
PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Erica Cristina Santos Silva

Isolamento, caracterização e estabilização de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius*: aplicação veterinária no tratamento de piodermites por permeação transdérmica

Sorocaba/SP
2020

Erica Cristina Santos Silva

Isolamento, caracterização e estabilização de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius*: aplicação veterinária no tratamento de piodermites por permeação transdérmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Coorientadora: Profª Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Sorocaba/SP
2020

Ficha Catalográfica

Silva, Erica Cristina Santos

S579i Isolamento, caracterização e estabilização de bacteriófagos líticos para *Staphylococus intermedius* : aplicação veterinária no tratamento de piodermites por permeação transdérmica / Erica Cristina Santos Silva. – 2020.

106 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Bactérias - Infecções. 2. Bacteriófagos. 3. *Staphylococus*. 4. Farmacologia veterinária. 5. Dermatologia veterinária. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, co-orient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6971

Erica Cristina Santos Silva

Isolamento, caracterização e estabilização de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius*: aplicação veterinária no tratamento de piodermites por permeação transdérmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 27 / 02 / 2020

BANCA EXAMINADORA:

Ass. _____

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Universidade de Sorocaba

Ass. _____

Prof. Dr. Fábio Márcio Squina
Universidade de Sorocaba

Ass. _____

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol
Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Lenire Aparecida P. Santos (*in memorian*), por ser a luz dos meus pensamentos, e aos meus sobrinhos Dmitri, Maria Eduarda, Iuri e Ana Júlia, futuro da ciência.

“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste”

Sigmund Freud, 06.05.1856 - 23.09.1939

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus imensamente por me tornar paciente e capaz de realizar com êxito o trabalho de pesquisa desenvolvido durante o mestrado.

À minha família, o meu muito obrigado pela compreensão e incentivo em todos os momentos que precisei do apoio de vocês, em especial ao meu pai Adhemar Costa Santos, ao meu marido Fábio Augusto Gomes da Silva e à minha irmã Alessandra Santos Silva por serem a minha força e inspiração para vencer os obstáculos.

Às minhas amigas do PhageLab e irmãs do coração: Welida Campos, Liliam Harada, Fernanda Moreli, Thaís Jardim, que compartilharam dessa experiência única com conselhos, críticas construtivas, otimismo, trabalho em equipe e confraternizações que não podiam faltar, mas que nos momentos de sufoco também souberam ser solidárias e companheiras.

Estou muito grata ao meu orientador, Professor Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, pelo aprendizado, conselhos, empenho em responder prontamente a todas as minhas dúvidas sempre que foi preciso, e por sua amizade.

À minha coorientadora, Professora Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila, por todo o suporte, ensinamentos, motivações, sugestões, companheirismo e carinho, principalmente na reta final do mestrado.

Obrigada à amiga e Professora Dra. Valquíria Miwa Hanai Yoshida, por sempre acreditar em mim e me motivar durante todo esse tempo.

Muita gratidão a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNISO, ao técnico Fernando Batain do LaBNUS-UNISO, ao técnico Denicezar Ângelo Baldo do LAFINAU-UNISO, e aos profissionais da UNICAMP que dedicaram um pouco do seu tempo me auxiliando com o meu trabalho de pesquisa.

Á Professora Dra. Renata de Lima e à Tais Germano, do Labiton-UNISO, pela parceria e dedicação.

Aos funcionários dos Laboratórios de Microbiologia e Química do Apoio 2, em especial à Valéria Orsi, à Rosenéia Tagliaferro, à Márcia Regina das Mercedes e ao Henrique Garcia, pela atenção, paciência e toda a ajuda prestada.

Aos alunos estagiários que passaram pelo PhageLab e que colaboraram para que todo o trabalho desse bons resultados.

À UNISO, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudo CAPES-PROSUP.

A todas as outras pessoas que não mencionei nominalmente, mas que deram a sua importante contribuição para o meu trabalho de pesquisa.

A todos, de coração, os meus sinceros agradecimentos!!!

RESUMO

As infecções de pele em animais causadas por *Staphylococcus intermedius* dão origem a piodermites, importantes patologias em veterinária. As piodermites podem ser tratadas com o uso de antibióticos tópicos e sistêmicos. No entanto, o uso indiscriminado destes ativos fez com que surgissem cepas multirresistentes com frequentes recidivas nos animais. Nesta perspectiva, os bacteriófagos (ou fagos) desempenham um papel importante na luta contra a resistência bacteriana. Contudo, para ultrapassar a barreira da pele é necessário o uso de facilitadores de permeação. Os líquidos iônicos, como o geranato de colina, surgiram como substâncias potenciais promotoras de permeação cutânea. O objetivo do trabalho de pesquisa foi isolar e caracterizar fagos líticos para *Staphylococcus intermedius,* visando o tratamento tópico de piodermites em animais, utilizando uma formulação para aplicação tópica contendo geranato de colina e fagos. Na primeira etapa do trabalho, foi realizado o isolamento e a identificação da bactéria *Staphylococcus intermedius* a partir de amostras de feridas de cães e cavalos. Na sequência, foram isolados dois fagos líticos a partir de águas residuais, os quais foram caracterizados por avaliação da gama de hospedeiros, eficiência de plaqueamento, curvas de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) e adsorção no hospedeiro, atividade antimicrobiana e análise do tamanho de proteínas estruturais por eletroforese em gel de poliacrilamida. Determinou-se a morfologia dos fagos por microscopia eletrônica de transmissão e a sua cristalinidade por difração de raios-X. Foram sintetizados os líquidos iônicos geranato de colina 1:1 e 1:2, e preparou-se um gel de hidroxietilcelulose incorporando os fagos e o geranato de colina 1:2. O gel foi avaliado por análises físico-químicas (pH, viscosidade e espalhabilidade), citotoxicidade e permeação transdérmica das partículas fágicas em células de Franz. O gel desenvolvido apresentou composição homogênea, adequada viscosidade e espalhabilidade. A formulação permitiu a estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas e favoreceu a sua permeação transdérmica. Pelos resultados obtidos, o produto desenvolvido apresenta potencial para o tratamento de animais com piodermite.

Palavras-chave: Geranato de colina. Piodermite. *Staphylococcus intermedius*. Bacteriófagos. Permeação transdérmica.

ABSTRACT

Skin infections in animals caused by *Staphylococcus intermedius* give rise to pyodermites, important pathologies in veterinary science. Pyodermites can be treated using either topical or systemic antibiotics. However, the indiscriminate use of these compounds led to the emergence of multiresistant bacterial strains with frequent recurrences in the animals. In this perspective, bacteriophages (or phages) play an important role in the fight against bacterial resistance. However, to surpass the skin barrier it is necessary to use facilitators of permeation. Ionic liquids, such as choline geranate, emerged as potential substances that promote cutaneous permeation. The objective of this research work was to isolate and characterize lytic phages for *Staphylococcus intermedius* aiming at the topical treatment of pyodermites in animals, using a formulation for topical application containing choline geranate and phages. In the first stage of the work, isolation and identification of the pathogen bacteria *Staphylococcus intermedius* from samples of wounds of dogs and horses was pursued. Subsequently, two lytic phages were isolated from effluent waters, which were characterized by evaluation of their host range, efficiency of plating, one step growth (OSGC) and adsorption curves onto their host, antimicrobial activity and analysis of the size of structural proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. The morphology of the phage particles was determined by transmission electron microscopy and their crystallinity by X-ray diffraction. The ionic liquids choline geranate 1:1 and 1:2 were synthesized, and an hydroxyethylcellulose gel was formulated integrating phage particles and choline geranate 1:2. The gel was evaluated by physicochemical analyses (pH, viscosity and spreadability), cytotoxicity and transdermal permeation of the phage particles using Franz cells. The gel developed presented homogeneous composition, adequate viscosity and spreadability. The formulation allowed the structural and functional stabilization of the phage particles and favored their transdermal permeation. Through the results obtained, the product developed presented potential for the treatment of animals with pyoderma.

Key-words: Choline geranate. Pyoderma. *Staphylococcus intermedius*. Bacteriophages. Transdermal permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.	21
Figura 2.	Representação esquemática de uma partícula bacteriofágica.	29
Figura 3.	Classificação dos bacteriófagos de acordo com a morfologia e tipo de material genético.	30
Figura 4.	Ciclo lítico **(a)** e ciclo lisogênico **(b)** dos bacteriófagos.	32
Figura 5.	Representação esquemática da pele de seres humanos e seus anexos.	34
Figura 6.	Reação química da síntese de líquido iônico geranato de colina.	36
Figura 7.	Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.	64
Figura 8.	Crescimento da bactéria isolada na amostra A5.	67
Figura 9.	Ensaio de spot test para verificação da presença de bacteriófagos nas amostras de águas residuais (a) SAAE-Sorocaba e (b) Águas de Araçoiaba após enriquecimento.	69
Figura 10.	Resultados obtidos com as amostras de água enriquecidas em bacteriófagos, da água de esgoto do SAAE-Sorocaba (Sorocaba/SP, Brazil) e da água de esgoto da estação de tratamento Águas de Araçoiaba (Araçoiaba da Serra/SP, Brazil), mostrando diferentes morfologias das placas fágicas produzidas. Foram selecionadas duas placas fágicas diferentes, sendo uma denominada PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e outra denominada PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (PhL-UNISO representa "PhageLab-UNISO"; SS-ISL representa "*Staphylococcus intermedius*" de isolados clínicos veterinários; ph00ij representa a fonte ij do fago, onde i=4 representa um tamanho de placa fágica muito pequeno, j=4 representa a fonte "esgoto do SAAE-Sorocaba", e j=5 representa a fonte "água residual da estação de tratamento Águas de Araçoiaba da Serra).	70
Figura 11.	Resultados obtidos no *spot test* dos fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 na cepa hospedeira de *Staphylococcus intermedius* **(a)** e na cepa de coleção *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K001 **(b)**.	73
Figura 12.	Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 no seu hospedeiro bacteriano (*Staphylococcus intermedius*).	75

Figura 13. Curvas de adsorção dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 no seu hospedeiro bacteriano (*Staphylococcus intermedius*). 76

Figura 14. Inativação de *Staphylococcus intermedius* pelos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 a uma MOI de 1 durante 24 h. **(a)** Concentração bacteriana: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago; **(b)** Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio padrão. 78

Figura 15. Varredura spectral UV-Vis das suspensões concentradas de bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045. 80

Figura 16. Curvas de calibração produzidas para a relação entre a concentração de partículas bacteriofágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 258 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para os fagos isolados PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, permitindo determinar os seus coeficientes de extinção molar. 81

Figura 17. Electroforetograma corado com Coomassie dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (lane Ph44) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (lane Ph45), e dos marcadores de peso molecular (lane M). 82

Figura 18. Difractogramas de raios-X (DRX) de amostras das suspensões concentradas de bacteriófagos (PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044: curva rosa-claro; PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045: curva azul). 84

Figura 19. Fotomicrografias de coloração negativa obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das suspensões concentradas dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 **(a, b, c)** e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 **(d, e, f)**, a diferentes ampliações. 86

Figura 20 Resultados do antibiograma realizado à cepa isolada de *Staphylococcus intermedius* e espectro lítico do coquetel de bacteriófagos, após a aplicação de discos de meropenem, imipenem, cefepime e polimixina B, e uma gota de 5 µL do coquetel de bacteriófagos integrando 200 µL de suspensão concentrada de cada bacteriófago. 87

Figura 21. Esquema reacional seguido para a síntese do geranato de colina, partindo de bicarbonato de colina (cátion) e ácido gerânico (dador na ligação de hidrogênio) a diferentes razões molares (1:1, líquido iônico geranato de colina; 1:2, solvente eutético profundo geranato de colina). 88

Figura 22. Resultados da avaliação da manutenção da atividade lítica das partículas bacteriofágicas após integração na matriz HEC biorreativa e concomitante estabilização da sua estrutura e funcionalidade. 89

Figura 23. Resultados obtidos nas análises do potencial de citotoxicidade pelo método de disco-difusão em ágar com células HaCaT, do gel HEC integrando GC1:2 e coquetel de partículas fágicas. 91

Figura 24. Resultados obtidos nos ensaios de permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas a partir da matriz HEC biorreativa integrando geranato de colina, como a média de partículas fágicas permeadas (UFP/mL), durante um período de ensaio de 12 h. Os valores representam a média de três experimentos (n=3), com desvios-padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não-lineares realizados aos dados experimentais, nomeadamente da função hiperbólica aos dados de permeação transdérmica usando geranato de colina 1:2. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados utilizados para preparar as curvas de calibração com o objetivo de determinar os coeficientes de extinção molar das partículas fágicas (inteiras) PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045.	55
Tabela 2.	Composição da formulação em gel de hidroxietilcelulose.	59
Tabela 3.	Identificação por testes bioquímicos das bactérias isoladas nas amostras coletadas de clínicas e hospitais veterinários. (A1) amostra do canal auditivo do ouvido de cachorro; (A2) amostra de ferida de focinho de cachorro; (A3) amostra do canal auditivo do ouvido de cachorro, (A4) amostra de ferida de perna de cachorro, (A5) amostra de ferida de tornozelo de cavalo.	66
Tabela 4.	Gama de hospedeiros dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 determinada em 11 estirpes bacterianas. Zona de lise clara (+) e zona sem lise (-). A eficiência de plaqueamento com a cepa hospedeira foi considerada como EOP = 100%.	74
Tabela 5.	Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (lane Ph44) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (lane Ph45).	83
Tabela 6.	Resultados obtidos nas análises físico-químicas realizadas ao gel HEC contendo geranato de colina (1:2) e coquetel de partículas bacteriofágicas.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µS	MicroSiemens
Á	Angstrom
UFC	Unidades formadoras de colônias
cm	Centímetro
CPM 30	Cefepime 30 µg
Cu	Cobre
DES	Solvente eutético profundo
DME	Diagnóstico Microbiológico Especializado
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de fita dupla
dsRNA	RNA de fita dupla
EOP	Ensaio de eficiência de plaqueamento
ε	Coeficiente de extinção molar
GC	Geranato de colina
HaCaT	Células de queratinócitos humanos
HEC	Hidroxietilcelulose
IPM 10	Imipenem 10 µg
kDa	QuiloDaltons
kV	Quilovolts
LI	Líquido iônico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
MPM 10	Meropenem 10 µg
MTA-TSB	Meio molten top ágar de TSB

MΩcm	MiliOhm centímetro (resistividade)
MW	Peso molecular
nm	Nanômetro
ϴ	Ângulo theta
℃	Grau centígrado
OD	Densidade óptica
OSGC	Curva de crescimento em um só ciclo síncrono
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PES	Polietersulfato
UFP	Unidade formadora de placas
ph	Bacteriófago
pH	Potencial hidrogeniônico
ph44	Bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044
ph45	Bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045
POL 300	Polimixina B 300 µg
PSA	Persulfato de amônio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SM	Tampão fágico
ssDNA	DNA de fita simples
ssRNA	RNA de fita simples
t	Tempo
Temed	Tetrametiletilenodiamina
TSA	*Tryptic Soy Agar*
TSB	*Tryptic Soy Broth*
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV-VIS	Radiação no espectro ultravioleta-visível
W	Watts
DRX	Difração de raios-X
Δ	Taxa de absorção
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	22
2	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	24
2.1	Piodermites	24
2.2	Agente etiológico	26
2.3	Diagnóstico	26
2.4	Patogenia	26
2.5	Tratamento com agentes antimicrobianos	27
2.6	Bacteriófagos	28
2.7	Infecção bacteriofágica do hospedeiro bacteriano	30
2.8	Terapia fágica	32
2.9	Permeação transdérmica	34
2.10	Líquidos iônicos	35
2.11	Géis	36
2.12	Estabilização de proteínas	37
3	**OBJETIVOS**	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	40
4.1	Material	40
4.1.1	Material biológico	40
4.1.2	Reagentes	40
4.1.3	Equipamentos analíticos e outros	41
4.2	Métodos	42
4.2.1	Preparação de meios de cultura	42
4.2.2	Isolamento e caracterização da cepa bacteriana patogênica responsável por piodermites em animais	44
4.2.3	Coloração de Gram	45
4.2.4	Teste da catalase	45
4.2.5	Teste da coagulase	45
4.2.6	Fermentação do manitol	45
4.2.7	Fermentação da maltase	46
4.2.8	Hemólise	46

4.2.9	Preparação da suspensão bacteriana de *Staphylococcus intermedius*	46
4.2.10	Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus intermedius* isolada	46
4.2.11	Enriquecimento de bacteriófagos em cultura da cepa isolada de *Staphylococcus intermedius*	47
4.2.12	Preparação do tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius,* pela técnica de *pour plate*	47
4.2.13	Verificação da presença de bacteriófagos por *spot-test* das amostras enriquecidas	47
4.2.14	Isolamento de placas bacteriofágicas	47
4.2.15	Amplificação dos bacteriófagos isolados com distintas morfologias de placas fágicas	48
4.2.16	Determinação do título bacteriofágico pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada	49
4.2.17	Nomenclatura dos bacteriófagos isolados	49
4.2.18	Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados	50
4.2.18.1	Determinação da gama de hospedeiros	50
4.2.18.2	Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)	50
4.2.18.3	Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	51
4.2.18.4	Curva de adsorção	52
4.2.18.5	Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)	53
4.2.18.6	Avaliação da suscetibilidade da cepa isolada de *Staphylococcus intermedius* frente a antibióticos e ao coquetel de bacteriófagos isolados e purificados	54
4.2.19	Caracterização físico-química dos bacteriófagos isolados	54
4.2.19.1	Análise espectrofotométrica por varredura espectral UV-Vis	54
4.2.19.2	Análise eletroforética das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	56
4.2.19.3	Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)	56
4.2.19.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das partículas bacteriofágicas isoladas	57
4.2.20	Síntese e caracterização do líquido iônico geranato de colina (1:1, LI; 1:2, DES)	57
4.2.21	Formulação e caracterização do gel de hidroxietilcelulose (HEC) integrando o coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina	58
4.2.21.1	Formulação de gel de hidroxietilcelulose (HEC)	59

4.2.21.2	Avaliação do pH da formulação em gel HEC	59
4.2.21.3	Avaliação da espalhabilidade da formulação em gel HEC	60
4.2.21.4	Avaliação da viscosidade da formulação em gel HEC	60
4.2.21.5	Análise da manutenção da viabilidade das partículas bacteriofágicas no gel HEC contendo geranato de colina	61
4.2.21.6	Análise do potencial de citotoxicidade da formulação em GEL integrando geranato de colina 1:2 (DES) e o coquetel de bacteriófagos, pelo método de disco-difusão em ágar	61
4.2.21.7	Permeação transdérmica de partículas bacteriofágicas a partir da formulação em gel HEC, assistida por geranato de colina	62
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	63
5.1	Isolamento e caracterização da cepa bacteriana patogênica responsável por piodermites em animais	65
5.2	Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus intermedius* isolada	66
5.3	Isolamento de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius*	67
5.4	Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados	71
5.4.1	Título das suspensões fágicas	71
5.4.2	Determinação da gama de hospedeiros	72
5.4.3	Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)	73
5.4.4	Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	74
5.4.5	Curvas de adsorção	76
5.4.6	Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)	78
5.5	Caracterização físico química dos bacteriófagos isolados	79
5.5.1	Análise espectrofotométrica por varredura espectral UV-Vis	80
5.5.2	Análise eletroforética das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	81
5.5.3	Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)	83
5.5.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das partículas bacteriofágicas isoladas	85
5.6	Avaliação da suscetibilidade da cepa isolada de *Staphylococcus intermedius* frente a antibióticos e ao coquetel de bacteriófagos isolados e purificados	87
5.7	Síntese e caracterização do líquido iônico geranato de colina (1:1, LI; 1:2, DES)	88

5.8	Análise da manutenção da viabilidade das partículas bacteriofágicas no gel HEC contendo geranato de colina	89
5.9	Formulação e caracterização do gel de hidroxietilcelulose (HEC) integrando o coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina	90
5.9.1	Análise do potencial de citotoxicidade da formulação em GEL integrando geranato de colina 1:2 (DES) e o coquetel de bacteriófagos, pelo método de disco-difusão em ágar	91
5.9.2	Permeação transdérmica de partículas bacteriofágicas a partir da formulação em gel HEC, assistida por geranato de colina	92
6	**CONCLUSÕES**	94
7	**PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS**	95
	REFERÊNCIAS	96
ANEXO A	Certificado do XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, 2018	105
ANEXO B	Certificado do 12th Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas (CIFARP), Ribeirão Preto, SP, 2019	106

APRESENTAÇÃO

Os bacteriófagos são partículas víricas de natureza proteica totalmente desprovidas de metabolismo, sendo altamente eficazes no tratamento de infecções bacterianas. O trabalho de pesquisa aqui apresentado visou o estudo do potencial de estabilização estrutural e funcional / proteção de partículas bacteriofágicas numa formulação em gel, integrando um líquido iônico como potencial facilitador de permeação, com o objetivo de ser administrado topicamente no tratamento de piodermites bacterianas em animais causadas pelo patógeno *Staphylococcus intermedius*.

A Figura 1 apresenta um resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido, começando com o isolamento e caracterização de dois bacteriófagos distintos a partir de águas residuais do hospital veterinário da UNISO, passando por ensaios de terapia fágica (curvas de morte) com os dois bacteriófagos, pela formulação do gel HEC integrando líquido iônico e coquetel dos dois bacteriófagos e culminando em estudos de permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas a partir do gel HEC auxiliada pelo líquido iônico, para aplicações no tratamento veterinário de piodermite.

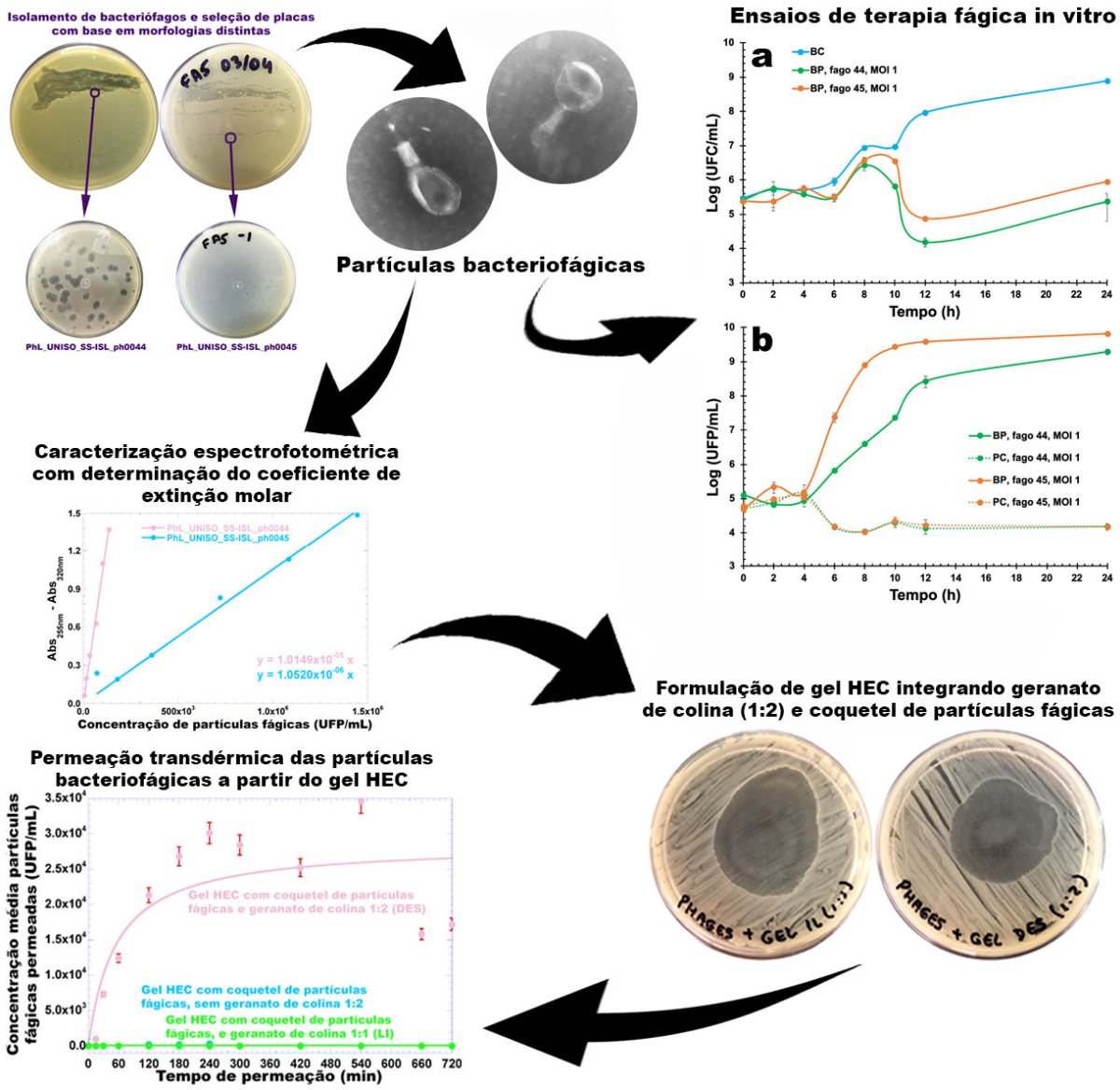
Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa foram apresentados em 2 Congressos Científicos, sendo o XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul (Gramado, RS, de 17 a 21 de outubro de 2019) **(ANEXO A),** e o 12th CIFARP – Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas (Ribeirão Preto/SP, de 6 a 9 de novembro de 2018) **(ANEXO B).**

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à preparação de um manuscrito científico que se encontra atualmente em processo de submissão para publicação em revista científica internacional indexada com arbitragem por pares (Erica C. Silva; Thais J. Oliveira; Liliam K. Harada; Fernanda C. Moreli; Marta M.D.C. Vila; Victor M. Balcão (2020) Newly isolated lytic bacteriophages for *Staphylococcus intermedius*, structurally and functionally stabilized in a HEC gel containing choline geranate: potential for transdermal permeation in veterinary phage therapy). Este trabalho comprova a qualidade e importância dos resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito.

O trabalho de pesquisa aplicada realizado, intitulado **"Isolamento, caracterização e estabilização de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus***

***intermedius*: aplicação veterinária no tratamento de piodermites por permeação transdérmica"**, foi financiado pela Universidade de Sorocaba, com Bolsa de Estudo integral CAPES-PROSUP concedida à aluna Erica Cristina Santos Silva, tendo sido orientado pelo Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e coorientado pela Profa. Dra. Marta M.D.C. Vila, da Universidade de Sorocaba.

Figura 1. Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.



Fonte: Elaboração própria.

1 INTRODUÇÃO

A piodermite pode ser definida como uma infecção piogênica de origem bacteriana caracterizada pela acumulação de exsudado neutrofílico. Esta infecção pode ser classificada conforme a profundidade da infecção, podendo ser considerada externa, superficial ou profunda. A piodermite profunda atinge os folículos pilosos, a derme e, por vezes, o tecido subcutâneo (ALVES et al., 2019). As infecções nos animais têm como agente etiológico o microrganismo pertencente ao grupo *Staphylococcus intermedius* (HIRSCH; ZEE, 2014). Esta bactéria patogênica se protege dentro de biofilmes, os quais formam agregados de microrganismos na superfície do estrato córneo da pele. O biofilme atua como um escudo protetor, impedindo tanto a ação de antibióticos como da resposta imune, promovendo a proliferação dos microrganismos e consequente infecção do hospedeiro (GREENE, 2015).

Quando comparada com piodermites em outros animais domésticos, a incidência em cães é muito mais comum. As razões para este fato ainda não se encontram perfeitamente esclarecidas mas, provavelmente, incluem fatores fisiológicos e anatômicos. Nos cães, a estrutura da camada mais superficial da pele, o extrato córneo, apresenta-se mais fina e com pouca proteção lipídica em regiões próximas ao folículo piloso, o que facilita a entrada de bactérias e sua disseminação (BOTONI et al., 2014). As piodermites também são comuns em equinos (FARIA et al., 2017), sendo que o *Staphylococcus intermedius* provoca uma dermatopatia relativamente frequente no equino com patogênese semelhante à de outras espécies animais (SANTOS et al., 2008).

De acordo com Greene (2015), a piodermite profunda é evitada pela aplicação de fármacos que atingem o local da infecção quando há formação de feridas no tecido. Para o tratamento de piodermites recorrentes, doses subcutâneas de antibióticos podem ser administradas. Contudo, o uso periódico de antibióticos pode induzir um aumento de resistências bacterianas, levando ao espalhamento da linhagem bacteriana resistente.

Os bacteriófagos (ou fagos) são partículas víricas completamente desprovidas de atividade metabólica que infectam células bacterianas com o propósito de usar a maquinaria metabólica do hospedeiro para a sua replicação e disseminação do seu material genético e, como consequência, provocam a disrupção celular (RAKHUBA et

al., 2010). Os fagos são constituídos por uma cápsula proteica (cápside) que constitui o envelope que encerra e protege o material genético, DNA ou RNA (VISPO; PUCHADES, 2001). O seu modo de propagação pode ser por via lítica, produzindo muitas cópias virais no interior do hospedeiro e, subsequentemente, provocando a sua lise com liberação da progenia para o exterior, num processo conhecido por amplificação. Através da via lítica, cada um dos novos virions iniciará um novo ciclo lítico com uma nova célula hospedeira até que todo o hospedeiro bacteriano seja eliminado. Outro tipo de propagação, é a via lisogênica, na qual o material genético da partícula fágica se insere no material genético do hospedeiro bacteriano formando um pró-fago que se replica juntamente com o DNA bacteriano. A lisogenia fágica permanece até que ocorra um sinal fisiológico que desencadeie o ciclo lítico (HARADA et al., 2018 b; RIOS et al., 2016).

Os fagos são considerados as entidades biológicas mais prevalentes no planeta, estando estimado o seu número na biosfera em 10^{30}, ou mais (HARADA et al., 2018b; RIOS et al., 2016; CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004). De acordo com Hanlon (2007), os fagos são encontrados na natureza em quantidade mais abundante que as bactérias. Podem estar presentes na água, no solo, nos alimentos, nos esgotos, em humanos e animais. Segundo Jónczyk (2011), alguns fagos são resistentes a condições extremas de temperatura, pH, salinidade e concentração iônica.

Os fagos podem ser uma alternativa aos antibióticos no tratamento de infecções bacterianas que apresentam resistência a fármacos (HARADA et al., 2018b; RIOS et al., 2016; SULAKVELIDZE et al., 2001). Os bacteriófagos são extremamente específicos para determinados hospedeiros bacterianos e totalmente incapazes de infectar células humanas e animais. A capacidade dos fagos para se replicarem no local da infecção não produz danos as células humanas ou animais, tornando-se mais seletivos do que os antibióticos.

Os líquidos iônicos (LI) são sais em estado líquido altamente viscosos, não voláteis, com baixo ponto de fusão ou próximo de temperaturas ambientes, formados exclusivamente por íons (HARADA et al., 2018a; GOINDI et al., 2015; GHANDI, 2014; MANGIALARDO et al., 2012; MONIRUZZAMAN et al., 2010; WELTON, 1999). Os LI tornaram-se interessantes veículos de transporte de ativos devido à sua baixa toxicidade e biodegradabilidade (DA HARAet al., 2018a; PETKOVIC et al., 2010). Quando comparados com solventes orgânicos, os LI minimizam a irritação da pele causada por alguns solventes (HARADA et al., 2018a; ZAKREWSKY et al., 2014;

STOLTE et al., 2007). Adicionalmente, os LI aumentam a estabilidade proteica e a solubilização da proteína (HARADA et al., 2018a; NORITOMI et al., 2011a, 2011b, 2013). Dentre diversos LI, o geranato de colina exibi atividade antimicrobiana moderada, mínima toxicidade para pele e apresenta capacidade para atuar como promotor de permeação dérmica (ZAKREWSKY et al., 2014).

Pelos fatos expostos, os objetivos deste trabalho de pesquisa consistiram em isolar e caracterizar o agente patogênico *S.intermedius;* isolar partículas bacteriofágicas líticas para *S. intermedius* a partir de fontes ambientais e caracterizá-las (física- e biologicamente); sintetizar o LI geranato de colina e seu DES profundo; e produzir um gel HEC integrando líquido iônico e partículas bacteriofágicas, visando o tratamento de piodermites em aplicações veterinárias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Piodermites

As infecções que acometem a pele dos animais são denominadas de piodermites, e podem atingir a superfície da epiderme, folículos pilosos ou em profundidade, atingindo a derme e tecidos adiposos adjacentes. Sua origem é bacteriana, causada por cepas do grupo de *S. intermedius*, mais especificamente pela *S.pseudintermedius,* a qual prevalece na maioria das infecções animais. Entre os mamíferos, os cães são os mais susceptíveis às piodermites. Não se conhece exatamente o motivo dessa susceptibilidade, mas talvez seja pelo fato do estrato córneo da pele canina ser mais fino e com poucos lipídeos intercelulares. A falta de lipídeos escamosos próximos à entrada dos folículos pilosos e o pH da pele dos cães também podem ser fatores que favoreçam a proliferação da bactéria levando à infecção (GREENE, 2015).

Em equinos, as piodermites causadas por estafilococos Gram-positivo apresentam uma distribuição cosmopolita. Não existe predisposição por idade, sexo ou raça, mas equinos submetidos a manejo higiênico-sanitário inadequado (deficiência na higiene do ambiente, controle não apropriado de endo- e ectoparasitas) e mal nutridos parecem ser mais susceptíveis a desenvolverem a infecção (SANTOS et al., 2008).

Segundo Campbell e Rosin (1998), a classificação da piodermite é baseada na

profundidade da invasão bacteriana. A piodermite de superfície ocorre quando há um processo de inflamação no local, sem que haja invasão da derme pela bactéria. A piodermite superficial é a mais comum e ocorre com o comprometimento do folículo piloso, mas sem sua destruição. A piodermite profunda ocorre quando há a invasão da derme e tecidos adiposos adjacentes pela bactéria.

Greene (2015) descreveu a piodermite de superfície como sendo uma infecção secundária desencadeada por outras doenças pré-existentes ou traumas cutâneos decorrentes de dermatites provocadas por alergia às pulgas. A piodermite superficial pode ocorrer em dobras cutâneas faciais, caudais, labiais, vulvares e, no animal com obesidade, associada a fatores como atrito e transpiração. Todavia, a piodermite superficial apresenta-se na forma de pústulas intraepidérmicas, denominada impetigo, podendo atingir o óstio dos folículos pilosos e originando foliculites. Em ambas as patologias ocorre a formação de crostas que dificultam o diagnóstico. Um outro quadro clínico observado é a piodermite disseminada, a qual apresenta uma inflamação esfoliativa. Na piodermite profunda ocorre o comprometimento profundo do folículo piloso, com ou sem destruição folicular, denominada furunculose. Quando a furunculose envolve a derme e tecidos subcutâneos, denomina-se de celulite, podendo desencadear uma infecção generalizada.

A patogenia no equino é semelhante à piodermite descrita em outros animais. De acordo com Fadok (1995), quando a pele do animal é lesionada, comprometendo a sua integridade, formam-se aberturas por onde as bactérias podem entrar e infectar os folículos pilosos, replicando-se facilmente. As injúrias na pele podem ocorrer em regiões próximas às selas, barrigueiras, estribos e cabrestos, sendo significativas no aparecimento da patologia. Se os folículos pilosos se romperem, pode ocorrer a furunculose ou piodermite profunda. Segundo Santos e colaboradores (2008) a piodermite no equino caracteriza-se clinicamente pela presença de pápulas, úlceras, exsudação serosa, purulenta ou sanguinolenta, formação de crostas, e ausência de pelos em regiões cervicais e distais dos membros e do dorso-lombar. Além de ocasionarem perdas econômicas devido ao custo do tratamento, as dermatopatias em equinos provocam uma aparência desagradável e sofrimento ao animal (FARIA et al., 2017).

2.2 Agente etiológico

A espécie bacteriana mais comum causadora da piodermite é a *S. pseudintermedius*, pertencente ao grupo *S.intermedius*, um coco Gram-positivo que coloniza e habita como comensal na pele dos animais, mas que devido a algum desiquilíbrio fisiológico pode tornar-se patogênico (CATTIN, 2008).

Os agentes etiológicos das piodermites são bactérias anaeróbicas facultativas, pertencentes à família *Micrococcaceae*, apresentando- se em forma de cachos de uva ou agrupados. Bioquimicamente, são caracterizados por serem coagulase positiva (característica essa de bactérias com maior virulência), catalase positiva, manitol positivo e fermentação da maltase positiva. Somando-se a isso, estas bactérias têm a capacidade de sofrer mutação e adquirir resistência a tratamentos quimioterápicos. As cepas resistentes à meticilina (MRSP) também são resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos tais como penicilinas e cefalosporinas, e carbapenêmicos, de acordo com Greene (2015).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da piodermite bacteriana é realizado com base na anamnese, exame físico e exames de diagnóstico adicionais (DEVESA, 2015). O diagnóstico segue procedimentos gerais, onde normalmente são necessários exames citológicos das pústulas e superfícies cutâneas, além da raspagem e da biopsia à pele. Adicionalmente, podem realizar-se antibiogramas e identificação bacteriana (CAMPBELL e ROSIN, 1998).

2.4 Patogenia

Os mecanismos de defesa dos animais podem incluir processos imunológicos e não-imunológicos. Nos processos imunológicos existe ação imunológica de imunoglobulinas, células de Langerhans, dentrócitos da derme, linfócitos, mastócitos e células endoteliais, presentes tanto na epiderme quanto na derme. Nos processos não-imunológicos ocorre a descamação do estrato córneo superficial e folicular, a formação de barreira intercelular lipídica, a proliferação de células epiteliais, a transpiração (que confere proteção) e a formação de sebo. Contudo, quando há

comprometimento das barreiras físicas, como por exemplo no caso de lesões na pele, pode ocorrer a colonização por bactérias, desencadeando infecções (CAMPBELL; ROSIN, 1998).

De acordo com Chapman (2005), as adesinas de superfície presentes nos tecidos lesados do hospedeiro, juntamente com fatores imunológicos, contribuem para um ambiente propício ao aparecimento de infecções, enquanto que as bactérias secretam enzimas capazes de degradarem ainda mais o tecido lesionado. O aumento da permeabilidade cutânea pode ocorrer ou devido à desgranulação dos mastócitos e/ou à produção de enterotoxinas codificadas por vários genes no genoma do grupo *Staphylococcus intermedius*, o que facilita a entrada do patógeno no organismo hospedeiro (APLEY, 1998).

Segundo Albarellos, Kreil e Landoni (2004), outro aspecto de suma importância é a capacidade de formação de biofilmes por essas bactérias na superfície da pele, servindo de proteção contra a ação tanto de agentes antimicrobianos como da resposta imunológica do hospedeiro.

2.5 Tratamento com agentes antimicrobianos

As piodermites de superfície são somente tratadas com sucesso por via tópica. Já a piodermite profunda requer tratamento sistémico, podendo ser administrada terapia tópica em simultâneo. Os antibióticos recomendados como primeira escolha para o tratamento da piodermite superficial são as associações trimetoprim-sulfonamidas, a eritromicina, a lincomicina e outros macrolídeos (PEREIRA, 2013).

A dose ideal de antibiótico para o tratamento deve ser estipulada com base no peso do animal e no período de tempo suficiente para o tratamento, com vista a garantir o fim da infecção. Adicionalmente, o antibiótico escolhido deve ser de espectro estreito, para ser eficaz e evitar tanto a diminuição da microbiota gastrointestinal como o aumento da resistência antimicrobiana, produzindo efeitos colaterais mínimos, com custo razoável. Todavia, para o tratamento da piodermite profunda crônica recomenda-se a utilização de fármacos com maior poder de penetração devido aos tecidos cicatriciais formados no local da infecção. Dentre estes, podemos destacar a cefalexina, cefadroxila, cefpodoxima, clindamicina, enrofloxacino e marbofloxacino. Caso não se atinja o resultado desejado, é possível associar rifampicina à cefalexina. Sabe-se que as quinolonas possuem atividade bactericida

contra *S. pseudintermedius* (GREENE, 2015).

O tratamento com antibióticos em equinos é mais criterioso do que nos animais de pequeno porte. Muitos antibióticos como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas e macrolídeos, não são totalmente absorvidos ou não têm praticidade de administração. Adicionalmente, o tamanho do animal envolve custos incomportáveis e muitas vezes a descontinuidade do tratamento leva ao aparecimento de resistências bacterianas aos antimicrobianos (PAPICH, 2001). Também, os equinos são sensíveis à administração oral de alguns agentes antimicrobianos, os quais provocam reações gastrointestinais adversas. Dessa forma, são comuns as combinações antimicrobianas raras e dispendiosas em veterinária (WEESE et al., 2010).

Segundo Guardabassi e Kruse (2010) o estado imunológico do animal e o tipo de infecção merecem particular atenção, pois algumas fármacos demonstram ser mais eficazes quando há a participação do sistema imune durante o tratamento. Se o sistema imunológico estiver comprometido, os tratamentos de infecções agudas pelo uso de antimicrobianos podem ser fatais aos animais imuno-suprimidos.

2.6 Bacteriófagos

Os bacteriófagos foram descobertos em 1915 pelo microbiólogo britânico Frederick Twort. Durante as suas pesquisas com cultivo de vírus, Twort percebeu que placas contaminadas com algumas bactérias apresentavam zonas de lise e, por isso, supôs que possivelmente existiam vírus que lisavam bactérias. A descoberta oficial foi realizada em 1917 pelo microbiólogo franco-canadense Félix D' Herelle, que utilizou vírus líticos de *Shiguella dysenteriae* para tratar a sua disenteria. D' Herelle nomeou esse vírus de bacteriófagos (ou fagos), sendo congratulado como "pai" da virologia moderna (DOSS et al., 2017).

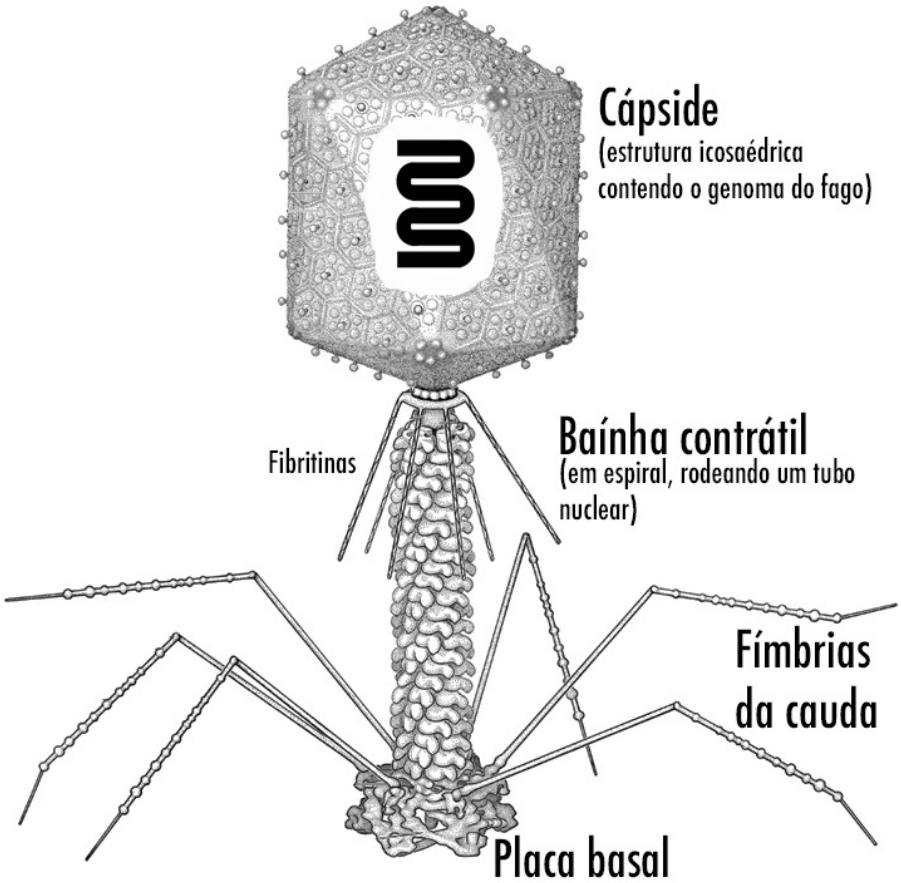
Os fagos surgem como alternativas potenciais e reais no combate à resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, pois são vírus que possuem como hospedeiros específicos as células bacterianas. A propagação (ou amplificação) viral ocorre dentro da célula hospedeira onde o vírus utiliza a maquinaria metabólica celular para produzir inúmeros virions (a progenia fágica). Após ocorrer a produção da progenia fágica no interior da célula bacteriana hospedeira, a célula é lisada de dentro para fora com recurso à produção de enzimas holinas e lisinas que promovem o enfraquecimento e rutura da membrana celular, liberando a progenia fágica para o

exterior, onde cada virion inicia novo ciclo de amplificação lítica numa outra célula viável do hospedeiro bacteriano, num processo conhecido como ciclo lítico (HARADA et al., 2018b; RIOS et al., 2016; SUMMERS, 2012).

Os fagos estão presentes em abundância na biosfera devido à grande diversidade de células bacterianas hospedeiras. Sendo assim, as partículas fágicas podem ser encontradas por exemplo em águas residuais de hospitais e de indústrias alimentícias, efluentes de estações de tratamento de esgotos, rios, solo, e ar. A grande vantagem da sua utilização reside na sua elevada especificidade para um determinado hospedeiro bacteriano sem no entanto infectar células animais (SAJJAD et al., 2004).

Os bacteriófagos apresentam estruturas bem definidas como a cápside, baínha contrátil, base de ancoragem e injeção do material genético, e fímbrias, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática de uma partícula bacteriofágica.



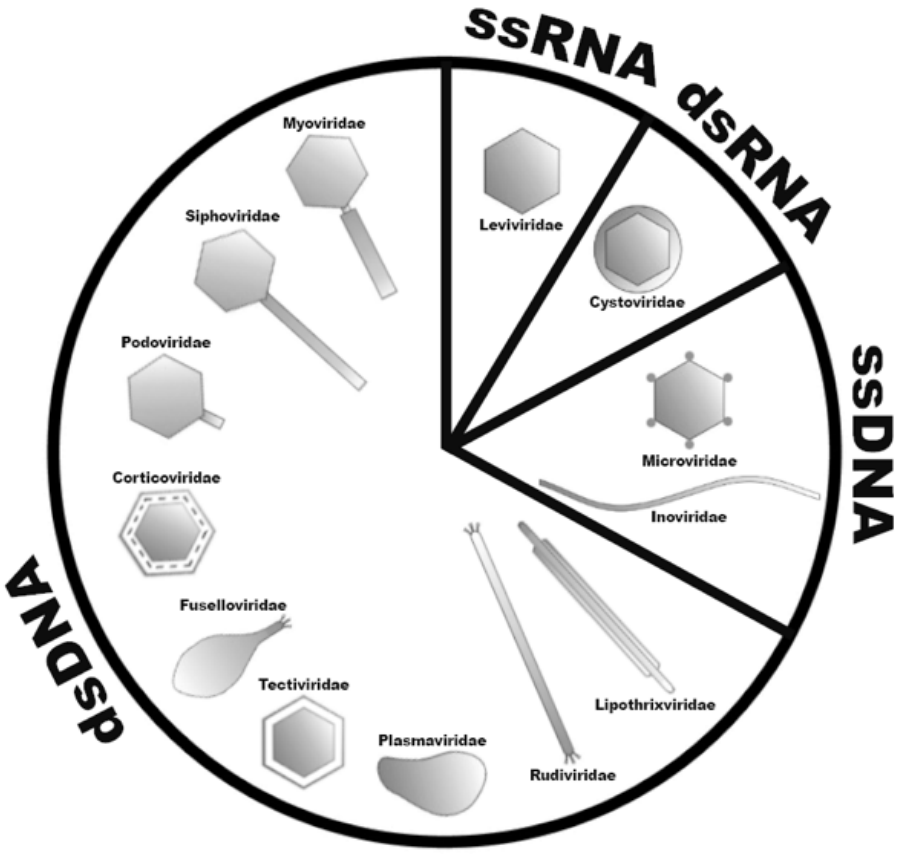
Fonte: adaptado de HARADA et al., 2018b.

A cápside encerra o material genético, o qual pode ser do tipo ssDNA (fita

simples), dsDNA (fita dupla), ssRNA (fita simples) e dsRNA (fita dupla). A classificação dos bacteriófagos pode ser definida pela sua morfologia, pelo seu material genético (DNA ou RNA), pelo seu hospedeiro específico, pelo seu *habitat*, pelo ciclo de replicação ou taxonomicamente com base no genoma. Os fagos de interesse para terapia fágica pertencem à ordem *Caudoviridae* e são representados pelas famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (HARADA et al., 2018b; WITTEBOLE; ROOCK; OPAL, 2014).

Os bacteriófagos podem apresentar morfologias distintas, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Classificação dos bacteriófagos de acordo com a morfologia e tipo de material genético.



Fonte: HARADA et al., 2018b

2.7 Infecção bacteriofágica do hospedeiro bacteriano

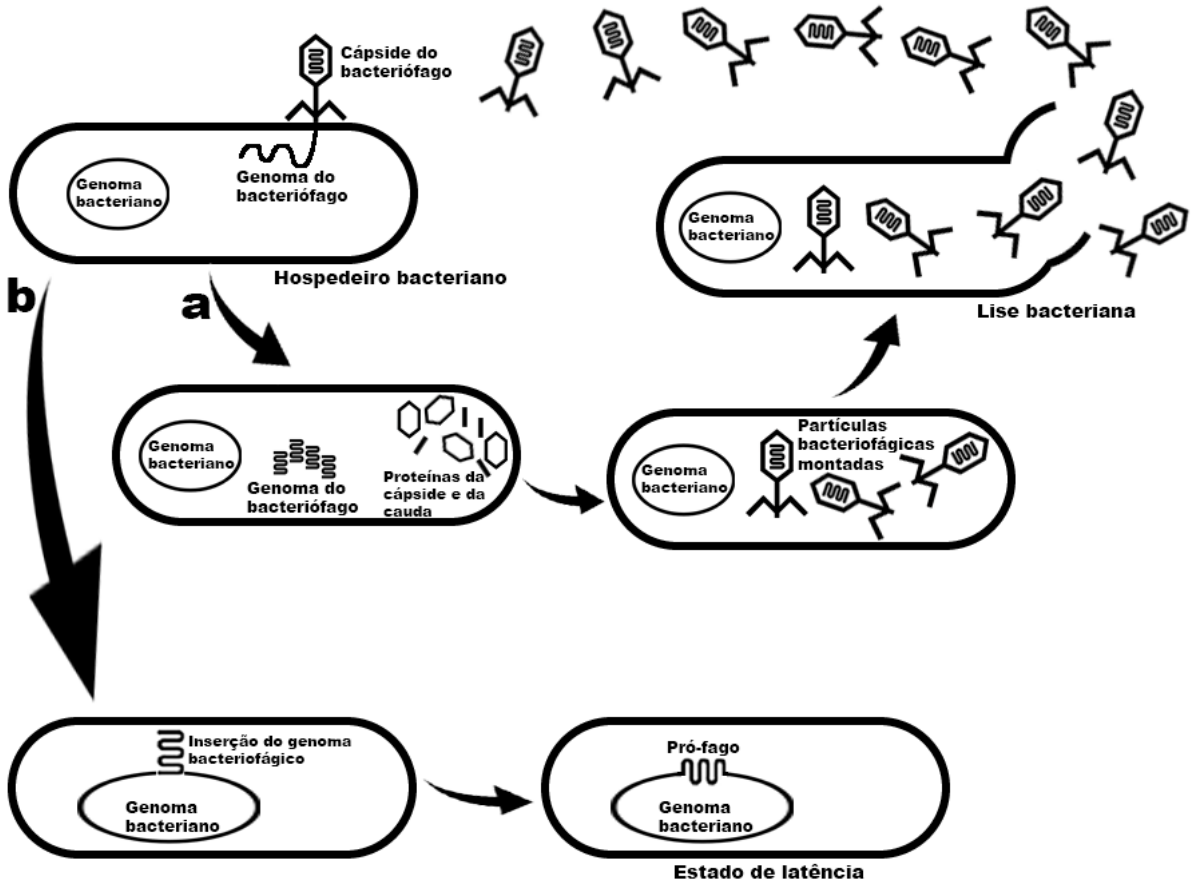
O mecanismo de amplificação viral pode ser através de um ciclo lítico ou de um ciclo lisogênico. No ciclo lítico ocorre a lise com morte do hospedeiro bacteriano, enquanto no ciclo lisogênico a bactéria permanece viável até um determinado

momento em que ocorra um estímulo fisiológico, onde o pró-fago sofre excisão do genoma bacteriano e dá início ao ciclo lítico (HARADA et al., 2018b; WITTEBOLE; ROOCK; OPAL, 2014).

De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), no ciclo lítico o fago utiliza o material genético, enzimas e aminoácidos presentes no hospedeiro bacteriano para produzir o seu próprio material genético e proteínas, utilizando os ribossomas bacterianos para realizarem o processo de tradução. Posteriormente, ocorre a degradação do DNA do hospedeiro bacteriano interferindo na transcrição ou inibição da tradução. Nessa etapa, conhecida como período de eclipse, o fago não está formado, mas somente os seus componentes, proteínas e material genético. Após a biossíntese dá-se início ao processo de maturação, onde ocorre a formação completa das partículas virais. As proteínas formam a cápside que recebe o material genético e depois se liga à cauda (constituída pela baínha contrátil, fibritinas, fímbrias e placa basal). Por fim, ocorre o processo de liberação da progenia fágica, levando à lise bacteriana através de enzimas holinas e lisozimas codificadas pelo fago que destroem a parede da bactéria a partir do seu interior, liberando os novos virions formados para o exterior da célula que estão agora aptos a infectar novas células hospedeiras.

Já no ciclo lisogênico, este ocorre após a etapa de adsorção do fago à célula bacteriana hospedeira e injeção do material genético do fago no seu citoplasma, o qual irá integrar-se no material genético do hospedeiro. Durante a replicação do material genético do hospedeiro, o material genético do fago é transcrito juntamente com o do hospedeiro. Estímulos por agentes químicos ou por radiação UV podem fazer com que o genoma do bacteriófago sofra excisão do genoma do hospedeiro e saia do seu estado lisogênico, iniciando um ciclo lítico. A Figura 4 ilustra os ciclos lítico e lisogênico dos bacteriófagos.

Figura 4. Ciclo lítico **(a)** e ciclo lisogênico **(b)** dos bacteriófagos.



Fonte: adaptado de HARADA et al., 2018b.

2.8 Terapia fágica

Apesar do conhecimento sobre a biologia dos bacteriófagos ser limitado, até meados dos anos 30 a terapia fágica foi mundialmente usada de forma intensiva e com elevadas taxas de sucesso associadas. Contudo, a ausência de ensaios clínicos capazes de comprovarem a eficiência da terapia fágica, somada ao início da “era dos antibióticos”, levou a que a terapia fágica fosse abandonada pelo Ocidente (LOBA, 2014).

Porém, o uso indiscriminado de antibióticos contribuiu para o surgimento de novas cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, favorecendo a disseminação dos genes de resistência pelo ambiente. O mesmo tem sido observado na prática veterinária, onde os antibióticos são indicados na profilaxia e tratamento de animais de pastagem, induzindo o aparecimento tanto de bactérias patogênicas como

comensais resistentes à terapia antimicrobiana convencional (AARESTRUP, 2015). O uso de antibióticos em doses sub-terapêuticas na nutrição animal, servindo como promotores de crescimento e para prevenir doenças nos animais, colaborou para o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos (Andreotti e Nicodemo, 2004). Segundo McDermott et al.(2002), as classes de antibióticos utilizados com a finalidade de atuarem como promotores de crescimento são os beta-lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos e sulfomanidas. Assim, a terapia fágica baseada no uso de bacteriófagos estritamente líticos ressurge como uma alternativa viável aos tratamentos com antibióticos, devido à elevada especificidade do bacteriófago para um dado hospedeiro bacteriano (HARADA et al., 2018b; RIOS et al., 2016; WITTEBOLE; ROOCK; OPAL, 2014).

O tratamento antimicrobiano com bacteriófagos possui alta especificidade para um dado hospedeiro bacteriano, sem comprometer a microbiota animal ou humana. Além do mais, esta terapia antimicrobiana não requer doses sucessivas do bacteriófago pois a replicação ocorre no hospedeiro enquanto existirem células viáveis bacterianas causadoras da infecção e cessa quando a bactéria específica não está mais presente (HARADA et al., 2018b; RIOS et al., 2016).

Em países como a República da Geórgia e Polônia, existem centros de pesquisas e desenvolvimentos de produtos com fagos. Nesses países a terapia fágica já é utilizada desde o pós guerra no tratamento de infecções (GÓRSKI et al., 2016).

A Food and Drug Adminsitration (FDA), em comum acordo com Centros Europeus de Controle de Doenças (ECDC), determinou padrões regulatórios para aprovação da terapia fágica. Entre as exigências, estão a utilização de fagos líticos obtidos de fontes da natureza, com fatores de virulência conhecidos; caracterização fágica através da sequência de DNA; testes de toxicidade, esterilidade e estabilidade dos produtos com fagos ou coquetéis fágicos (BRÜSSOW,2012).

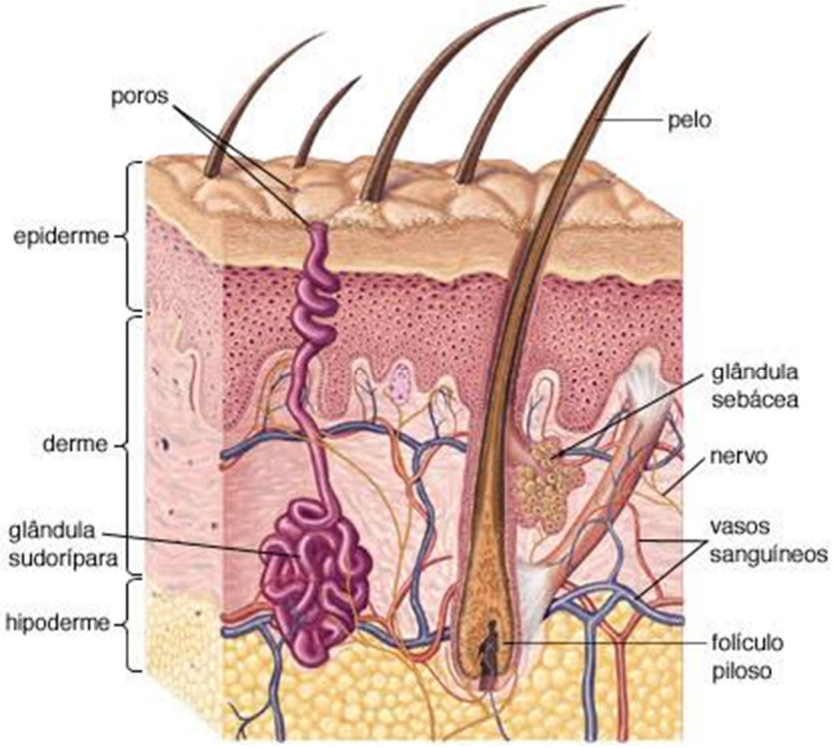
A terapia fágica é normalmente baseada na utilização de um coquetel de partículas fágicas, pois o tratamento com um único fago não é suficiente contra infecções causadas por um amplo espectro de espécies bacterianas e pode inclusive levar ao desenvolvimento de bactérias que apresentem “resistência” a esse único fago. Esse coquetel de partículas fágicas é formado ou por um conjunto de diferentes fagos que possuem a mesma espécie de bactéria como hospedeiro, ou por uma mistura de fagos que lisam diferentes classes bacterianas (DEGHORIAN; MELDEREN, 2012).

2.9 Permeação transdérmica

A via transdérmica para administração de medicamentos é reconhecida como uma via não-invasiva que evita o metabolismo de primeira passagem, favorecendo uma ação terapêutica mais eficaz e melhorando a adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, o estrato córneo, situado na epiderme, oferece a maior resistência à absorção de substâncias pela pele, devido à sua estrutura formada por múltiplas bicamadas lipídicas (HARADA et al., 2018a).

A pele é composta pelas camadas epiderme, derme e subcutânea. Na epiderme encontram-se células da queratina e o estrato córneo, que funciona como barreira para microrganismos e controle de absorção cutânea de substâncias. Podem encontrar-se também na pele glândulas sudoríparas e folículos pilosos. A derme é a camada intermediária que contém vasos sanguíneos, anexos cutâneos, terminais nervosos e nervos. A camada mais profunda é a subcutânea, composta basicamente por tecido adiposo (STEVENS; LOWE, 2001). A Figura 5 apresenta de forma esquematizada a constituição das diferentes camadas da pele.

Figura 5. Representação esquemática da pele de seres humanos e seus anexos.



Fonte: https://escola.britannica.com.br/artigo/pele/482514.

Segundo Suhonen (2009), o mecanismo de penetração de um fármaco na pele podem ser do tipo transcelular (entre os lipídeos do estrato córneo), intercelular (pelos lipídeos do estrato córneo) e transpendicular (através das glândulas e folículos).

Os fatores que podem influenciar a absorção cutânea incluem as condições da pele, afinidade da substância, hidratação cutânea, tempo de permanência na pele e tipologia dos veículos da formulação (CHORILLI et al., 2007).

2.10 Líquidos iônicos

O termo “líquido iônico” refere-se a sais (compostos iônicos) que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C. Tipicamente, esses compostos têm excelente estabilidade química e térmica, pressão de vapor desprezável e baixa viscosidade, relativamente aos sais fundidos, e muitos deles são descritos como menos agressivos para o meio ambiente. Os LI possuem propriedades biofarmacêuticas e podem ser utilizados como solventes para moléculas, transporte de fármacos, reservatórios de fármacos, agentes antimicrobianos e antifúngicos, assim como agentes antibiofilmes (HARADA et al., 2018b; ÁLVAREZ et al., 2010; IGLESIAS et al., 2010).

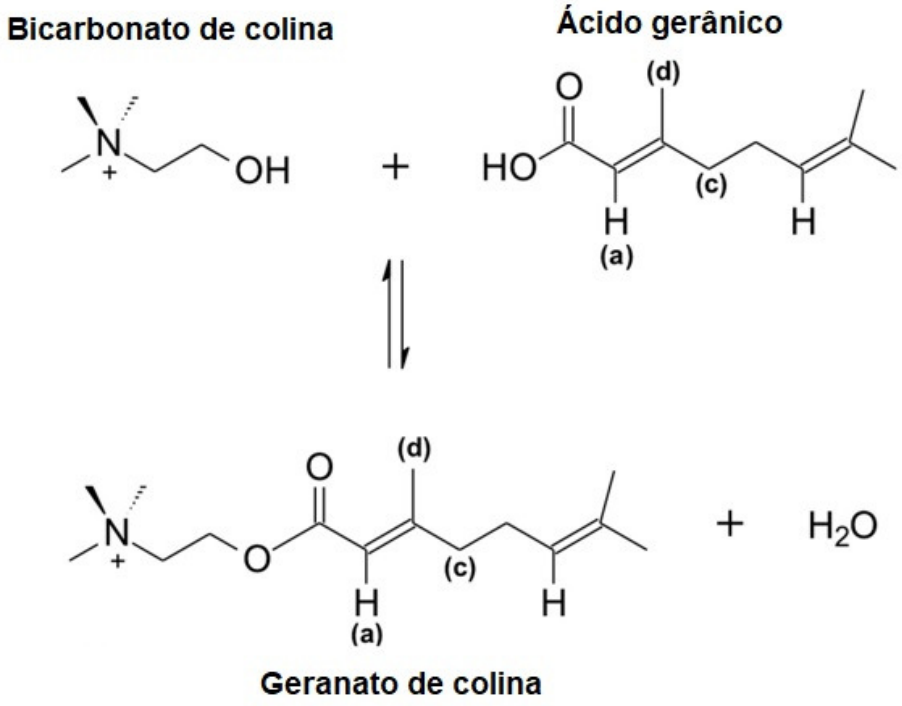
Vários LI foram sintetizados e avaliados, com o intuito de se verificar a ação antimicrobiana dos mesmos e consequente diminuição de biofilmes em modelos de feridas de pele. Os resultados obtidos mostraram que os líquidos iônicos, neste sentido, são promissores. Dentre os LI estudados, destaca-se o geranato de colina, pois o mesmo atua como um composto polivalente, exibindo excelente atividade antimicrobiana, toxicidade mínima para as células epiteliais e eficiência como facilitador de permeação na administração tópica de substâncias (ZAKREWSKY et al., 2014).

O mecanismo de ação antimicrobiana disruptiva dos LI ocorre através da ruptura da estrutura polissacarídica que compõe os biofilmes, excretados pelas bactérias. Provavelmente, as moléculas de LI deslizam entre os compostos gordurosos das células da pele, originando pequenas aberturas transientes através das quais as moléculas bioativas carreadas conseguem permear (HARADA et al., 2018a).

O LI geranato de colina tem-se mostrado promissor como facilitador da permeação cutânea, por não causar irritação à pele (HARADA et al., 2018a). Adicionalmente, estudos de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* não demonstraram

toxicidade (JORGE, 2019). A Figura 6 apresenta a reação química envolvida na síntese do LI geranato de colina.

Figura 6. Reação química da síntese de LI geranato de colina



Fonte: elaboração própria.

2.11 Géis

Os géis são definidos como um sistema semissólido que consiste numa dispersão de partículas sólidas por exemplo: resina, polímeros e derivados de celulose em veículo líquido (FERREIRA, 2002).

As substâncias que compõem os géis hidrossolúveis são macromoléculas de polímeros que facilitam a espalhabilidade. Dessa forma, os polímeros são muito utilizados na preparação de cosméticos e bases dermatológicas (QUEIROZ, 2008).

Os géis hidrossolúveis apresentam comportamento reológico pseudoplástico e tixotrópico, isto é, deformam-se quando se aplica uma força e retornam ao estado original quando cessa essa força. Por isso, a viscosidade do gel diminui quando se espalha facilitando o espalhamento e recupera a viscosidade inicial evitando que o produto escorra. Esse tipo de comportamento reológico durante o armazenamento faz com que a viscosidade seja constante, dificultando a separação dos constituintes dos

géis e tende a aumentar o prazo de validade dos produtos (AULTON, 2005).

A hidroxietilcelulose (HEC) é um polímero derivado da celulose, hidrossolúvel, que possui caráter não iônico, motivos pelos quais é considerada um veículo de interesse para ativos dermatológicos, sendo resistente a valores de pH ácido. Contudo, valores extremos de pH podem alterar a viscosidade destes géis (FERREIRA, 2002).

2.12 Estabilização de proteínas

Verificou-se, em trabalhos de pesquisa, que as proteínas quando deslocadas de seus ambientes fisiológicos podem tornar-se bastante instáveis (ALVES et al., 2017). Isto acontece devido à interrupção de interações fracas como as interações iônicas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, essenciais à manutenção das conformações arquitetónicas tridimensionais proteicas (KLIBANOV, 2016; BALCÃO e VILA, 2015). Contudo, se as condições do solvente tais como viscosidade, temperatura, pH, ionicidade e tamponamento forem alteradas, a estrutura da proteína pode ser modificada de forma significativa (MONIRUZZAMAN et al., 2010). Segundo Schröder (2017), o grau de estabilidade da proteína durante o armazenamento pode variar em alguns dias, meses ou anos, dependendo da natureza proteica ou do ambiente em que a proteína esteja armazenada.

Algumas técnicas com o intuito de estabilizar as proteínas em diferentes condições fisiológicas, tais como a modificação química, imobilização por confinamento entrópico ou em suportes macroscópicos insolúveis, modificação genética ou adição de agentes estabilizadores, foram citadas por Balcão e Vila (2015). Outra possível alternativa para promover a estabilização de proteínas é a utilização de líquidos iônicos (HARADA et al., 2018a). As características de solubilização e estabilização de moléculas, mostram que os líquidos iônicos possuem grande potencial no preparo de formulações contendo soluções de proteínas terapêuticas sem a perda da sua estrutura funcional (ZHAO, 2016; BALCÃO e VILA, 2015).

Segundo Balcão e Vila (2015), o efeito estabilizador das entidades proteicas deve-se provavelmente ao aumento da viscosidade no ambiente que circunda a proteína, ocorrendo com isso uma diminuição da migração de domínios proteicos da conformação ativa para a inativa. Essa diminuição provocada pelo aumento da viscosidade do solvente faz com que a proteína dissolvida se mantenha estabilizada

tanto do ponto de vista funcional como estrutural, o que pode ser a chave para a estabilização de qualquer entidade proteica incluíndo bacteriófagos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação em gel contendo geranato de colina como facilitador de permeação, para incorporação de um coquetel de partículas bacteriofágicas estritamente líticas, com a finalidade de tratamento de piodermites animais por permeação transdérmica.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar a bactéria *S. intermedius*, a partir de amostras clínicas veterinárias;
- Isolar, amplificar e caracterizar biológica- e físico-quimicamente bacteriófagos líticos para *S.intermedius* a partir de fontes de água de esgoto de clínicas e hospital veterinário, com produção de um coquetel de partículas fágicas;
- Sintetizar e caracterizar o líquido iônico geranato de colina;
- Desenvolver e caracterizar físicoquimicamente uma formulação de gel de hidroxietilcelulose (HEC) integrando geranato de colina e o coquetel dos bacteriófagos isolados;
- Avaliar a permeação transdérmica das partículas de bacteriófagos a partir do gel de HEC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material biológico

As amostras clínicas utilizadas para o isolamento da bactéria patogênica hospedeira (*Staphylococcus intermedius*) foram gentilmente doadas pelo Hospital Veterinário da Universidade de Sorocaba, Clínica Veterinária Iguatemi e laboratório de Diagnóstico Safari, localizados em Sorocaba (São Paulo, Brasil). Os materiais biológicos foram coletados de feridas e canal auditivo interno de animais (cães e cavalos), usando *swabs* estéreis, e colocados num meio de transporte do tipo *Cary Blair*™.

Os bacteriófagos foram isolados a partir de amostras de água de esgoto do Serviço Autônomo de Água e Esgoto de Sorocaba (SAAE-Sorocaba/SP, Brasil). As amostras do SAAE foram coletadas em 22 de Fevereiro em 2018. A amostra de água de esgoto da estação de tratamento das Águas de Araçoiaba (Araçoiaba da Serra/SP, Brasil) foi coletada em 26 de Fevereiro de 2018.

A linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) utilizada nos ensaios de citotoxicidade por difusão em ágar foi adquirida à Sigma-Aldrich (ref. SIGMA S200-05N) (St. Louis MO, EUA). As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5% CO_2, em meio de crescimento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo D-glucose (4,5 g/L), L-glutamina (584,0 mg/L), piruvato de sódio (100 mg/mL) e bicarbonato de sódio (3,7 g/L) (Gibco Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), suplementado com 10% (m/m) de soro fetal bovino e 1% (m/m) de antibióticos (penicilina (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µL/mL)).

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica. O fosfato de sódio dibásico, o fosfato de sódio monobásico e o cloreto de cálcio foram adquiridos à Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, Brasil). O sulfato de magnésio foi adquirido à Labsynth (Diadema, Brasil).

O meio de cultura *Triptic Soy Broth* (TSB) foi adquirido à Sigma – Aldrich do

Brasil (Cotia, Brasil) e o ágar sólido foi adquirido à Gibco Diagnostics (Wisconsin, USA). Para as análises de eletroforese, o tampão de disrupção foi produzido com os reagentes Trizma-Base (hidroximetilaminometano), β-mercaptoetanol, dodecilsulfato de sódio, glicerol, azul de bromofenol, tetrametiletilenodiamina e persulfato de amônio, todos adquiridos à Bio-RAD (Bio-RAD, Califórnia CA, USA).

Os marcadores moleculares Pre-Stained Precision Plus Protein™ Dual color foram adquiridos à Bio-RAD (Bio-RAD, Califórnia CA, USA). Os Sensidiscs™ para antibiograma em forma de discos impregnados com polimixina B (POL300), cefepime (CPM30), imipenem (IPM10) e meropenem (MPM10), foram foram adquiridos à DME-Diagnósticos Microbiológicos Especializados (Araçatuba, Brasil).

4.1.3 Equipamentos analíticos e outros

Para o isolamento e propagação dos bacteriófagos, os equipamentos utilizados foram: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Prismatec, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo/SP, Brasil), centrífuga Eppendorf (modelo AG 22331, Hamburgo, Alemanha).

O sistema de filtração esterilizante utilizado (Stericup™-GP, membrana de poliétersulfato (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro) foi adquirido à Merck-Milipore (Darmstadt, Alemanha).

Para purificação da água utilizou-se um equipamento Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil), com a água ultrapurificada a apresentar resistividade de 18,8 $M\Omega.cm^{-1}$ e condutividade de 0,05 $\mu S.cm^{-1}$.

Na síntese do geranato de colina utilizou-se um evaporador rotativo da BUCHI (Suíça), modelo R-215.

Para a preparação dos géis foi utilizado um agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasil).

O equipamento utilizado para as análises de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi um sistema Mini-Protean® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, USA), juntamente com uma fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-RAD, Califórnia CA, USA) e um banho seco digital também da Bio-RAD (Califórnia CA, USA).

As imagens tomográficas foram captadas por meio de um tomógrafo de transmissão de raios X de 3ª geração da Bruker micro CT (modelo SkyScan 1174, Kontich, Bélgica).

Os estudos de permeação transdérmica foram realizados em células de Franz de vidro de difusão vertical (Dry Heat Transdermal System modelo DHC-6T, Logan Instruments Corporation, Somerset, EUA).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão dos bacteriófagos foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) da Jeol (modelo JEM-1400 PLUS, Jeol, Tóquio, Japão), equipado com um filamento de hexaboreto de lantânio (LaB_6), operando a 120 kV, e equipado com câmera fotográfica com sensor CCD (Charge-Coupled Device) da Gatan Inc. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, EUA) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a aquisição digital de imagens. Os resultados (imagens e medições) foram analisados utilizando o software Digital Micrograph da Gatan Inc. (Pleasanton CA, USA). Este equipamento pertence ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

As análises de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kioto, Japão) usando radiação de raios-X provenientes de uma lâmpada de cobre com radiação Kα (λ = 1,5418 Å) filtrada através de um alvo de cobre.

A viscosidade dos géis HEC foi avaliada em viscosímetro da marca Brookfield (modelo DV-I Prime, Middleboro, USA).

A análise do pH foi realizada com peagâmetro digital de bancada da marca Analyzer-Intrumentação Eletrônica (modelo pH 300, São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação de meios de cultura

Para a preparação dos meios de cultura seguiu-se a orientação dos fabricantes e os procedimentos e determinações em microbiologia clínica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013).

Todos os meios de cultura e soluções destinados à microbiologia e materiais como Eppendorfs®, tubos de ensaio, tubos Falcon™, pinças, ponteiras de micropipetas, fitas de papel, entre outros, foram esterilizados em autoclave durante 30 minutos a 121 °C sob 1 atm de pressão.

Meio Molten Top-Ágar

Adicionou-se 15 g de TSB desidratado e 3 g de ágar em um frasco *Schott* de 500 mL de volume. Completou-se com água ultrapura para volume final de 500 mL. O meio foi autoclavado e, posteriormente, armazenado em estufa a 47 °C para mantê-lo no estado líquido.

Meio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Pesou-se 24 g de TSB e 9,6 g de ágar e adicionou-se em 800 mL de água ultrapura. Após esterilização, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri descartáveis de 9 cm de diâmetro. As placas foram armazenadas a 4 °C até utilização.

Caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Preparou-se o caldo dissolvendo-se 24 g de meio TSB em 800 mL de água ultrapura. O caldo foi esterilizado e armazenado a 4 °C até utilização.

Caldo TSB 2x (*Tryptic Soy Broth*)

Adicionou-se 48 g de TSB em 800 mL de água ultrapura num frasco Schott e esterilizou-se em autoclave. Após resfriamento, o caldo foi acondicionado em frasco Schott estéril e mantido a 4 °C.

Tampão fágico

Pesou-se 6,06 g de Trizma-Base em um gobelé de 100 mL e adicionou-se 50 mL de água ultrapura. Ajustou-se o pH desta solução com auxílio de peagâmetro digital para 7,5 por adição de HCl 1 mol dm^{-3}. Posteriormente, adicionou-se em um balão volumétrico de 1000 mL de volume: 5,8 g de NaCl, 2 g de $MgSO_4.7H_2O$ e 50 mL de solução preparada de Trizma-Base a pH 7,5. Completou-se com água ultrapura para volume final de 1000 mL. O tampão foi armazenado a 4 °C após esterilização em autoclave.

Tampão PBS (Phosphate Buffer Saline)

Preparou-se uma solução concentrada [10x] em sais: foram pesados 8,2 g de NaCl, juntamente com 1,05 g de fosfato de sódio e 0,355 g de fosfato de sódio monobásico em um balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume com água ultrapura. Para preparação do tampão PBS, 100 mL da solução concentrada [10x] foram adicionados em um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água ultrapura.

Solução salina a 0,9%

A solução salina a 0,9%, também conhecida como soro fisiológico, foi preparada pesando-se 3,6 g de NaCl e dissolvendo-se em 400 mL de água ultrapura. A solução resultante foi vertida em frasco Schott e esterilizada em autoclave. Esta solução foi armazenada a 4 °C até utilização.

4.2.2 Isolamento e caracterização da cepa bacteriana patogênica responsável por piodermites em animais

Os animais escolhidos para a coleta de amostras foram aqueles que apresentaram feridas com recidivas. O material biológico foi coletado de feridas e canal auditivo interno de animais (cães e cavalos), utilizando-se *swabs* estéreis e introduzindo-os em meio de transporte do tipo Cary Blair™. Os *swabs* foram estriados em placas de Petri contendo meio sólido TSA para crescimento e isolamento de colônias, as quais foram incubadas *overnight* a 37 °C. Depois da incubação, uma colônia (UFC) isolada foi retirada usando-se uma alça estéril e adicionada em meio liquido TSB em Erlenmeyer. Esta suspensão foi incubada *overnight* a 37 °C. Após a incubação, foram realizados testes de coloração de Gram, catalase, coagulase, fermentação do manitol, maltase e hemólise, objetivando a identificação da bactéria patogênica *Staphylococcus intermedius* que iria posteriormente servir como cepa hospedeira para o isolamento de bacteriófagos. As metodologias para a identificação da bactéria foram baseadas no Guia de Microbiologia da Anvisa (BRASIL, 2013).

4.2.3 Coloração de Gram

Colocou-se uma gota de água ultrapura em uma lâmina de vidro e, com uma alça de platina flambada na chama do bico de Bunsen retirou-se uma amostra da suspensão bacteriana. Esta amostra foi colocada na gota de água sobre a lâmina de vidro, espalhada com a alça e fixada próxima à chama do bico de Bunsen. Adicionou-se cerca de 1 mL de uma solução de cristal violeta 0,005% (m/m) sobre o esfregaço na lâmina e esperou-se cerca de 1 min. Retirou-se o excesso de corante com papel de filtro e a lâmina foi lavada com água ultrapura. Na sequência, adicionou-se cerca de 1 mL de solução de lugol e aguardou-se 1 min. Escorrido o excesso de lugol, a lâmina foi descorada com solução de álcool-acetona (1:1, v/v) e lavada com água ultrapura. A lâmina foi então corada com solução de safranina a 0,1% (m/m) por 30 segundos e lavada com água ultrapura. Depois, a lâmina foi seca cuidadosamente sem esfregar e levada ao microscópio para observação com objetiva de imersão em óleo (ampliação total de x10x100 = x1000).

4.2.4 Teste da catalase

Retirou-se uma unidade formadora de colônia (UFC) de cada amostra plaqueada em meio TSA e colocou-se em contato com uma lâmina contendo peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). O desprendimento de bolhas de CO_2 confirma a reação positiva.

4.2.5 Teste da coagulase

Uma alça contendo a suspensão da amostra da bactéria foi inserida em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho reconstituído. Verificou-se a formação de coágulo após incubação por 4 h.

4.2.6 Fermentação do manitol

Numa placa de Petri contendo o meio de cultura manitol, estriou-se uma alça com a amostra bacteriana. Após incubação da placa *overnight* a 37 °C, verificou-se a fermentação do manitol através do desenvolvimento de coloração amarela no meio.

4.2.7 Fermentação da maltase

Da placa de Petri contendo colônias em meio sólido TSA, uma UFC foi removida com a ajuda de uma alça estéril descartável e colocada em meio líquido contendo maltose. O meio líquido inoculado foi incubado a *overnight* a 37 °C. A verificação da fermentação foi confirmada pela mudança de coloração do meio.

4.2.8 Hemólise

Utilizou-se o meio de cultura Ágar-Sangue para as amostras bacterianas serem estriadas. Incubou-se *overnight* a 37 °C e verificou-se a formação de hemólise ao redor das colônias isoladas.

4.2.9 Preparação da suspensão bacteriana de *Staphylococcus intermedius*

A bactéria isolada e caracterizada conforme descrito anteriormente, foi plaqueada em superfície de meio sólido TSA em placas de Petri que foram então incubadas durante 24 h a 37 °C. Para preparação da suspensão bacteriana, uma UFC isolada da placa anterior foi inoculada num tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo estéril TSB que foi então incubado a 37 °C durante 24 h.

4.2.10 Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus intermedius* isolada

Da suspensão bacteriana preparada e incubada por 24 h, foram retirados 50 µL e inoculados em Erlenmeyer contendo 125 mL de caldo TSB, o qual foi suavemente homogeneizado por agitação orbital. Uma alíquota foi retirada no tempo 0 e a densidade óptica lida em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 610 nm. O Erlenmeyer contendo a suspensão bacteriana foi mantido armazenado a 37 °C sempre após a retirada de uma alíquota para leitura. Os resultados de densidade ótica (OD) foram convertidos em concentração de biomassa (UFC/mL), utilizando a relação empírica $OD_{610nm} = 1.0 \rightarrow$ [biomassa] $\approx 1x10^8$ UFC/mL.

4.2.11 Enriquecimento de bacteriófagos em cultura da cepa isolada de *Staphylococcus intermedius*

Retiraram-se 50 mL de amostra de água residual e colocou-se em Erlenmeyer de 250 mL de volume, adicionaram-se 50 µL de suspensão bacteriana de *Staphylococcus intermedius* (OD = 1,0) após crescimento *overnight* e 50 mL do caldo TSB 2x. O Erlenmeyer foi incubado a 37 °C durante 24 h. Este processo foi realizado para cada amostra de água residual. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (9000g, 4 °C, 10 min), os sobrenadantes cuidadosamente coletados, microfiltrados (por filtros com tamanho de poro de 0,22 µm) e armazenados em tubos Falcon estéreis.

4.2.12 Preparação do tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius,* pela técnica de *pour plate*

100 µL de suspensão bacteriana (OD = 1,0) foram adicionados a 5 mL de Molten Top-Agar, mantido a 47 °C em tubo de ensaio de 15 mL de capacidade. A suspensão resultante foi suavemente homogeneizada por agitação orbital e imediatamente vertida em placas de Petri contendo TSA sólido, as quais foram incubadas a 37 °C *overnight*.

4.2.13 Verificação da presença de bacteriófagos por *spot-test* das amostras enriquecidas

Uma gota de 10 µL do filtrado da amostra obtido na seção 4.2.11, oriundo do processo de enriquecimento de bacteriófagos, foi colocada sobre o tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius* em placa de Petri. As placas foram então incubadas *overnight* a 37 °C. Depois do período de incubação, as placas foram observadas quanto à presença de zonas claras de lise, indicativas da presença de bacteriófagos.

4.2.14 Isolamento de placas bacteriofágicas

A metodologia seguida para o isolamento, amplificação e caracterização biológica dos bacteriófagos foi descrita por Carvalho (2017).

Tiras de papel de filtro estéreis, com cerca de 1 cm x 8 cm de dimensão, foram mergulhadas na suspensão de bacteriófagos (obtida na etapa de enriquecimento). As tiras de papel foram então estriadas uma única vez em placa de Petri contendo tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius*. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. Depois da incubação, a morfologia das placas de lise foi analizada verificando-se diferenças de tamanho, presença de halos secundários, turbidez, etc. Placas fágicas diferentes foram picadas com palitos estéreis, os quais foram espetados várias vezes de forma linear em placas de Petri com ágar contendo tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius.* Os bacteriófagos com placas de morfologia diferentes foram incubados à temperatura 37 °C. A suspensão com bacteriófagos foi mantida armazenada a 4 °C.

4.2.15 Amplificação dos bacteriófagos isolados com distintas morfologias de placas fágicas

Usando um palito estéril, uma placa bacteriofágica foi picada. O palito foi espetado em linhas em 12 placas de Petri contendo o tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius.* Sem trocar a tira de papel de filtro esterilizada, esta foi passada através das picadas feitas em linha, garantindo a máxima cobertura de bacteriófagos na superfície das placas de Petri. As placas foram então incubadas a 37 °C *overnight*. Após este período de tempo, adicionou-se 5 mL de tampão fágico (40,19 mM K_2HPO_4, 22,05 mM KH_2PO_4, 85,55 mM NaCl, 1,00 mM $MgSO_4$ e 1,00 mM $CaCl_2$ em 1000 mL de água pura) a cada placa de Petri, e as placas foram isoladas com Parafilm™ e incubadas a 4 °C durante 18h com agitação orbital (50-90 rpm). Depois desse período, os fagos foram eluídos no tampão fágico e coletados em tubos Falcon, enquanto as placas de ágar foram descartadas. Ao tampão fágico contendo os fagos eluídos, foi adicionado 10% (v/v) de clorofórmio e a solução resultante centrifugada (9000 g, 4 °C, 10 min) para remover as bactérias e *debris* de parede celular. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e filtrado em membrana esterilizante (0,22 µm de tamamho de poro) em sistema de filtração *Stericup*™, tendo sido posteriormente armazenado a 4 °C. Esta suspensão foi considerada a suspensão estoque concentrada de bacteriófagos.

4.2.16 Determinação do título bacteriofágico pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada

A determinação da quantidade de partículas bacteriofágicas presentes na suspensão estoque concentrada (título fágico) é necessária para todas as etapas subsequentes envolvendo bacteriófagos. O título fágico foi determinado pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Diluições seriadas ($1x10^{-1}$ - $1x10^{-8}$) da suspensão estoque de bacteriófagos foram preparadas por adição de 100 µL da suspensão estoque em 900 µL de tampão fágico SM. Seguiram-se diluições decimais até 1,0 $x10^{-8}$. 100 µL de cada diluição da suspensão de bacteriófagos foram adicionados a 100 µL de suspensão bacteriana de *Staphylococcus intermedius* e 4 mL de molten top ágar (mantido a 47 °C). A suspensão resultante foi suavemente homogeneizada, imediatamente vertida na placa de TSA, espalhada gentilmente girando a placa de Petri em movimentos orbitais, deixada secar por cerca de 10 min dentro da cabine de segurança biológica, e a placa de Petri incubada *overnight* a 37 °C. Depois do período de incubação, as placas bacteriofágicas formadas foram contadas, considerando somente as placas de Petri com 20-200 UFP (unidades formadoras de placas). O título bacteriofágico da suspensão estoque concentrada de bacteriófagos foi calculado através da Equação (1),

$$Título\ fágico\ \left(\frac{UFP}{mL}\right) = UFP\ x\ \frac{1}{Diluição}\ x\ \frac{1}{V_{inóculo}(mL)} \quad (1)$$

onde UFP representa o número de unidades formadoras de placas e V é o volume de inóculo (mL).

4.2.17 Nomenclatura dos bacteriófagos isolados

A nomenclatura para os bacteriófagos isolados seguiu as regras determinadas pelo laboratório PhageLab:

- PhL representa “PhageLab”;
- SS-ISL representa “*Staphylococcus intermedius* de isolados clínicos”;
- ph representa “fago”;

- 00ij representa a combinação tamanho de placa fágica x fonte ambiental de isolamento, onde i=1 é o maior tamanho da placa fágica, i=2 é o tamanho médio da placa fágica, i=3 é o tamanho intermediário da placa fágica e i=4 é o menor tamanho da placa fágica; j=4 representa a fonte água de esgoto do SAAE-Sorocaba, e j=5 representa a fonte água de tratamento de esgoto das Águas de Araçoiaba.

4.2.18 Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados

4.2.18.1 Determinação da gama de hospedeiros

Utilizaram-se várias bactérias de coleção para determinação da gama de hospedeiros dos bacteriófagos isolados, pela técnica de *spot test*. Foi preparado um tapete bacteriano de cada bactéria pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Para esse efeito, 100 µL de cada suspensão bacteriana individual em fase de crescimento exponencial ($OD_{600\ nm} \approx 0,5$) foram adicionados a 5 mL de Molten top ágar (mantido a 47 °C), a suspensão resultante vertida em placa de Petri com TSA sólido, e as placas deixadas secar. Em seguida, uma gota de 10 µL de cada diluição decimal dos fagos isolados foi colocada num tapete bacteriano de uma dada bactéria de coleção e as placas incubadas *overnight* a 37 °C. Após o período de incubação,observou-se o *spot test* de cada bacteriófago quanto à presença de eventuais zonas claras de lise bacteriana. Além da bactéria isolada e caracterizada neste trabalho de pesquisa, *Staphylococcus intermedius*, as bactérias de coleção utilizadas na determinação da gama de hospedeiros foram: *Escherichia coli* CCCD-E003, *Salmonella enterica* CCCD-S004, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, *Proteus mirabilis* CCCD-P001, *Enterococcus faecalis* CCCD-E002, *Bacillus subtilis* CCCD-B010, *Staphylococcus epidermidis* CCCD-S010, *Staphylococcus aureus* CCCD-S009, *Staphylococcus aureus* CCCD-S009, *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K001, e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

4.2.18.2 Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)

A determinação da eficiência de plaqueamento foi realizada com a suspensão de bacteriófagos diluída capaz de produzir unidades formadoras de placas (UFP)

identificadas pelo ensaio s*pot test*. 100 µL da suspensão da bactéria *Staphylococcus intermedius* em fase exponencial ($OD_{600\ nm}$ ≈ 0,5) foram adicionados a 100 µL de cada diluição fágica seriada ($1x10^{-1}$ - $1x10^{-10}$, pipetando-se 100 µL de suspensão bacteriofágica e adicionando-se 900 µL de tampão fágico em tubos Eppendorf®) e a 5 mL de meio de cultura Molten top ágar e a suspensão suavemente homogeneizada e imediatamente vertida em placa de Petri contendo meio TSA sólido. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. O mesmo procedimento foi realizado com as bactérias de coleção descritas acima para as quais o *spot test* deu resultado positivo.

Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de placas (UFP) em todas as placas de Petri e calculou-se a eficiência de plaqueamento (EOP) através da Equação (2).

$$EOP\ (\%) = \frac{média\ das\ UFP/mL\ na\ bactéria\ alvo}{média\ das\ UFP/mL\ na\ bactéria\ hospedeira}\ x\ 100 \qquad (2)$$

O valor da EOP obtido na cepa hospedeira foi considerado como EOP = 100%.

4.2.18.3 Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

Para preparar a curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), foi feito o crescimento da bactéria em frasco Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio TSB, até à fase exponencial (OD_{600nm} ≈ 1,0 correspondendo a ≈$1,0x10^8$ UFC/mL). Um volume de 10 mL de suspensão bacteriana foi centrifugado a 7000g (5 min, 4 °C), o sobrenadante descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de meio TSB. A esta suspensão, foram adicionados 5 mL de suspensão bacteriofágica com título fágico de $8,0x10^5$ UFP/mL para produzir uma multiplicidade de infecção (MOI) ≤ 0,001 (MOI = número de partículas bacteriofágicas / número de células bacterianas viáveis na amostra). A suspensão resultante foi incubada com agitação durante 5 min para permitir que as partículas bacteriofágicas adsorvessem às células hospedeiras. A suspensão de 10 mL preparada (5 mL de suspensão fágica mais 5 mL da suspensão bacteriana preparada por ressuspensão do pellet em 5 mL de TSB) foi centrifugada a 7000 g (5 min, 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 10 mL de meio TSB, e incubado a 37 °C. Retirou-se uma amostra de 100 µL ao tempo 0 e realizaram-se 10 diluições seriadas, as quais foram

plaqueadas para determinação da concentração de partículas fágicas. Depois do período de incubação, as placas de lise formadas em cada diluição foram contadas, considerando somente as diluições que produziram de 20 a 200 placas fágicas. A cada 5 min de intervalo (durante um período de tempo de 90 min), amostras de 100 µL da suspensão foram retiradas, diluídas e plaqueadas como descrito.

Os resultados obtidos foram então analisados para determinar o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão (*burst size*) de cada fago na sua bactéria hospedeira. Os dados da curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) produzida foram melhor descritos por ajuste não-linear dos dados a uma curva sigmoidal típica (ou modelo de regressão logística de 4-parâmetros, 4-PL) (Equação (3),

$$Log\ (PFU/mL\ média)\ =\ m_2 + \frac{m_1 - m_2}{1+\left(\frac{t}{m_3}\right)^{m_4}} \qquad (3)$$

onde m_1 é a resposta a t = 0, m_2 é a resposta a t = ∞, m_3 é o ponto de inflexão da curva, m_4 é o declive de Hill da curva (declive que define a inclinação da curva), e *t* é o tempo (min). O ajuste não-linear dos dados de crescimento do bacteriófago ao modelo na Equação (3) foi realizado utilizando o software KaleidaGraph v. 4.5.2 para MacOS X (Synergy Software, Reading PA, EUA).

4.2.18.4 Curva de adsorção

1 mL de suspensão bacteriana (em fase de crescimento exponencial) foi infectada com suspensão de bacteriófagos para produzir uma MOI de 0,001. Esta suspensão foi incubada a 37 °C. Um valor baixo de MOI garante pelo menos um receptor na célula hospedeira para cada partícula bacteriofágica. A intervalos regulares de tempo de 1 min, com início 30 segundos após a infecção, amostras de 100 µL da suspensão foram adicionadas com 850 µL de meio TSB suplementado com 50 µL de clorofórmio e suavemente homogeneizadas por agitação orbital. A utilização de clorofórmio visa destruir as células bacterianas hospedeiras viáveis nas alíquotas. O sobrenadante de cada amostra foi então titulado para estimar a quantidade de partículas fágicas não-adsorvidas, ou reversivelmente adsorvidas, nos diferentes intervalos de tempo. A taxa de adsorção do bacteriófago ao hospedeiro foi estimada

por ajuste não-linear do modelo na Equação (4) (SANTOS et al., 2014; SHAO; WANG, 2008) ao conjunto de dados experimentais.

$$Ln\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = -\delta\left(\frac{X_0}{\mu(t)}\right)\left(e^{\mu(t)\cdot t} - 1\right) \quad (4)$$

onde P_t e P_0 são as concentrações de bacteriófago nos tempos *t* e *0*, respectivamente, δ representa a taxa de adsorção a ser estimada, X_0 representa a concentração de células bacterianas susceptíveis (não-infectadas) no tempo *0*, $\mu(t)$ representa a taxa de multiplicação da bactéria e *t* representa o tempo de infecção. O ajuste não-linear dos dados de adsorção do bacteriófago ao modelo na Equação (4) foi realizado utilizando o software KaleidaGraph v. 4.5.2 para MacOS X (Synergy Software, Reading PA, EUA).

4.2.18.5 Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)

A inactivação bacteriana pelos fagos isolados foi determinada em ensaios *in vitro* para *Staphylococcus intermedius*, a valores de MOI de 1. Culturas em fase exponencial de *Staphylococcus intermedius* foram ajustadas a uma OD = 1,0 a 600 nm (correspondendo a uma densidade celular de $1x10^5$ UFC/mL). Por forma a obter uma MOI de 1, uma cultura exponencial da bactéria (concentração final de $1x10^5$ UFC/mL) e suspensão de fago (concentração final de $1x10^5$ UFP/mL) foram inoculadas em tubos de vidro esterilizados contendo 10 mL de meio TSB e incubados a 37 °C sem agitação (BP). Para cada ensaio, duas amostras controle foram também preparadas: um controle de bactéria (BC) e um controle de fago (PC). Os controles de bactéria foram inoculados com *Staphylococcus intermedius* mas não com fago e os controles de fago foram inoculados com fago mas não com células bacterianas. Controles (BC, PC) e amostras de teste (BP) foram incubados exatamente nas mesmas condições. Aliquotas de 50 µL das amostras de teste (BP, bactéria e fago) e dos controles de bacteria (BC) e fago (PC) foram retiradas aos tempos 0 (imediatamente após o início do ensaio) e após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h de incubação. O volume coletado de cada tubo de ensaio (controles e amostras de teste) foi diluído em 450 µL de tampão PBS em tubos Eppendorf®, até oito diluições decimais consecutivas. Em todos os ensaios, o título fágico foi determinado em triplicata pelo

método de plaqueamento de gota de 10 µL em ágar de dupla camada contendo tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius* (cultura em fase exponencial, OD_{600nm} ≈ 0,5) após um período de incubação de 18 h a 37 °C. A concentração de bactéria foi determinada em triplicata em meio sólido TSA pelo método de plaqueamento por gota (10 µL) após um período de incubação de 18 h a 37 °C. Realizaram-se três ensaios independentes para cada condição.

4.2.18.6 Avaliação da suscetibilidade da cepa isolada de *Staphylococcus intermedius* frente a antibióticos e ao coquetel de bacteriófagos isolados e purificados

100 µL de suspensão bacteriana (OD_{600nm} ≈ 1,0) foram adicionados a 4 mL de Molten top ágar (mantido a 47 °C) em tubo de ensaio esterilizado de 15 mL de capacidade. O conteúdo desse tubo foi suavemente homogeneizado por agitação orbital, imediatamente vertido em placa de Petri contendo meio sólido TSA, e a placa foi deixada a secar dentro da cabine de segurança biológica. Posteriormente, discos Sensidisc™ dos antibióticos polimixina B, cefepime, imipenem e meropenem foram colocados sobre o meio em diferentes regiões da placa de Petri. Para avaliar o espectro lítico do coquetel de bacteriófagos, adicionou-se uma gota de 10 µL do coquetel dos bacteriófagos em uma outra região da placa de Petri.

4.2.19 Caracterização físico-química dos bacteriófagos isolados

4.2.19.1 Análise espectrofotométrica por varredura espectral UV-Vis

Para determinar o comprimento de onda que produz a máxima absorvância das partículas fágicas, realizaram-se varreduras UV-Vis de diluições das suspensões concentradas de fagos (100 µL de suspensão concentrada diluída a 2000 µL com tampão fágico SM) entre os comprimentos de onda de 600 nm e 190 nm.

Para a determinação do coeficiente de extinção molar das partículas bacteriofágicas isoladas, os ensaios espectrofotométricos desenvolvidos foram baseados no procedimento descrito por Rios et al. (2018). Partindo dos títulos fágicos calculados a partir de procedimentos microbiológicos, como descrito anteriormente, foram realizadas seis diluições em tampão fágico SM (até um volume total de 2000

µL) usando diferentes volumes de suspensão concentrada de bacteriófago, e a absorvância das diluições resultants foi determinada a 255 nm (para ambos os bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045) (comprimento de onda que produziu a máxima absorção das suspensões concentradas de fago) e 320 nm (comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos bacteriófagos) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados utilizados para preparar as curvas de calibração com o objetivo de determinar os coeficientes de extinção molar das partículas fágicas (inteiras) PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045.

Suspensão fágica concentrada (µL)	Volume final da diluição (µL)	Bacterió-fago	Número de UFP's na suspensão fágica concentrada	Concentração de partículas fágicas (UFP/mL)	$Abs_{255\ nm}$	$Abs_{320\ nm}$	Abs_{255nm}-Abs_{320nm}
10	2000	ph0044	$1.3692x10^{04}$	$6.84580x10^{03}$	0.0962	0.0336	0.0626
		ph0045	$1.4463x10^{05}$	$7.23150x10^{04}$	0.3198	0.0821	0.2377
25	2000	ph0044	$3.4229x10^{04}$	$1.71145x10^{04}$	0.2942	0.0968	0.1974
		ph0045	$3.6158x10^{05}$	$1.80788x10^{05}$	0.2555	0.0655	0.1900
50	2000	ph0044	$6.8458x10^{04}$	$3.42290x10^{04}$	0.5656	0.1906	0.3750
		ph0045	$7.2315x10^{05}$	$3.61575x10^{05}$	0.5112	0.1325	0.3787
100	2000	ph0044	$1.3692x10^{05}$	$6.84580x10^{04}$	0.9366	0.3105	0.6261
		ph0045	$1.4463x10^{06}$	$7.23150x10^{05}$	1.1132	0.2842	0.8290
150	2000	ph0044	$2.0537x10^{05}$	$1.02687x10^{05}$	1.6492	0.5512	1.0980
		ph0045	$2.1695x10^{06}$	$1.08473x10^{06}$	1.5163	0.3842	1.1321
200	2000	ph0044	$2.7383x10^{05}$	$1.36916x10^{05}$	2.0678	0.6954	1.3724
		ph0045	$2.8926x10^{06}$	$1.44630x10^{06}$	2.0015	0.5150	1.4865

Fonte: elaboração própria.

Realizando ajustes lineares aos dados exibidos na Tabela 01, obtiveram-se as equações Abs_{255nm} - Abs_{320nm} = $1.0149x10^{-05}$ x [Partículas fágicas, UFP/mL] para o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e Abs_{255nm} - Abs_{320nm} = $1.0520x10^{-06}$ x [Partículas fágicas, UFP/mL] para o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 e, por aplicação da equação de Beer-Lambert aos dados, obtiveram-se os coeficientes de extinção molar das partículas bacteriofágicas isoladas (inteiras): $\varepsilon_{PhL_UNISO_SS\text{-}ISL_ph0044}$ = $1.0149x10^{-05}$ $(UFP/mL)^{-1}\bullet cm^{-1}$ e $\varepsilon_{PhL_UNISO_SS\text{-}ISL_ph0045}$ = $1.0520x10^{-06}$ $(UFP/mL)^{-1}\bullet cm^{-1}$.

4.2.19.2 Análise eletroforética das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

A distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 foi investigada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando um sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (California CA, EUA) acoplado a uma unidade de fornecimento de energia PowerPac™ HC (Bio-RAD, California CA, EUA) e a um banho digital seco também da Bio-RAD. Para determinar o perfil proteico das partículas fágicas e a sua distribuição de pesos moleculares, 500 µL da suspensão estoque de cada bacteriófago (purificados) PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (contendo 4.45×10^8 virions) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (contendo 8.10×10^{10} virions) foram adicionados a um volume (500 µL) de tampão de disrupção (1.51% (m/v) Tris-Base, 0.5% (v/v) β-mercaptoetanol, 4% (m/v) dodecilsulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) glicerol, e 0.012% (m/v) azul de bromofenol) em tubos Eppendorf® (com a tampa previamente perfurada com uma agulha aquecida) e aquecidos a 100 °C durante 10 min. Então, realizou-se a análise eletroforética SDS-PAGE dos sobrenadantes das amostras (20 µL) e dos marcadores de peso molecular (5 µL de padrões *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com os padrões de proteína a variarem entre 10 kDa e 250 kDa), aplicando-se aos géis (gel de concentração, 5% acrilamida-bisacrilamida / gel de separação, 12% acrilamida-bisacrilamida) uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 60 min, após o que os géis (em duplicata) foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (permitindo assim a detecção de cerca de 70 µg de proteína). Após coloração, os géis foram fotografados em alta resolução para análise.

4.2.19.3 Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)

Difractogramas de raios-X de amostras das suspensões concentradas de bacteriófagos foram obtidos num Difractómetro de raios-X (DRX) da marca Shimadzu

(modelo XRD7000, Kyoto, Japão), usando radiação de raios-X filtrada através de um alvo de Cobre. A varredura de raios-X foi realizada a ângulos de difracção de 2-Theta (de 5º a 90º, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2°.min^{-1}), com uma voltagem de 40 kV, intensidade de corrente eléctrica de 30 mA, e potência de raios-X de 3 kW.

4.2.19.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das partículas bacteriofágicas isoladas

A preparação das grades de carbono para as análises de MET foi realizada utilizando amostras não-diluídas das suspensões concentradas de bacteriófagos, visando uma melhor observação das estruturas. Para a coloração negativa *(Negative Staining, NS)***,** as amostras foram preparadas em grades de cobre de 3 mm de diâmetro (*Ultrathin Formvar/Carbon on a 300 mesh copper grid*, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, EUA). Sobre a superfície das grades de cobre (hidrofóbicas por natureza) foram aplicadas as amostras (3 µL), seguindo-se a coloração das amostras por aplicação de 3 µL de uma solução aquosa de fosfotungstato de potássio a 2% (m/m) e pH 7.0 nas grades de cobre contendo as amostras e deixando secar ao ar. Após 30 s, o excesso de solução de fosfotungstato de potássio foi removido usando papel de filtro convencional. As análises de microscopia eletrônica foram realizadas num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da marca Carl Zeiss Microscopy GmbH (modelo LEO 906, Jena, Alemanha), equipado com um filamento de tungsténio, operando a 60 kV; o microscópio estava também equipado com uma câmera digital MORADA CCD da marca Soft Imaging System (Houston TX, EUA) com uma resolução de 11 MegaPixels e uma gama dinâmica de 14 bits (tamanho de pixel de 9 µm) para aquisição digital de imagens.

4.2.20 Síntese e caracterização do líquido iônico geranato de colina (1:1, LI; 1:2, DES)

A síntese do líquido iônico geranato de colina (GC 1:1, LI) e seu solvente eutético profundo (GC 1:2, DES) foi realizada através de reações de neutralização ácido-base descritas por Zakrewsky et al. (2014).

Síntese de geranato de colina (1:1, LI): utilizou-se uma proporção de bicarbonato de colina (cátion) para ácido gerânico (doador na ligação de hidrogênio)

de 1:1 para sintetizar um líquido iônico (LI) constituído apenas por pares de cátions e ânions. O LI foi preparado por neutralização com bicarbonato de colina. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 18,72 g ou 0,1113 mol de bicarbonato de colina puro). Na mesma proporção molar, ca. 23,12 mL de ácido gerânico a 85% foram adicionados, com um excesso de 1,88 mL (para garantir a máxima extensão da reação), resultando em um volume total de 25 mL de ácido gerânico a 85% (equivalente a 20,61 g ou 0,1220 mol de ácido gerânico puro). 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura a fim de reduzir a viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, em um sistema aberto, durante a noite, até cessar a produção de CO2. O solvente foi removido subsequentemente usando um evaporador rotativo a 60 °C, durante 20 minutos. O LI resultante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio, e o tubo imediatamente tapado e selado com Parafilm™.

Síntese de geranato de colina (1:2, DES): utilizou-se uma proporção de bicarbonato de colina para ácido gerânico de 1:2 para sintetizar um solvente eutético profundo (DES) constituído apenas por pares de cátions e ânions. A um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 18,72 g ou 0,1113 mol de bicarbonato de colina puro). Na sequência, 46,24 mL de ácido gerânico a 85% foram adicionados, com um excesso de 1,76 mL (para garantir uma extensão máxima da reação), resultando em um volume total de 48 mL de ácido gerânico a 85% (equivalente a 39,58 g ou 0,2350 mol de ácido gerânico puro). 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura de modo a reduzir a viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, em sistema aberto, durante a noite, até cessar a produção de CO_2. O solvente foi subsequentemente removido usando um evaporador rotativo, a 60° C, durante 20 minutos. O DES resultante foi transferido para um tubo Falcon com volume de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio, e o tubo imediatamente tapado e devidamente selado com Parafilm™.

4.2.21 Formulação e caracterização do gel de hidroxietilcelulose (HEC) integrando o coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina

4.2.21.1 Formulação de gel de hidroxietilcelulose (HEC)

A preparação do gel base de hidroxietilcelulose (HEC) foi realizada seguindo indicações do Formulário Nacional (Brasil, 2005). O gel HEC foi assim preparado incorporando tanto o coquetel de partículas bacteriofágicas como o geranato de colina. A constituição da formulação de gel HEC encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da formulação em gel de hidroxietilcelulose.

Gel de hidroxietilcelulose contendo coquetel de bacteriófagos e geranato de colina	
Coquetel de bacteriófagos	44,00% (m/m)
LI (1:1) ou DES (1:2)	4,00% (m/m)
HEC	2,00% (m/m)
Benzoato de sódio	0,15% (m/m)
Água ultrapura	qsp 100g

Fonte: Elaboração própria.

Para prevenir tanto o aparecimento de contaminação fúngica como bacteriana, adicionou-se benzoato de sódio à formulação de gel. A HEC e o benzoato de sódio foram solubilizados em água ultrapura a 60 °C. Depois que o gel atingiu a viscosidade adequada, ele foi arrefecido até 25 °C. Após arrefecimento, adicionou-se o coquetel de partículas fágicas e o geranato de colina (LI (1:1) ou DES (1:2)).

4.2.21.2 Avaliação do pH da formulação em gel HEC

A determinação do pH da formulação de gel HEC foi realizada num peagâmetro de bancada da marca Analyser (modelo pH 300, São Paulo, Brasil). Foi realizada a calibração prévia do equipamento com tampões de pH 7,0 e pH 4,0 antes da determinação. Para a análise do pH, a amostra foi previamente diluída a 10% (m/v) em água ultrapura.

4.2.21.3 Avaliação da espalhabilidade da formulação em gel HEC

Para esta determinação, utilizou-se um conjunto de placas de vidro com pesos pré-determinados, uma placa molde com orifício circular central de 1,2 cm de diâmetro e uma placa base. Por baixo dessa última placa foi colocado um papel quadriculado com escala milimétrica. Preencheu-se o orifício circular central com cerca de 1g de amostra de gel HEC, e nivelou-se até à superfície. Ao retirar a placa molde, foi colocada a placa de maior peso conhecido e iniciou-se a cronometragem de 1 min, em seguida mais uma placa de massa conhecida mas de menor tamanho foi introduzida. A cada diâmetro formado pelas respectivas placas, foram devidamente anotados os diâmetros médios (leitura efetuada a partir das margens do círculo formado pela espalhamento do gel através do papel milimétrico). O cálculo da espalhabilidade da formulação foi realizado através da Equação 5 (SOUZA, 2007),

$$E(i) = \frac{d^2 \times \pi}{4} \tag{5}$$

onde *E(i)* é a espalhabilidade da amostra para uma determinada massa *i* da placa de vidro, e *d* é o diâmetro médio produzido. A massa das placas de vidro foi da maior para a menor: placa 1: 162,41 g; placa 2: 135,26 g; placa 3: 95,23 g; placa 4: 61,47g ; placa 5: 34,65 g; placa-molde com orifício central: 22,91g.

4.2.21.4 Avaliação da viscosidade da formulação em gel HEC

A viscosidade da formulação em gel HEC foi determinada utilizando-se um viscosímetro da marca Brookfield (modelo DV-I Prime, Massachusetts MI, EUA) com *spindle* nº 28. O gel HEC foi colocado no coletor cilíndrico e as análises foram realizadas às rotações de 30, 50, 60 e 100 rpm a cada 5 min em cada rotação. O comportamento reológico foi analizado retornando-se à rotação inferior seguindo o mesmo tempo para cada rpm.

4.2.21.5 Análise da manutenção da viabilidade das partículas bacteriofágicas no gel HEC contendo geranato de colina

A avaliação da manutenção de viabilidade das partículas fágicas incorporadas no gel HEC contendo geranato de colina consistiu em colocar uma amostra da formulação no centro de uma placa de Petri contendo um tapete bacteriano de *Staphylococcus intermedius*. Após incubação durante 24 h a 37 °C, foi efetuada uma análise macroscópica para observar a presença (ou não) de zonas de lise no tapete bacteriano em redor das amostras.

4.2.21.6 Análise do potencial de citotoxicidade da formulação em GEL integrando geranato de colina 1:2 (DES) e o coquetel de bacteriófagos, pelo método de disco-difusão em ágar

Para a realização das análises do potencial de citotoxicidade da formulação em GEL integrando geranato de colina 1:2 (DES) e o coquetel de bacteriófagos, foi utilizada a linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados). As células foram plaqueadas em monocamada em placa de Petri de 60 mm de diâmetro contendo meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino, na concentração de $1,5x10^5$ células/mL. As células foram deixadas a crescer pelo período de 48 h a 37 °C em estufa com ambiente de 5% de CO_2.Em seguida, o meio líquido foi descartado e adicionou-se o meio sólido (meio *Eagle* concentrado 2x, contendo àgar a 1,8% (m/m) e 0,01% (m/m) de vermelho neutro como corante vital) sobre o tapete celular pela técnica de “overlay”. Após solidificação, a amostra para teste foi depositada sob um disco (o mesmo utilizado como controle negativo) no centro da placa e esta foi incubada por 24 h a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO_2. Um disco de papel atóxico foi utilizado como controle negativo, seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima. As leituras das placas inoculadas foram realizadas macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade foi constatada através do controle positivo (látex), o qual promove a formação de um halo transparente em decorrência de lise celular em torno da amostra testada (ROGERO, 2003).

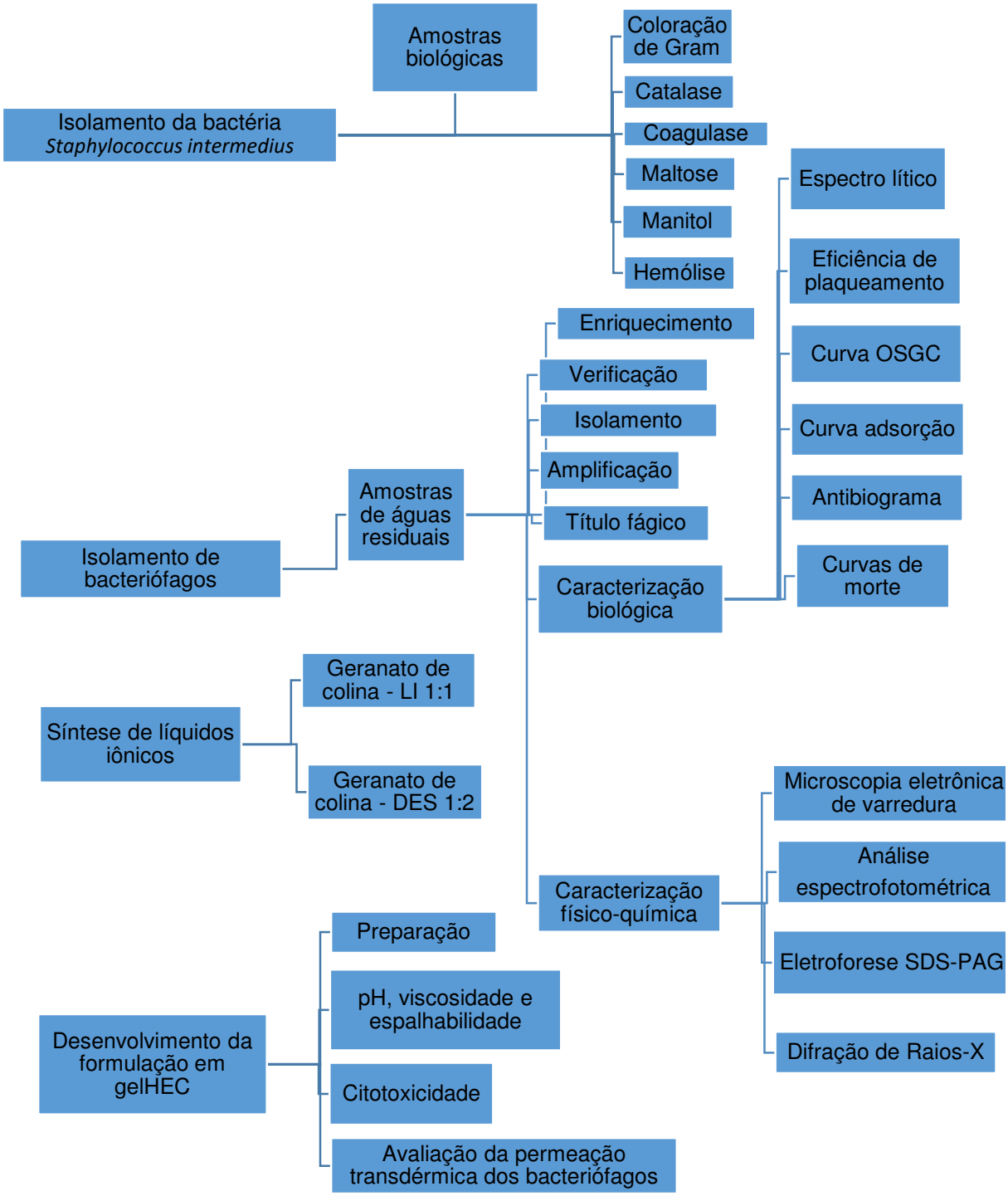
4.2.21.7 Permeação transdérmica de partículas bacteriofágicas a partir da formulação em gel HEC, assistida por geranato de colina

A permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas integradas na formulação em gel HEC contendo o líquido iônico geranato de colina (1:1 ou 1:2) foi avaliada num sistema de permeação transdérmica de Franz da LOGAN INSTRUMENTS CORP. (modelo DHC-6T, Somerset NJ, EUA). Para estes ensaios, discos de pele de orelha de porco (previamente preparada de acordo com o procedimento descrito por Salerno et al. (2010) foram cortados (com 0,5 mm de espessura x 30 mm de diâmetro) e fixados entre as câmaras receptora e doadora (no topo do suporte) da célula de difusão de Franz (possuindo um orifício central com 15 mm de diâmetro, através do qual a solução receptora contacta com a membrana de orelha de porco). No orifício desses discos e sobre a pele de orelha de porco, uma amostra (900 mg) de formulação em gel HEC contendo coquetel de bacteriófagos e geranato de colina (ou uma amostra (900 mg) de formulação em gel HEC contendo coquetel de bacteriófagos sem geranato de colina) foi cuidadosamente colocada eliminando-se a presença de quaisquer bolhas de ar, e 3 gotas de tampão fosfato (pH 7,4) foram adicionadas para hidratar o gel HEC. No receptáculo de vidro inferior da célula de difusão de Franz (possuindo uma pequena barra magnética cilíndrica revestida com teflon), 8 mL de solução salina (desgaseificada) (0,9% NaCl, m/m) foram cuidadosamente injetados até tocar a superfície inferior do disco de pele de orelha de porco. Foi tomada precaução para assegurar que nenhuma bolha de ar residisse na câmara receptora, e a pele foi esticada para minimizar a presença de rugas e sulcos. Em intervalos de tempo pré-determinados (0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 420, 540, 600 e 720 min), amostras de 200 µL da solução salina receptora sob o disco de pele de orelha de porco foram retiradas, e 200 µL de solução salina fresca foram devidamente adicionados de modo a repor o volume. Cada amostra recolhida foi então analizada quanto ao teor de partículas fágicas, para o que foi adicionada com 3-4 mL de Molten top ágar, suavemente homogeneizada e imediatamente vertida em placa de Petri contendo meio sólido TSA. As placas de Petri foram incubadas *overnight* a 37 °C e após o período de incubação foram visualmente inspecionadas para verificar a presença de placas fágicas que foram então devidamente contadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou a produção de uma formulação em gel de hidroxietilcelulose integrando um coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina como facilitador de permeação transdérmica, com o objetivo final de aplicação sobre a pele de animais para tratamento de piodermites. Neste sentido, o trabalho de pesquisa desenvolvido envolveu a realização de diversas etapas sequenciais tanto para o isolamento e caracterização do agente etiológico responsável por piodermites animais, como para o isolamento e caracterização de partículas bacteriofágicas líticas para aquele patógeno, passando pela síntese e caracterização biológica de geranato de colina 1:1 (líquidos iônico) e 1:2 (solvente eutético profundos) como potencial facilitador de permeação transdérmica, desenvolvimento de uma formulação em forma de gel de hidroxietilcelulose integrando geranato de colina para estabilização estrutural e funcional de um coquetel das partículas fágicas isoladas, e culminando com ensaios de permeação transdérmica controlada das partículas fágicas integradas na formulação em forma de gel. A Figura 7 apresenta resumidamente as etapas envolvidas neste trabalho de pesquisa.

Figura 7. Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.



Fonte: Elaboração própria.

5.1 Isolamento e caracterização da cepa bacteriana patogênica responsável por piodermites em animais

As características morfológicas avaliadas seguiram as determinações de Quinn e colaboradores (2011). O *Staphylococcus intermedius* apresenta colônias arredondadas, de coloração creme e se organiza em cachos ou agrupadas. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que todas as amostras apresentaram cepas com características da *S. intermedius*. As colônias das amostras analisadas não possuem pigmentação dourada ou alaranjada, excluindo-se dessa forma a possibilidade de ser o *Staphylococcus aureus* (GANDRA, 2003).

A amostra A3 foi excluída da pesquisa, pois apresentou a morfologia de bacilos, a qual não é uma característica do grupo *Staphylococcus intermedius.*

Em relação à capacidade de hemólise, verificou-se a presença de halos hemolíticos no cultivo das bactérias isoladas. As amostras A2, A4 e A5 apresentaram halos β-hemolíticos, enquanto as demais amostras apresentaram halos γ-hemolíticos (Tabela 3). Geralmente, o grupo de *Staphylococcus intermedius* apresenta halo beta hemolíticos.

A fermentação da maltose foi avaliada em função da variação de coloração do meio de cultura. O meio de cultura líquido no qual a amostra foi inserida contém púrpura de bromocresol como indicador. Esse indicador confere coloração arroxeada ao meio de cultura. Quando ocorre fermentação, o indicador altera a coloração do meio de roxo para amarelo. Foi observada uma mudança de coloração para a amostra A4. Para a amostra A5 a coloração alterou muito pouco, pois em condições aeróbicas a *Staphylococcus* subspécie do grupo *S. intermedius*, pode fermentar a maltose fracamente (QUINN, et al. 2011). Para as demais amostras, o resultado foi negativo.

O teste da catalase foi avaliado em função da formação e desprendimento de bolhas de CO_2. A liberação de CO_2 ocorreu de forma lenta, resultando em teste positivo para todas as amostras clínicas testadas (Tabela 3).

No teste da coagulase, observou-se a formação de coágulo. Todas as amostras deram resultado positivo neste teste, conforme indicado na Tabela 3. As amostras bacterianas possuem fator aglutinante (coagulase) ligado à parede celular ou na forma livre, capaz de reagir com o fibrinogênio e formar a fibrina aglutinante.

Pelos resultados obtidos (Tabela 3), a amostra A5, originária de ferida de cavalo, apresentou todas as características de identificação para *Staphylococcus intermedius*, em conformidade com o descrito por Quinn et al. (2011).

Devido à dificuldade em se proceder à identificação fenotípica das subespécies do grupo *Staphylococcus intermedius* por testes bioquímicos, a confirmação das subespécies pode ser realizada através da reação em cadeia multiplexada da polimerase (PCR-multiplex) (SASAKI et al.,2010).

Tabela 3. Identificação por testes bioquímicos das bactérias isoladas nas amostras coletadas de clínicas e hospitais veterinários. (A1) amostra do canal auditivo do ouvido de cachorro; (A2) amostra de ferida de focinho de cachorro; (A3) amostra do canal auditivo do ouvido de cachorro, (A4) amostra de ferida de perna de cachorro, (A5) amostra de ferida de tornozelo de cavalo.

AMOSTRA	COLORAÇÃO DE GRAM	COLÔNIAS	TESTE DA COAGULASE	TESTE DA CATALASE	TESTE DA HEMÓLISE	TESTE DO MANITOL	TESTE DA MALTOSE
A1	+	*Coccus* agrupados em cacho; Cor creme	+	+	γ-hemólise	-	-
A2	+	*Coccus* agrupados em cacho; Cor creme	+	+	β-hemólise	+	+
A3	+	Bacilos	_	_	γ-hemólise	_	_
A4	+	*Coccus* agrupados em cacho; Cor creme	+	+	β-hemólise	+	+
A5	+	*Coccus* agrupados em cacho; Cor creme	+	+	β-hemólise	-	+

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus intermedius* isolada

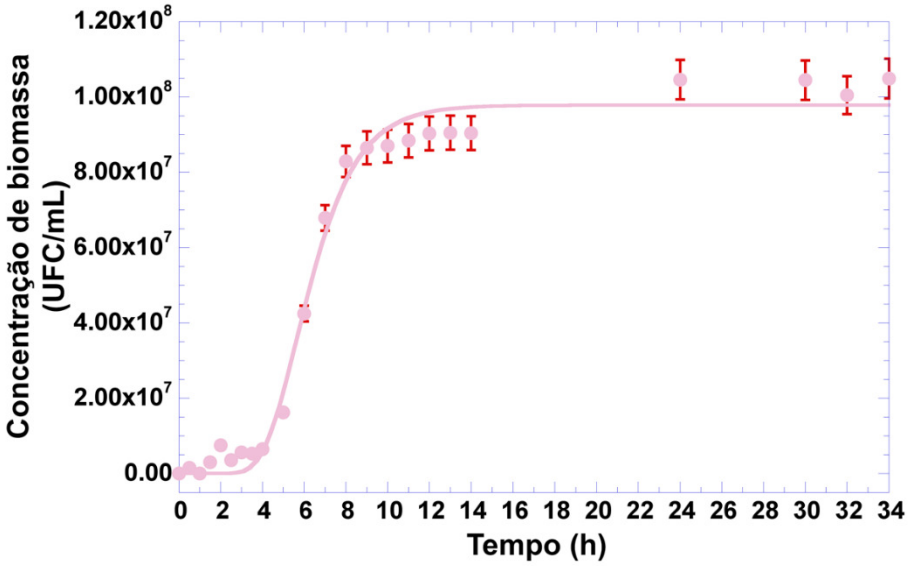
As características de crescimento de uma bactéria são fundamentais para se conhecer o seu comportamento. Em particular, o conhecimento do período em que a bactéria cresce de forma exponencial permite estabelecer o período temporal de contato que favorece a interação entre bacteriófago e bactéria hospedeira, para que ocorram as etapas de infecção da bactéria hospedeira pelo bacteriófago lítico e

consequente ciclo lítico que resulta na liberação de toda a progenia vírica para o exterior e consequente amplificação da concentração de partículas bacteriofágicas.

A primeira etapa no ciclo de amplificação de um bacteriófago é a sua adsorção a receptores específicos à superfície da célula bacteriana susceptível. Sabe-se que esta etapa varia bastante com o estado fisiológico da célula hospedeira. Um aumento na superfície celular, um grande número e densidade de receptores na superfície da célula hospedeira e uma maior mobilidade das bactérias serão refletidos na taxa de adsorção do bacteriófago (SANTOS et al., 2014). Neste sentido, deve-se conhecer o comportamento de crescimento da célula hospedeira, como já mencionado.

Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que depois de 2 h de crescimento, a bactéria deixou o período de latência e a biomassa aumentou exponencialmente. Após o tempo máximo de 10 h de crescimento exponencial a bactéria entrou na fase estacionária.

Figura 8. Crescimento da bactéria isolada na amostra A5.



Fonte: Elaboração própria.

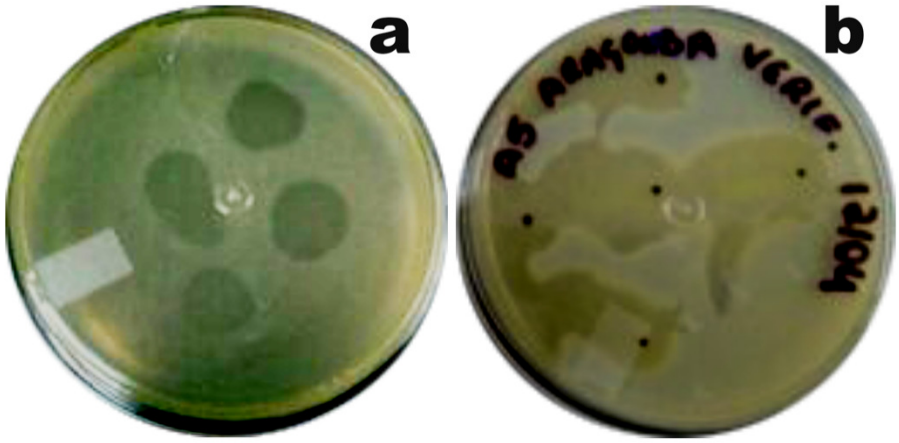
5.3 Isolamento de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius*

A primeira etapa no trabalho de obtenção de bacteriófagos reside no seu isolamento a partir de fontes ambientais, nomeadamente águas residuais e de esgoto. Para tal, torna-se necessário o enriquecimento das amostras de água residuais por adição de um pequeno volume de cultura da bactéria hospedeira, com a finalidade de

aumentar a concentração de partículas bacteriofágicas líticas e facilitar o seu isolamento, pois para se conseguir isolar fagos em amostras ambientais exige-se uma concentração relativamente alta dessas partículas, o que nem sempre é viável, pois apenas um volume limitado de amostra ambiental pode ser usado em uma placa de Petri. Neste sentido, é necessária a etapa de enriquecimento (HYMAN, 2019).

Para verificar a presença de bacteriófagos nas amostras foi realizado um *spot test* (ou teste da gota) num tapete bacteriano da cepa hospedeira, para observar potenciais zonas de lise indicativas da presença de bacteriófagos. Na Figura 9a, que apresenta resultados obtidos no *spot test* após enriquecimento de amostra de água de esgoto coletado da estação de tratamento do SAAE-Sorocaba, observaram-se zonas de lises claras. A Figura 9b, que apresenta resultados obtidos no *spot test* após enriquecimento de amostra de água coletada da estação de tratamento das Águas de Araçoiaba também produziu zonas claras de lise no tapete bacteriano. O método utilizado aumentou a probabilidade de detectar e isolar os bacteriófagos presentes nas amostras ambientais. As lises bacteriofágicas apresentadas na Figura 9 mostraram que as fontes ambientais testadas foram positivas para partículas bacteriofágicas líticas para o hospedeiro do grupo *Staphylococcus intermedius* escolhido. Os resultados obtidos indicaram que as águas residuais ou de esgoto são fontes interessantes na procura por bacteriófagos de interesse (HARADA et al., 2018b).

Figura 9. Ensaio de s*pot test* para verificação da presença de bacteriófagos nas amostras de águas residuais (a) SAAE-Sorocaba e (b) Águas de Araçoiaba após enriquecimento.

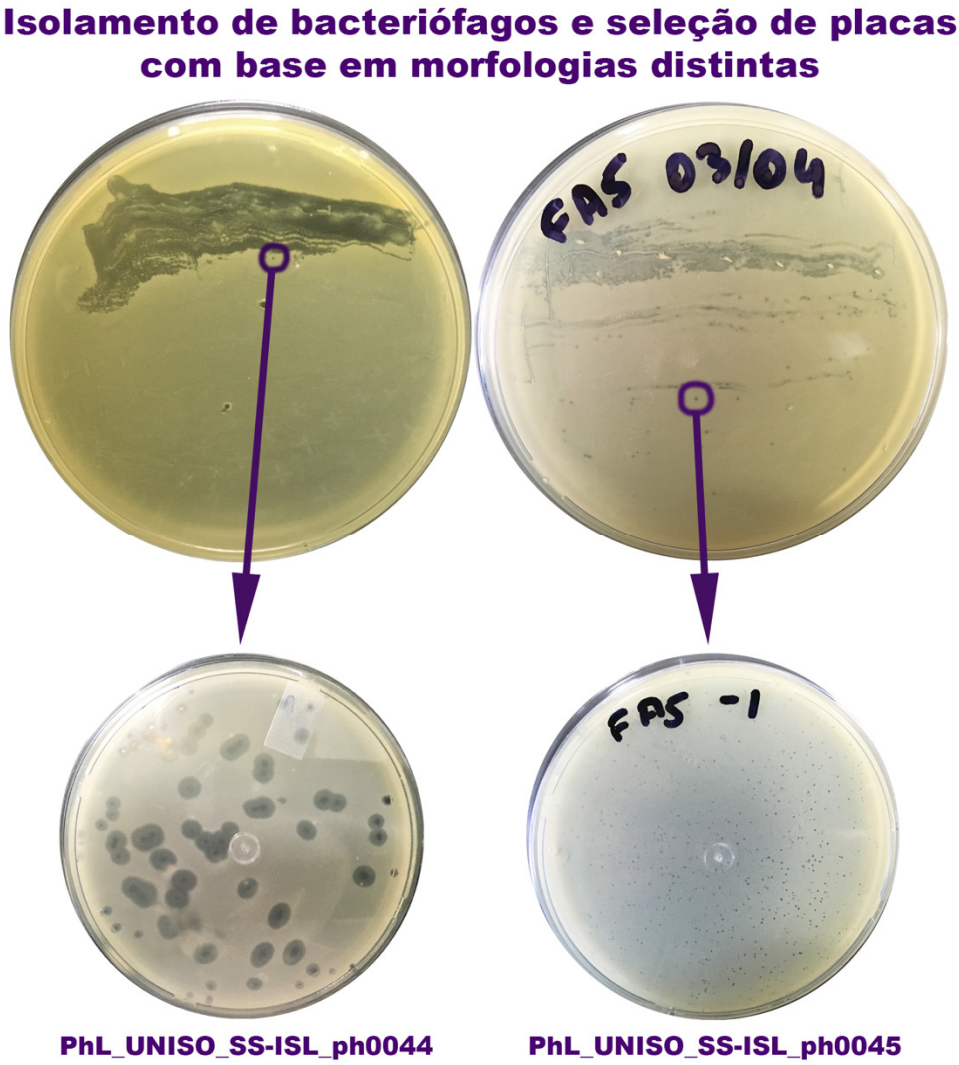


Fonte: Elaboração própria.

Considerando então a presença detectada de bacteriófagos líticos para *Staphylococcus intermedius* nas amostras ambientais testadas, a próxima etapa consistiu no seu isolamento. Foram feitas estrias com uma tira de papel de filtro esterilizado umedecida com as amostras enriquecidas, em uma placa de Petri contendo um tapete da bactéria hospedeira a fim de diluir e obter zonas de lise (placas fágicas) isoladas dos fagos presentes nas amostras (Figura 10).

Para o sucesso do isolamento dos bacteriófagos também foi necessário avaliar características que possam diferenciá-los. Assim, a morfologia das placas fágicas foi observada quanto a diferentes tamanhos, presença de halo secundário, placa fágica límpida e translúcida, placa fágica turva, etc. As características morfológicas das placas fágicas estão relacionadas com diferentes tipos de bacteriófagos, sendo uma forma de caracterização inicial no isolamento de diferentes bacteriófagos (MARTINS; MARTINS, 2014). Pode ser observado na Figura 10 a presença de placas fágicas com diferentes morfologias, indicando potenciais diferentes bacteriófagos líticos para a bactéria hospedeira. Os fagos foram nomeados como PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045.

Figura 10. Resultados obtidos com as amostras de água enriquecidas em bacteriófagos, da água de esgoto do SAAE-Sorocaba (Sorocaba/SP, Brazil) e da água de esgoto da estação de tratamento Águas de Araçoiaba (Araçoiaba da Serra/SP, Brazil), mostrando diferentes morfologias das placas fágicas produzidas. Foram selecionadas duas placas fágicas diferentes, sendo uma denominada PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e outra denominada PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (PhL-UNISO representa "PhageLab-UNISO"; SS-ISL representa "Staphylococcus intermedius" de isolados clínicos veterinários; ph00ij representa a fonte ij do fago, onde i=4 representa um tamanho de placa fágica muito pequeno, j=4 representa a fonte "esgoto do SAAE-Sorocaba", e j=5 representa a fonte "água residual da estação de tratamento Águas de Araçoiaba da Serra).



Fonte: Elaboração própria.

Após a etapa de isolamento, os bacteriófagos foram amplificados na etapa de amplificação e purificados. Por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, a amplificação do fago selecionado exige a sua incubação com as células hospedeiras específicas. Desta etapa, obtêm-se não apenas bacteriófagos, mas também debris celulares bacterianos, partículas fágicas incompletas, metabolitos bacterianos secundários, bactérias não-infectadas, resíduos do meio de cultura e outros

compostos não desejados. Por esse motivo, a purificação é uma etapa essencial (LOBA, 2014). Na sequência, os fagos devem ser separados das bactérias não lisadas e debris de parede celular das bactérias lisadas assim como de outros componentes do meio. A recuperação do fago pode ser realizada através da indução da lise das células hospedeiras não-infectadas recorrendo ao auxílio de solventes orgânicos como o clorofórmio, para onde os debris celulares e outros contaminantes particionam. Neste trabalho de pesquisa, a purificação dos bacteriófagos foi efetuada pelo processo de filtração esterilizante em sistema filtrante SteriCup™, uma vez que é um processo simples, contudo pode deixar passar endotoxinas que, por ventura, possam estar presentes (LOBA, 2014).

5.4 Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados

Para a caracterização biológica dos bacteriófagos isolados, avaliou-se o título das suspensões fágicas (concentração em partículas bacteriofágicas), a gama de hospedeiros e a eficiência de plaqueamento (EOP) para avaliação do potencial de infecção da bactéria pelos fagos isolados, a curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) para determinação do período de eclipse, do período latente, do período de acumulação intracelular e do tamanho de explosão (*burst size*) de cada fago na sua bactéria hospedeira, a curva de adsorção para determinação da taxa de adsorção dos bacteriófagos nas células bacterianas hospedeiras, e as curvas de morte da bactéria hospedeira a dois valores distintos de MOI para avaliação do potencial dos fagos isolados na inativação da bactéria. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos fagos isolados foi também verificada através das curvas de morte da bactéria ao longo de um período de ensaio de 24 h.

5.4.1 Título das suspensões fágicas.

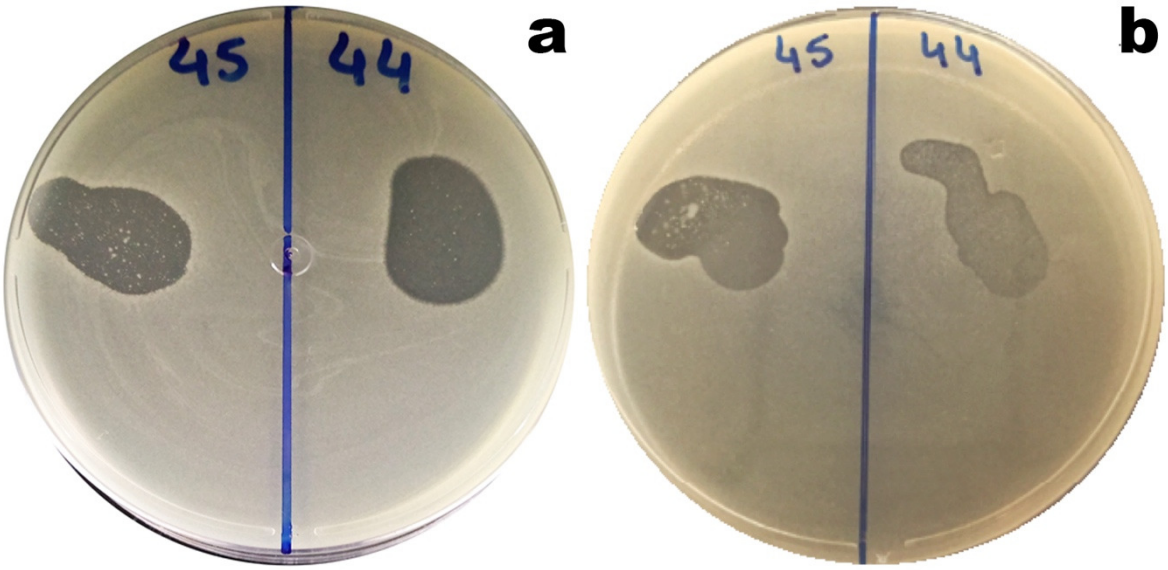
Para a determinação dos títulos das suspensões fágicas foram efetuadas diluições decimais seriadas das suspensões dos fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, tendo as mesmas sido plaqueadas pelo método do ágar de dupla camada. Foram determinados os números de unidades formadoras de placas (UFP) para cada diluição, sendo que somente para diluições superiores a 10^{-2} foi possível contar o número de placas fágicas. Cada UFP corresponde a uma

partícula fágica. Assim, por aplicação da Equação (1), a média das concentrações das partículas fágicas foi de 8.90×10^{8} vírions/mL e 1.62×10^{11} vírions/mL para os bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, respectivamente.

5.4.2 Determinação da gama de hospedeiros

Os espectros líticos dos dois bacteriófagos foram analisados por inspeção visual de zonas claras de lise após plaqueamento (*spot test* com gotas de 10 µL) em tapetes bacterianos produzidos com cepas bacterianas de coleção. Os resultados dos *spot test* indicam a capacidade dos bacteriófagos isolados infectarem outras células bacterianas para além das células hospedeiras. As placas foram caracterizadas quanto à transparência, moderada transparência e turbidez. Com base na sua performance, os bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 produziram zonas de lise claras no tapete bacteriano da cepa hospedeira conforme verificado anteriormente na Figura 11. O halo secundário pode ser observado nas placas fágicas do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044, indicativo da provável produção de endolisinas bacteriofágicas. De todas as cepas bacterianas de coleção testadas para além do seu hospedeiro natural, *Staphylococcus intermedius*, ambos os bacteriófagos apresentaram especificidade para *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados obtidos na avaliação da gama de hospedeiros podem ser encontrados na Figura 11 e na Tabela 4.

Figura 11. Resultados obtidos no *spot test* dos fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 na cepa hospedeira de *Staphylococcus intermedius* **(a)** e na cepa de coleção *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K001 **(b)**.



Fonte: Elaboração própria.

5.4.3 Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)

A eficiência de plaqueamento (EOP) é o número relativo de placas fágicas que a suspensão estoque de um dado bacteriófago é capaz de produzir numa cepa bacteriana diferente do seu hospedeiro bacteriano específico. A EOP permite assim avaliar o potencial dos bacteriófagos para infectarem e lisarem outras bactérias para além das suas células hospedeiras específicas (MIRZAEK; NILSSON, 2015). Os resultados obtidos na determinação da eficiência de plaqueamento dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 nas cepas bacterianas para as quais o *spot test* deu resultado positivo podem ser encontrados na Tabela 4.

Tabela 4. Gama de hospedeiros dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 determinada em 11 estirpes bacterianas. Zona de lise clara (+) e zona sem lise (-). A eficiência de plaqueamento com a cepa hospedeira foi considerada como EOP = 100%.

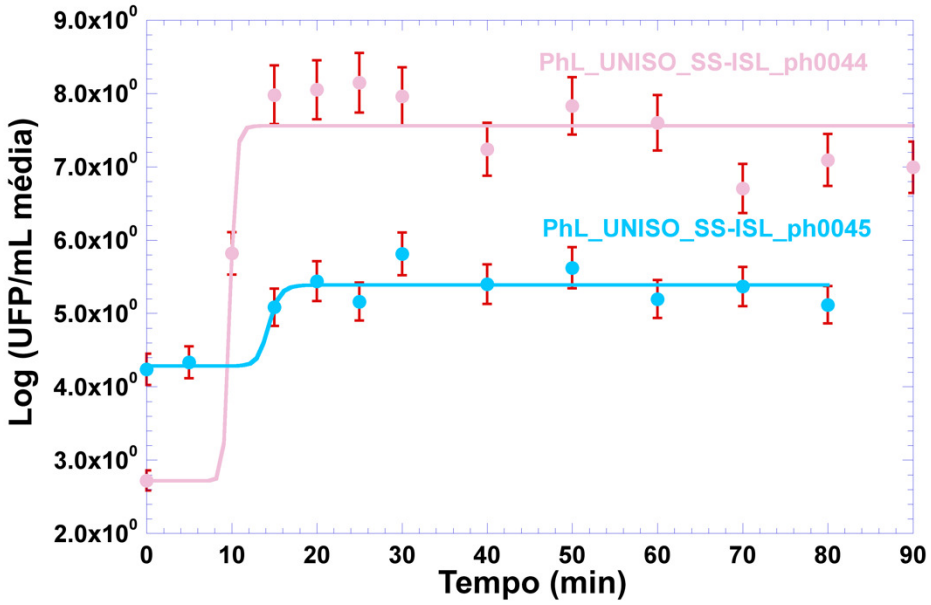
Cepa bacteriana	Fago ph44 *Spot test*	Fago ph45 *Spot test*	Fago ph44 EOP (%)	Fago ph45 EOP (%)
Staphylococcus intermedius (hospedeiro)	+	+	100,00	100,00
Acinetobacter baumannii ATCC 19606	-	-	-	-
Bacillus subtilis CCCD-B010	-	-	-	-
Escherichia coli CCCD-E003	-	-	-	-
Enterococcus faecalis CCCD-E002	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae CCCD-K001	+	+	1,97	12,55
Pseudomonas aeruginosa CCCD-P004	-	-	-	-
Proteus mirabilis CCCD-P001	-	-	-	-
Staphylococcus aureus CCCD-S009	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis CCCD-S010	-	-	-	-
Salmonella enterica CCCD-S004	-	-	-	-

Fonte: Elaboração própria.

5.4.4 Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

As OSGC dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 podem ser encontradas na Figura 12. A bactéria hospedeira *(S. intermedius)* foi utilizada na fase exponencial de crescimento (OD_{600nm} ≈ 0,1, correspondendo a ≈$1x10^8$ UFC/mL) e o título da suspensão dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 foi ajustada a 8×10^5 UFP/mL (produzindo assim uma MOI ≤ 0.001).

Figura 12. Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 no seu hospedeiro bacteriano (Staphylococcus intermedius).



Fonte: Elaboração própria.

A partir dos resultados obtidos e representados na Figura 12 foi possível determinar o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão (burst size) dos dois bacteriófagos na cepa hospedeira.

Na curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), o período de eclipse representa o tempo após a penetração do fago com biossíntese e montagem dos vírions maduros. O período latente representa o tempo depois da penetração do bacteriófago para a liberação dos vírions maduros, englobando a lise das células bacterianas. O número de vírions por célula infectada representa o tamanho de explosão, ou *burst size*. A diferença entre o período latente e o período de eclipse representa a fase de acumulação intracelular (STEPHENS et al., 2013).

Os resultados experimentais obtidos para as curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), na forma de uma típica curva sigmoidal, foram melhor ajustados via ajuste não-linear de um modelo logístico de 4 parâmetros. Estimou-se o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão como sendo 8 min, 12 min, 4 min e 4.84×10^0 partículas virais por célula bacteriana para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044, e 12 min, 16

min, 4 min e $1.10x10^0$ partículas virais por célula bacteriana para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, conforme pode ser observado na Figura 12.

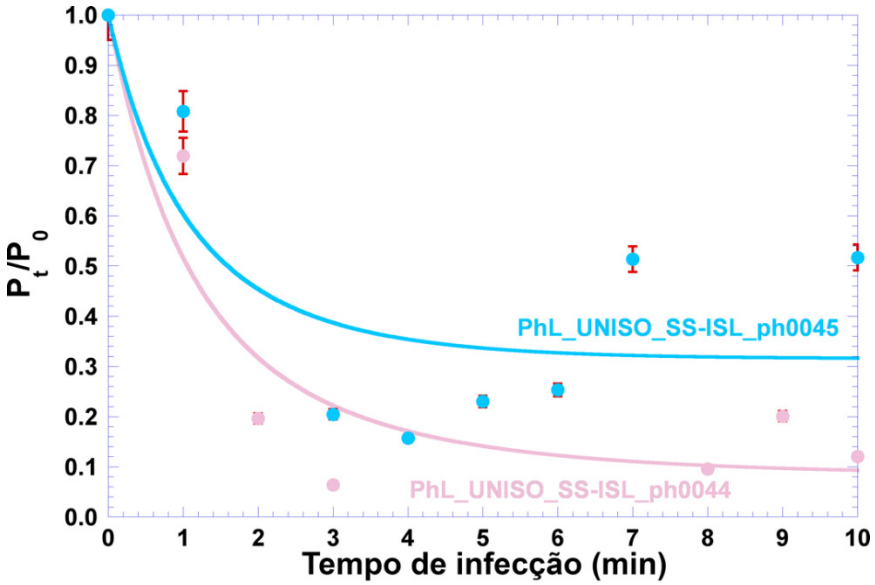
Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa estão em clara concordância com resultados obtidos por Jansen et al. (2018) para o bacteriófago T4 e por Merabishvili et al. (2014) que estudou dois bacteriófagos altamente líticos contra *Acinetobacter baumannii*.

5.4.5 Curvas de adsorção

O primeiro passo para a infecção da célula bacteriana por uma partícula bacteriofágica é a ligação/ancoragem do bacteriófago à superfície da célula hospedeira susceptível (JIN et al., 2012). O processo de ligação do bacteriófago ao hospedeiro envolve uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e indução de mudanças conformacionais em proteínas receptoras à superfície da célula hospedeira (HARADA et al. (2018b).

Os resultados obtidos para as curvas de adsorção dos dois bacteriófagos isolados, PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, podem ser encontrados na Figura 13.

Figura 13. Curvas de adsorção dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 no seu hospedeiro bacteriano (*Staphylococcus intermedius).*



Fonte: Elaboração própria.

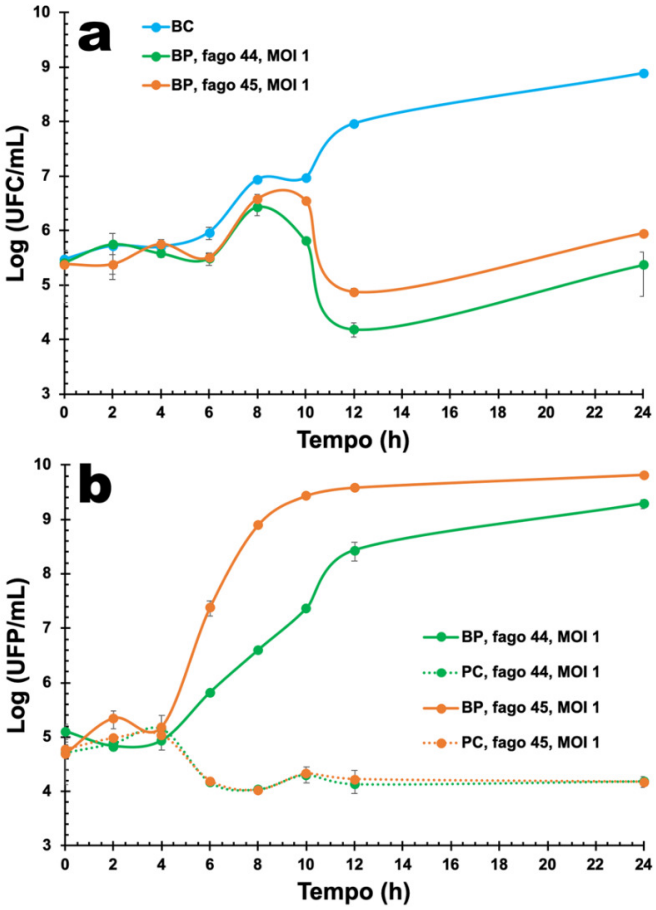
A principal dificuldade na medição de taxas de adsorção do bacteriófago à sua célula hospedeira reside no fato de que o processo de adsorção se inicia a partir do crescimento do bacteriófago. Posteriormente, o bacteriófago será liberado da célula hospedeira interferindo então na determinação da fração não-adsorvida (DELBRÜCK, 1940). O processo de adsorção do bacteriófago à sua célula bacteriana hospedeira depende da concentração de sulfato de magnésio (MOLDOVAN et al., 2007). Estes pesquisadores descobriram que o processo de adsorção do bacteriófago depende fortemente da concentração de $MgSO_4$ numa forma altamente não-linear. Para baixas concentrações de $MgSO_4$ (< 10^{-4} mol dm^{-3}) quase não existe adsorção, sendo que a adsorção do bacteriófago aumenta até atingir um máximo global a uma concentração de $MgSO_4$ de cerca de $3x10^{-2}$ mol dm^{-3}. Para concentrações mais elevadas de $MgSO_4$ (> 0.1 mol dm^{-3}), a adsorção diminui rapidamente. No trabalho de pesquisa aqui descrito, a concentração de $MgSO_4$ foi mantida a 1 mmol dm^{-3}. Os resultados obtidos por Moldovan et al. (2007) sugerem que a afinidade de ligação de um bacteriófago ao receptor na superfície da sua célula hospedeira é a força motriz para o processo de infecção, o qual é mais crítico em *habitats* naturais onde a taxa de colisão entre bacteria e bacteriófago é baixa. Assim, para assegurar uma infecção bem sucedida da sua célula hospedeira, a capacidade de se ligar fortemente ao receptor torna-se um atributo significativo. A taxa de adsorção dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 nas células de *S.intermedius* foi estimada por ajuste não-linear dos dados experimentais ao modelo representado na Equação (4), produzindo um valor para a taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas igual a δ = $1,5487x10^{-08}$ UFP^{-1} UFC^{-1} mL^{-1} hr^{-1} e uma taxa de multiplicação de bactéria igual a $\mu(t)$ = 0,31012 hr^{-1} para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (X_0=$4,974x10^7$ UFC/mL; ($r_{ajuste\ não\text{-}linear}$=0.94057)), e um valor para a taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas igual a δ = $1,2901x10^{-08}$ UFP^{-1} UFC^{-1} mL^{-1} hr^{-1} e uma taxa de multiplicação de bactéria igual a $\mu(t)$ = 0,57612 hr^{-1} para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (X_0=$5,153x10^7$ UFC/mL; ($r_{ajuste\ não\text{-}linear}$=0.83117)). O estabelecimento de um perfil de adsorção mostrou que após 5 min mais de 90% das partículas do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 tinham adsorvido às células do hospedeiro (ver Figure 13), e que após 5 min mais de 60% das partículas do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 tinham adsorvido às células do hospedeiro (ver Figura 13). Os resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito estão em estreita concordância com resultados publicados por JANSEN

et al.,2018;SANTOS et al.,2014; SHAO e WANG, 2008; e LINDBERG et al.,2014 para bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de fontes ambientais, e por Jin et al.,2012 para bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* isolados de várias amostras de água (esgoto municipal, água de lago com peixes, e água de rio) coletadas de diferentes locais na província de Zhengzhou (China).

5.4.6 Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)

A densidade das células de *S. intermedius* no BC aumentou 3,4 log UFC/mL durante 24 h de incubação (Figura 14a).

Figura 14. *Inativação de* S. intermedius *pelos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 a uma MOI de 1 durante 24 h.* ***(a)*** *Concentração bacteriana: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago;* ***(b)*** *Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio padrão.*



Fonte: Elaboração própria.

A máxima inativação de *Staphylococcus intermedius* com o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 foi de 3,8 log UFC/mL (Figura 14a), atingida ao fim de 12 h de incubação, quando comparada com o controle de bactéria (BC). No entanto, após 12 h de incubação, a taxa de inativação de *Staphylococcus intermedius* com o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 diminuiu para 3.5 log UFC/mL, provavelmente devido à aquisição de resistência a este fago pela bacteria (comprovado pelo ligeiro aumento de concentração bacteriana em presença do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044). Em relação ao fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, após 12 h de incubação, a inativação bacteriana foi de 3.1 log UFC/mL (*Staphylococcus intermedius* com o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, BP). No entanto, após 12 h de incubação, a taxa de inativação de *Staphylococcus intermedius* com o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 diminuiu para 2.9 log UFC/mL (Figura 14a), provavelmente devido à aquisição de resistência a este fago pela bacteria (também comprovado pelo ligeiro aumento de concentração bacteriana em presença do fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045).

De acordo com vários autores, o desenvolvimento de resistência ao fago pode ser ultrapassado pelo uso de um coquetel de fagos contendo diferentes fagos contra a mesma espécie bacteriana (PEREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; DUARTE et al., 2018; COSTA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019). Em trabalhos futuros, será necessário avaliar o potencial desenvolvimento de mutantes resistentes de *Staphylococcus intermedius* usando suspensões de um único fago e coquetéis de fagos.

Os controles de fago (PC) permaneceram constantes ao longo de todos os ensaios, para ambos os fagos. Após incubação dos fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 com o hospedeiro *Staphylococcus intermedius*, observou-se um aumento acentuado na concentração de partículas dos fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (5,1 e 5,6 log UFP/mL, respetivamente) (Figura 14b).

5.5 Caracterização físico química dos bacteriófagos isolados

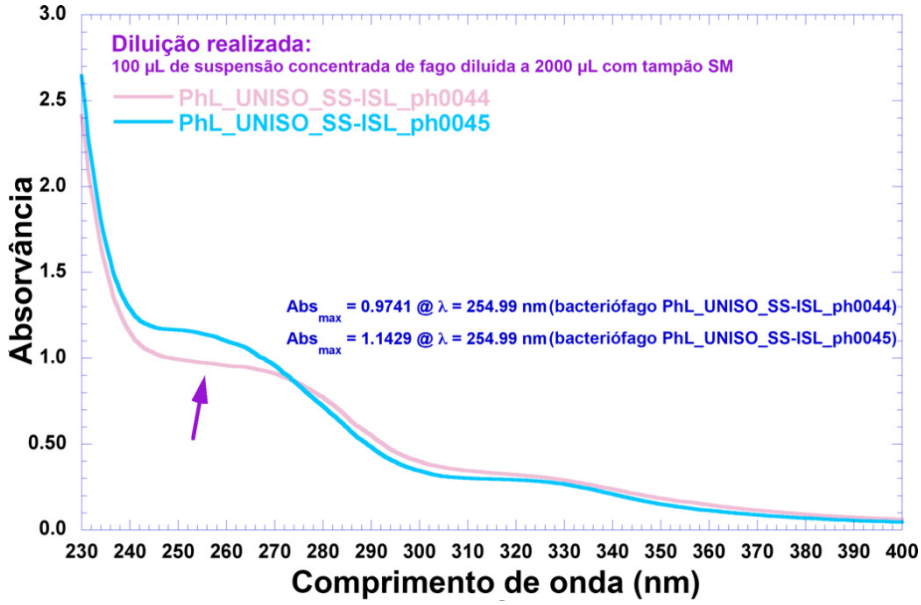
As partículas bacteriofágicas isoladas foram caracterizadas físico-quimicamente via espectrofotometria UV-Vis para determinação do coeficiente de extinção molar, por eletroforese SDS-PAGE para análise do perfil de proteínas estruturais, por

difração de raios-X e por microscopia eletrônica de transmissão para análise das características morfológicas e estruturais das partículas fágicas.

5.5.1 Análise espectrofotométrica por varredura espectral UV-Vis

Os resultados obtidos a partir das varreduras espectrais UV-Vis realizadas às suspensões concentradas de bacteriófagos estão exibidos na Figura 15. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro UV-Vis da marca Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

Figura 15. Varredura spectral UV-Vis das suspensões concentradas de bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045.



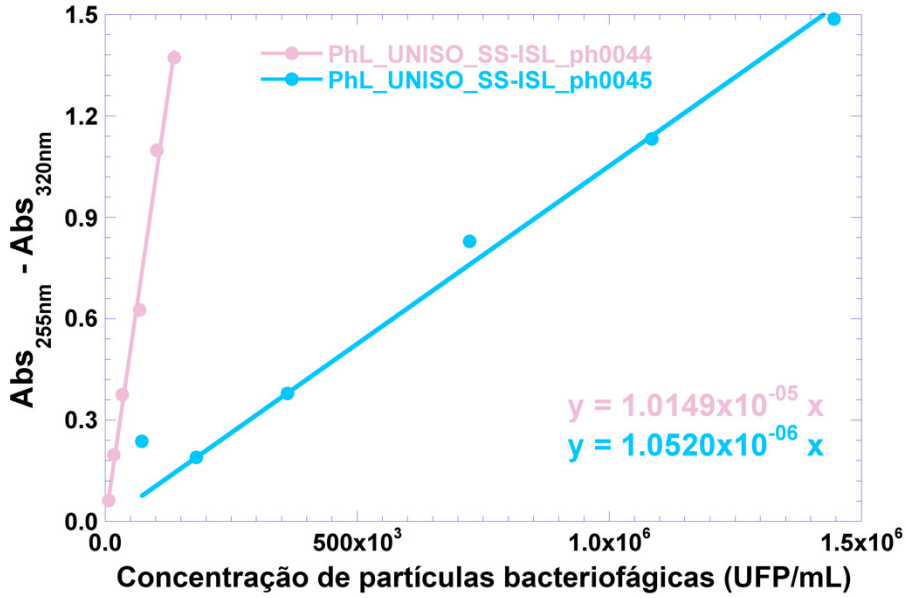
Fonte: Elaboração própria.

Por inspeção da Figura 15, um mínimo de absorção pode ser observado em torno de 245 nm para ambos os bacteriófagos; quando este mínimo está ausente do espectro, muito provavelmente estão presentes contaminantes das células bacterianas (debris celulares e proteínas intracitoplasmáticas liberadas por lise celular bacteriana) nas suspensões, o que normalmente ocorre quando estas contêm poucos virions. Ainda que não muito pronunciado, este não foi o caso, todavia, com as duas suspensões concentradas de fagos.

As curvas de calibração produzidas com o objetivo de determinar os coeficientes de extinção molar das partículas bacteriofágicas (inteiras) isoladas (isto é ε =

$1.0149x10^{-05}$ $(UFP/mL)^{-1}$•cm^{-1} para o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e ε = $1.0520x10^{-06}$ $(UFP/mL)^{-1}$•cm^{-1} para o fago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045), encontram-se exibidas na Figura 16.

Figura 16. Curvas de calibração produzidas para a relação entre a concentração de partículas bacteriofágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 258 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para os fagos isolados PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, permitindo determinar os seus coeficientes de extinção molar.



Fonte: Elaboração própria.

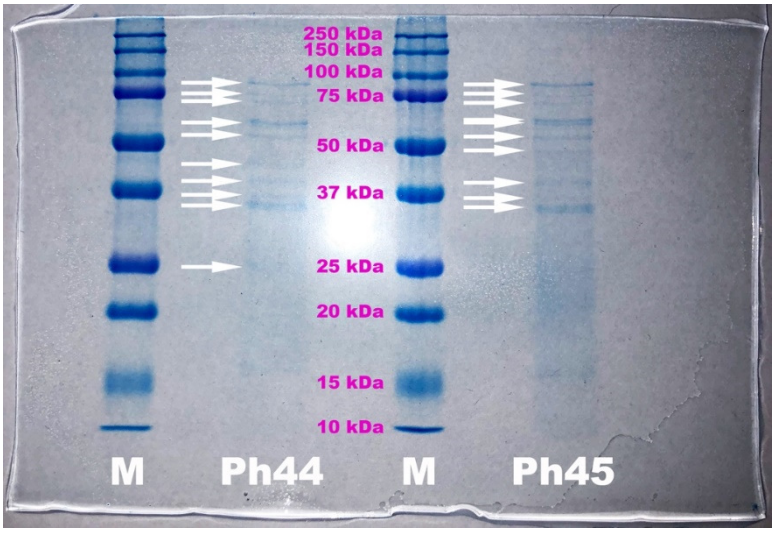
A subtração da absorvância a 320 nm (A_{320}), um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos bacteriófagos, destina-se a corrigir de maneira grosseira a dispersão da luz a partir de partículas de bacteriófagos e contaminantes particulados não-bacteriofágicos (como por exemplo debris celulares).

5.5.2 Análise eletroforética das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

A Figura 17 exibe os resultados da análise electroforética por SDS-PAGE dos sobrenadantes, obtidos após aquecimento a 100 °C de 500 µL das suspensões concentradas dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (lane Ph44) e

PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (lane Ph45) na presença de β-mercaptoetanol e dodecilsulfato de sódio (lane M, marcadores de peso molecular de gama alargada). O electroforetograma corado com Coomassie na Figura 17 permitiu produzir uma curva de calibração para as proteínas na lane de marcadores de peso molecular (lane M), resultando na equação linear $Log_{10}(MW,kDa) = -1.5560xR_f + 2.2377$ (r^2=0.94241). As suspensões de bacteriófagos concentradas e purificadas exibiram uma ampla variedade de bandas de proteínas (ver setas inseridas na Figura 17) com gamas de pesos moleculares muito parecidas. O tratamento térmico das suspensões de bacteriófagos na presença de SDS e β-mercaptoetanol atacou as ligações de dissulfetos da estrutura secundária e terciária das proteínas estruturais dos bacteriófagos, e por isso as lanes Ph44 e Ph45 exibem uma grande quantidade de bandas devido à mistura de peptídeos com diferentes pesos moleculares.

Figura 17. Electroforetograma corado com Coomassie dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (lane Ph44) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (lane Ph45), e dos marcadores de peso molecular (lane M).



Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado por inspeção do electroforetograma corado com Coomassie exibido na Figura 17, as suspensões concentradas dos dois bacteriófagos (lanes Ph44 e Ph45) exibiram uma gama alargada de bandas proteicas. Após cálculo da mobilidade relativa de tais bandas e aplicando a curva de calibração resultante da distribuição de bandas proteicas dos marcadores de peso molecular (lane M), obtiveram-se os pesos moleculares para as proteínas estruturais dos dois bacteriófagos (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (lane Ph44) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (lane Ph45).

Bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044		**Bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045**	
Rf	**MW (kDa)**	**Rf**	**MW (kDa)**
0.133	107.5	0.144	103.3
0.160	97.4	0.160	97.4
0.171	93.6	0.177	91.7
0.215	79.9	0.210	81.5
0.243	72.3	0.218	79.1
0.298	59.4	0.243	72.3
0.331	52.7	0.271	65.5
0.354	48.7	0.331	52.7
0.381	44.1	0.365	46.8
0.497	29.1	0.387	43.2

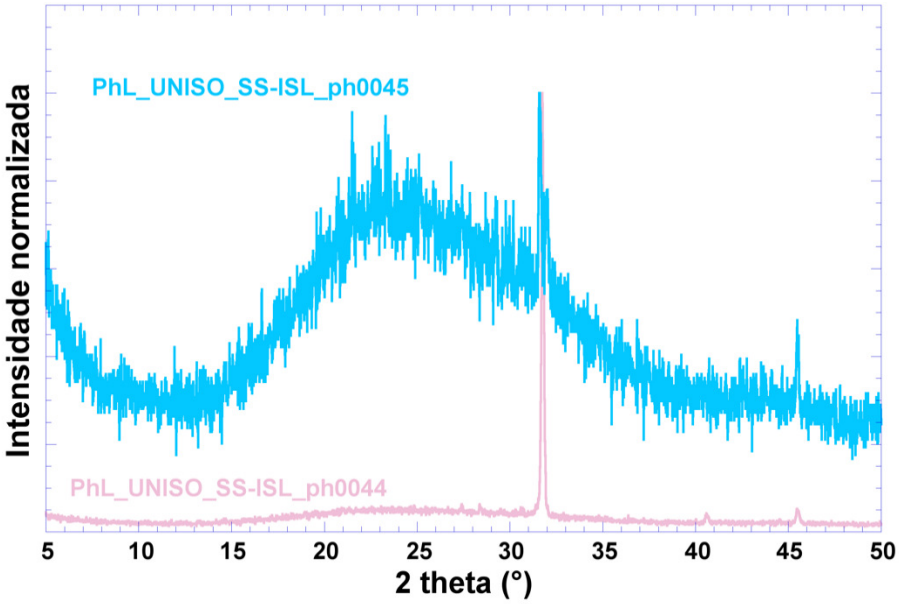
Fonte: Elaboração própria.

Ainda que os pesos moleculares das bandas proteicas exibidos na Tabela 5 sejam consistentes com resultados publicados por Lu et al. (2013), Shen et al. (2012) e Lin et al. (2010), é importantes lembrar que a coloração com Coomassie permite a determinação/visualização de bandas proteicas com quantidades de proteína superiores a 70 µg, enquanto que a coloração com prata permite a determinação/visualização de bandas proteicas com quantidades de proteína tão pequenas quanto 7 µg. Assim, a coloração dos electroforetogramas de SDS-PAGE com prata deveria ser uma melhor abordagem, permitindo detectar pequenas proteínas em quantidades diminutas, ainda que provavelmente pudesse ocorrer emborratamento devido ao elevado número de bandas (ROCHA et al., 2017). Os resultados obtidos permitem claramente concluir que as partículas bacteriofágicas isoladas são na verdade diferentes, uma conclusão também suportada pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão efetuadas àquelas partículas bacteriofágicas.

5.5.3 Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)

Os resultados obtidos a partir das análises por difração de raios-X realizadas às suspensões concentradas dos dois bacteriófagos podem ser encontrados na Figura 18 na forma de difractogramas normalizados, e permitem observar vários picos de cristalinidade.

Figura 18. Difractogramas de raios-X (DRX) de amostras das suspensões concentradas de bacteriófagos (PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044: curva rosa-claro; PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045: curva azul).



Fonte: Elaboração própria.

O padrão de raios-X pode ser utilizado para confirmar se a amostra a ser analisada é cristalina ou amorfa. O padrão de difração de amostras amorfas exibe um "halo" achatado com poucos máximos. Não obstante o fato do padrão desse "halo" não permitir identificar o material em escrutínio de forma inequívoca, permite todavia confirmar que o material é amorfo, o que é uma informação crítica necessária para a caracterização (Young, 2012). A equação de Scherrer (Scherrer, 1918) (Equação (6)), em estudos de difracção de raios-X, relaciona o tamanho de partículas sub-micrométricas, ou cristalitos, num sólido com alargamento de pico num padrão de difracção. É utilizada na determinação do tamanho de partículas de cristais na forma de pó. Os estudos de difracção de raios-X permitem medir o tamanho, forma e estresse interno de pequenas regiões cristalinas.

$$\tau\ (nm) = \frac{\mathrm{K} \times \lambda}{FWHM \times \cos(\theta)} \tag{6}$$

Utilizando a equação de Scherrer, onde τ e λ têm as mesmas unidades de medida (nm), FWHM é a largura completa a meia-altura do pico em rad, K é um fator de forma adimensional (0.94), e θ é metade do ângulo de Bragg em rad, e observando na Figura 18 que aparecem três picos de cristalinidade no difractograma de raios-X

do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044, a $2\theta=31.74°$, $2\theta=40.58°$ e $2\theta=45.46°$, e cinco picos de cristalinidade no difractograma de raios-X do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, a $2\theta=21.50°$, $2\theta=23.30°$, $2\theta=31.58°$, $2\theta=32.00°$ e $2\theta=45.48°$, tomando em consideração que o comprimento de onda de raios-X utilizado foi igual a 1,5418 angstrom (0,15418 nm) e convertendo todos os ângulos de graus para radianos, então os cristalitos detectados aos valores de 2θ mencionados possuem os tamanhos prováveis de $\tau_{2\theta=31.74°}$=43.16nm, $\tau_{2\theta=40.58°}$=44.27nm e $\tau_{2\theta=45.46°}$=45.02nm para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044, e $\tau_{2\theta=21.50°}$=42.26nm, $\tau_{2\theta=23.30°}$=42.39nm, $\tau_{2\theta=31.58°}$=43.15nm, $\tau_{2\theta=32.00°}$=43.19nm e $\tau_{2\theta=45.48°}$=45.02nm para o bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045. A equação de Scherrer é útil para comparações qualitativas, e apenas quando os cristalitos têm um tamanho inferior a 1000 Å. A precisão da equação de Scherrer para determinação do tamanho de cristalitos é, todavia, limitada em parte pela incerteza no valor de FWHM, o alargamento de difração pura deduzido experimentalmente (Alexander and Klug, 1950). A equação de Scherrer estipula que o alargamento integral é inversamente proporcional ao tamanho aparente, e apenas inclui alargamento de linhas que seja inteiramente causado por efeitos de tamanho (Scardi et al., 2004). A normalização da intensidade nos difractogramas das suspensões concentradas (secas) dos bacteriófagos foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor máximo de intensidade em cada difractograma (Figura 18), permitindo assim uma melhor comparação entre os picos de cristalinidade nos difractogramas de raios-X. O difractograma do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 exibiu um ruído bem pequeno, com picos muito bem definidos na região de $30.00 \leq 2\theta \leq 47.00$. Pelo contrário, o difractograma do bacteriófago PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 mostrou-se com bastante ruído, exibindo no entanto picos muito bem definidos na região de $20.00 \leq 2\theta \leq 47.00$. Os picos bem definidos produzidos nos padrões de difracção dos dois bacteriófagos pelo espalhamento de raios-X pelas estruturas cristalinas servem como uma assinatura para o material que é analisado (Mbonyiryivuze et al., 2015).

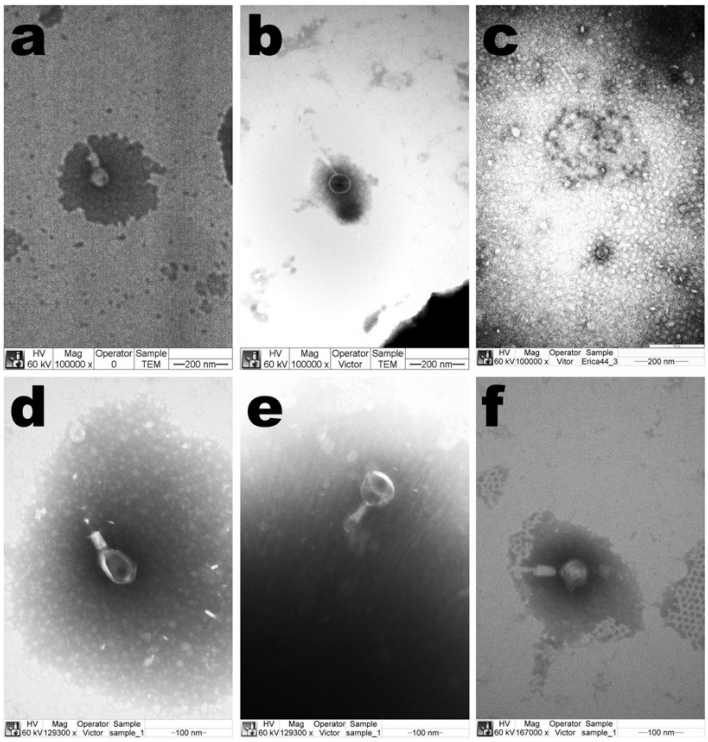
5.5.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das partículas bacteriofágicas isoladas

A preparação das grades de carbono foi realizada utilizando amostras não-

diluídas das suspensões concentradas de bacteriófagos, almejando uma melhor observação das estruturas fágicas. A coloração das partículas fágicas foi realizada com fosfotungstato de potássio a 2% (m/m) e pH 7.0. O processo de coloração das partículas envolve uma secagem suave das amostras ao ar após a aplicação de 3 µL de uma solução aquosa de fosfotungstato de potássio a 2% (m/m) e pH 7.0 sobre a grade de cobre contendo a amostra. Ainda que muito suave, essa secagem é suficiente para promover uma ligeira deformação das partículas fágicas, e isto pode de fato ser claramente observado nas fotomicrografias da Figura 19. Não obstante este fato, as análises de MET após a coloração negativa das amostras permite a observação das partículas fágicas com um bom contraste (Figura 19).

As fotomicrografias exibidas na Figura 19 permitem a observação da estrutura dos dois bacteriófagos isolados, PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 (Figura 19a-c) e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 (Figura 19d-f). Uma inspeção cuidadosa das fotomicrografias permite concluir que ambas as partículas bacteriofágicas isoladas têm cauda e portanto pertencem à família de bacteriófagos com dsDNA (pertencendo muito provavelmente à família *Myoviridae*).

Figura 19. Fotomicrografias de coloração negativa obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das suspensões concentradas dos bacteriófagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 **(a, b, c)** e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045 **(d, e, f)**, a diferentes ampliações.



Fonte: Elaboração própria.

5.6. Avaliação da suscetibilidade da cepa isolada de *S.intermedius* frente a antibióticos e ao coquetel de bacteriófagos isolados e purificados

A cepa isolada a partir de amostras clínicas veterinárias foi independentemente testada quanto à susceptibilidade aos antibióticos Polimixina B, Cefepima, Imipenem e Meropenem, junto com a susceptibilidade ao coquetel produzido com os dois fagos PhL_UNISO_SS-ISL_ph0044 e PhL_UNISO_SS-ISL_ph0045, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 20.

Figura 20. Resultados do antibiograma realizado à cepa isolada de *S.intermedius* e espectro lítico do coquetel de bacteriófagos, após a aplicação de discos de meropenem, imipenem, cefepime e polimixina B, e uma gota de 5 µL do coquetel de bacteriófagos integrando 200 µL de suspensão concentrada de cada bacteriófago.

Fonte: Elaboração própria.

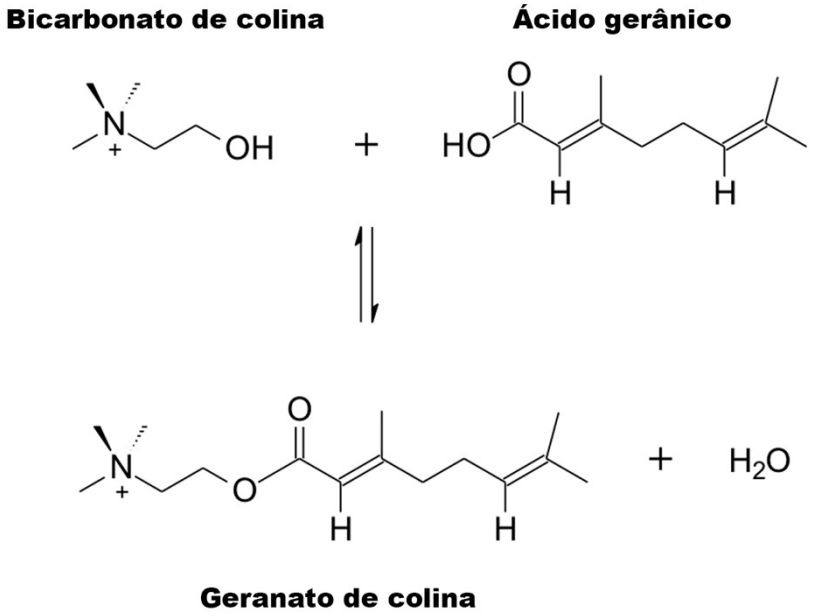
Como pode ser observado por inspeção da Figura 20, a cepa isolada de *S. intermedius* foi susceptível ao Meropenem, Imipenem e Cefepima, e moderadamente resistente à Polimixina B. Adicionalmente, a cepa isolada foi susceptível ao coquetel de bacteriófagos produzido, com o coquetel de fagos a produzir um halo turvo de lise. Isto pode ser mais uma indicação de que as partículas bacteriofágicas isoladas podem ser adequadas para a produção de um coquetel mortal direcionado para a espécie

bacteriana isolada.

5.7. Síntese e caracterização do líquido iônico geranato de colina (1:1, LI; 1:2, DES)

Foi utilizado um rácio de bicarbonato de colina (cátion) para ácido gerânico (dador na ligação de hidrogênio) de 1:1 para sintetizar o líquido iônico (LI) geranato de colina, enquanto um rácio de bicarbonato de colina (cátion) para ácido gerânico (dador na ligação de hidrogênio) de 1:2 foi usado para sintetizar o seu solvente eutético profundo (DES), de acordo com o esquema reacional respresentado na Figura 21.

Figura 21. Esquema reacional seguido para a síntese do geranato de colina, partindo de bicarbonato de colina (cátion) e ácido gerânico (dador na ligação de hidrogênio) a diferentes razões molares (1:1, LI geranato de colina; 1:2, DES geranato de colina).



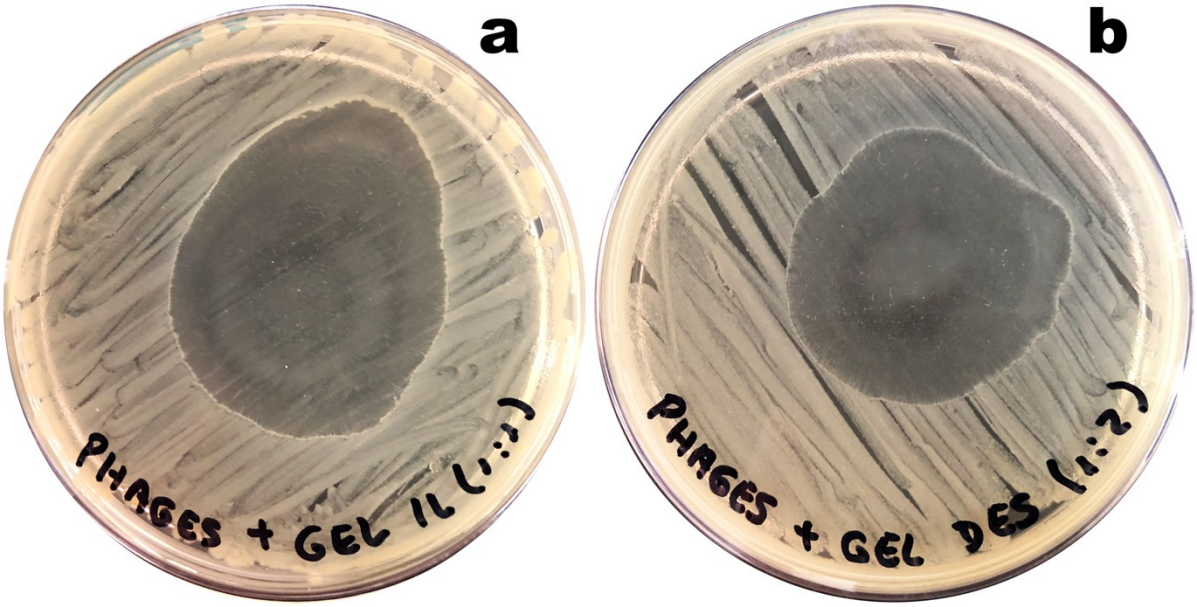
Fonte: Elaboração própria.

Em ambas as reações, foi produzida água como produto secundário da reação, a qual foi devidamente removida por evaporação em baixo vácuo num evaporador rotativo.

5.8 Análise da manutenção da viabilidade das partículas bacteriofágicas no gel HEC contendo geranato de colina

A estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas no interior da matriz de gel HEC com características plásticas foi conseguida por integração do coquetel de partículas bacteriofágicas na referida matriz de HEC após a sua gelificação e adição de geranato de colina, e a sua viabilidade lítica foi avaliada após integração na matriz polimérica. Independentemente do líquido iônico em escrutínio, os ensaios de viabilidade fágica consistiram em colocar uma matriz de gel HEC contendo o coquetel de fagos e CG1:1 e outra matriz de gel HEC integrando o coquetel de fagos e CG1:2, sobre um tapete bacteriano de *S. intermedius* em placas de Petri, e subsequente incubação das placas a 37 ºC durante 24 a 48 h. Após o período de incubação, realizou-se uma análise macroscópica às placas, para observar a presença de zonas de lise bacteriana promovidas pelas partículas fágicas imobilizadas/estabilizadas. O aspecto macroscópico do tapete bacteriano foi analisado para as duas matrizes HEC, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 22.

Figura 22. Resultados da avaliação da manutenção da atividade lítica das partículas bacteriofágicas após integração na matriz HEC biorreativa e concomitante estabilização da sua estrutura e funcionalidade.(a) gel HEC incorporado de LI (1:1) e coquetel de fagos; (b) gel HEC incorporado de DES(1:2) e coquetel de fagos.



Fonte: Elaboração própria.

A avaliação da manutenção de viabilidade lítica das partículas fágicas imobilizadas na matriz HEC envolveu a observação de fenômenos de lise, resultantes da actividade bacteriofágica sobre um tapete bacteriano produzido com o seu hospedeiro bacteriano específico. Analisando as duas matrizes biopoliméricas exibidas na Figura 22, foi claro que nenhum líquido iônico impactou negativamente na atividade lítica das partículas fágicas, uma conclusão suportada pelas zonas claras de lise produzidas em ambos os tapetes bacterianos (Figura 22). Isto indicou que as partículas fágicas imobilizadas, responsáveis pelos fenômenos de lise observados, estavam viáveis e retiveram a sua atividade lítica, uma conclusão também suportada por resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (Rios et al., 2018). Não obstante o fato de que os ensaios microbiológicos revelaram a manutenção de viabilidade lítica das partículas fágicas imobilizadas, a microarquitetura da matriz HEC com um elevado grau de plasticidade não afetará negativamente o acesso das partículas fágicas ao seu hospedeiro, providenciando tanto uma difusividade melhorada das partículas fágicas no interior da matriz HEC como uma maior difusividade da bactéria em direção ao interior do gel HEC. Não obstante, as partículas bacteriofágicas retiveram a sua atividade lítica após serem integradas no interior da matriz gelificada de HEC, com consequente estabilização da sua estrutura e funcionalidade.

5.9 Formulação e caracterização do gel de hidroxietilcelulose (HEC) integrando o coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina

Os resultados obtidos nas análises de pH, espalhabilidade e viscosidade realizadas ao gel HEC contendo liquido iônico geranato de colina (1:2) e coquetel de partículas fágicas, podem ser encontrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos nas análises físico-químicas realizadas ao gel HEC contendo geranato de colina (1:2) e coquetel de partículas bacteriofágicas.

Parâmetro	Resultado obtido
pH	5,83
Espalhabilidade	4147,30 mm
Viscosidade	2407 cP

Fonte: Elaboração própria

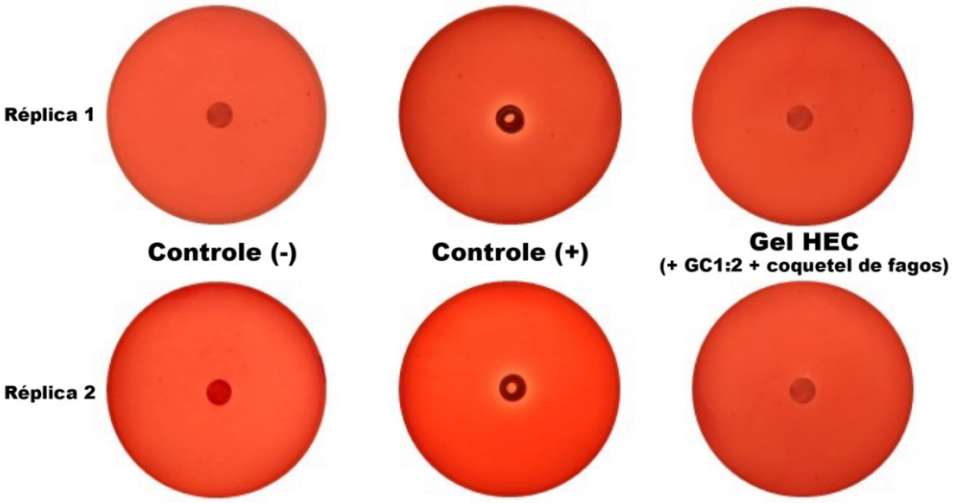
O gel HEC base manteve a sua estabilidade na gama de valores de pH entre 2,0 a 12,0, não alterando sua viscosidade. Adicionalmente, a pele de um cão sadio apresenta pH entre 5,86 a 6,45 (BRIONES et al., 2004) e a pele do cavalo apresenta pH entre 4,8 e 6,8 (LIMA, 2016). Assim, o pH da formulação produzida apresenta-se biocompatível com a pele dos animais, o que não implicará futuramente no desenvolvimento de irritação local pelo produto.

Relativamente à viscosidade, o gel HEC apresentou um comportamento reológico pseudoplástico e tixotrópico. Quando foi aplicada uma força de cisalhamento no viscosímetro, o gel apresentou diminuição da sua viscosidade, sendo que quando essa força foi cessada a viscosidade retornou ao valor original (AULTON, 2015). A vantagem deste comportamento reológico favorece a espalhabilidade da formulação durante a aplicação, evitando que o produto escorra.

5.9.1 Análise do potencial de citotoxicidade da formulação em GEL integrando geranato de colina 1:2 (DES) e o coquetel de bacteriófagos, pelo método de disco-difusão em ágar

Para a realização destas análises, foi utilizada a linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados). Os resultados obtidos podem ser encontrados na Figura 23.

Figura 23. Resultados obtidos nas análises do potencial de citotoxicidade pelo método de disco-difusão em ágar com células HaCaT, do gel HEC integrando GC1:2 e coquetel de partículas fágicas. Controle (-): água; Controle (+): látex; Gel HEC: geranato de colina (1:2) e coquetel de fagos incorporados na matriz do gel de hidroxietilcelulose.



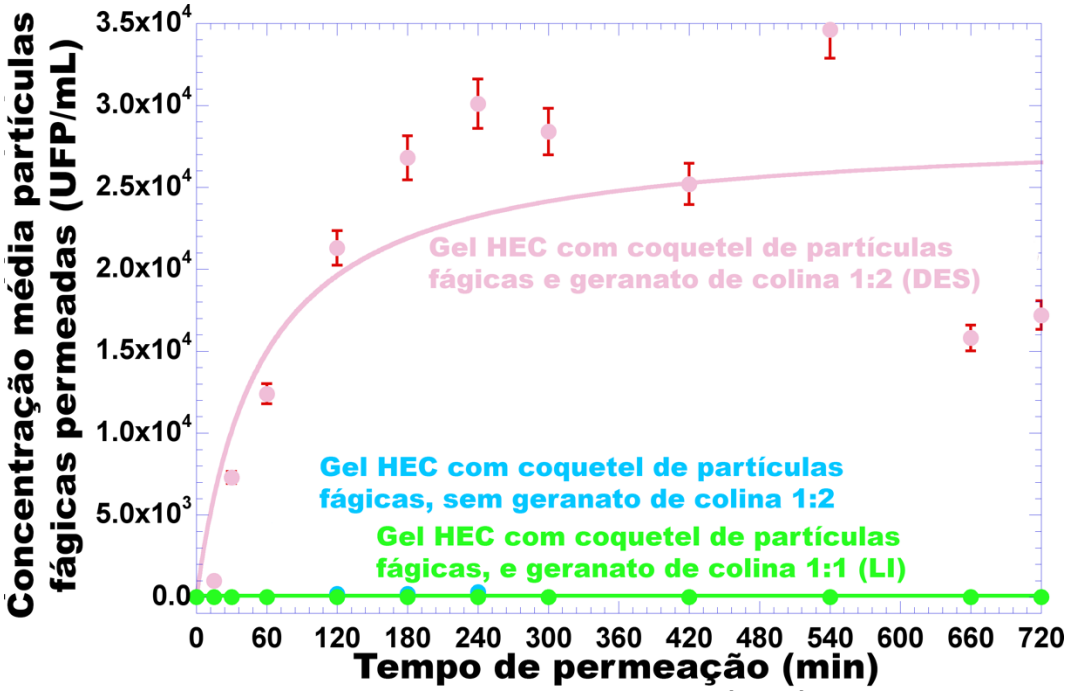
Fonte: Elaboração própria.

Os resultados obtidos mostraram a não-ocorrência de morte celular causada pelo contato com a amostra de gel HEC contendo líquido iônico (GC1:2, DES) e o coquetel de partículas bacteriofágicas, após 24h, sendo que a realização de análises microscópicas confirmou a integridade das células, sendo possível a observação do halo indicativo de morte celular (visualizado a olho nú) apenas para o controle positivo (neste controle, as células apresentaram alterações de morfologia e morte (Figura 23)).

5.9.2 Permeação transdérmica de partículas bacteriofágicas a partir da formulação em gel HEC, assistida por geranato de colina

Os resultados obtidos nos ensaios de permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas com geranato de colina como facilitador da permeação (GC1:1 e GC 1:2) podem ser encontrados na Figura 24.

Figura 24. Resultados obtidos nos ensaios de permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas a partir da matriz HEC biorreativa integrando geranato de colina, como a média de partículas fágicas permeadas (UFP/mL), durante um período de ensaio de 12 h. Os valores representam a média de três experimentos (n=3), com desvios-padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não-lineares realizados aos dados experimentais, nomeadamente da função hiperbólica aos dados de permeação transdérmica usando geranato de colina 1:2.



Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado por inspeção da Figura 25, a presença do líquido iônico geranato de colina 1:2 promoveu uma permeação média aumentada de partículas fágicas, ao contrário dos ensaios de permeação com geranato de colina 1:1 ou com ausência de qualquer líquido iônico na matriz HEC (ver curvas azul e verde na Figura 24). Realizando um ajuste não-linear (hiperbólico, $y = (m_1 \cdot x) / (m_2 + x)$) aos resultados obtidos de permeação transdérmica das partículas fágicas facilitada pelo geranato de colina 1:2 (Figura 24, curva rosa claro), obteve-se a proteína média máxima permeada por área de pele (parâmetro m_1) como $(2{,}8536 \pm 0{,}4182) \times 10^4$ UFP/mL e o tempo necessário para atingir metade da quantidade média máxima de partículas fágicas permeadas (parâmetro m_2) como sendo 54,44 min, com um excelente coeficiente de correlação. Como pode ser observado por inspeção da Figura 25, a matriz biorreativa HEC integrando o coquetel de partículas bacteriofágicas e geranato de colina 1:2 (o líquido iônico que apresentou a melhor performance em termos de citotoxicidade e genotoxicidade virtualmente nulas (dados não incluídos) e potenciação da permeação (Figura 24, curva rosa claro)) permitiu uma quantidade média de partículas bacteriofágicas permeadas de $2{,}28 \times 10^5$ UFP.

6 CONCLUSÕES

O trabalho de pesquisa objeto da presente dissertação teve como objetivo principal o uso da terapia fágica para o tratamento de piodermites em animais, como uma alternativa à utilização de antibióticos convencionais. Desenvolveu-se uma formulação para administração tópica onde foram integradas partículas fágicas líticas para o agente etiológico da piodermite animal. Para possibilitar a permeação das partículas fágicas através da pele, utilizou-se geranato de colina como facilitador de permeação transdérmica.

Na procura do agente etiológico da piodermite, conseguiu-se isolar e identificar uma bactéria do grupo *Staphylococcus intermedius,* agente comumente causador de piodermites caninas e equinas, a partir de amostras clínicas veterinárias recolhidas de cães e equinos.

Foram depois isolados e caracterizados dois bacteriófagos líticos contra a cepa isolada de *Stapylococcus intermedius*, sendo estes caracterizados como sendo fagos de dsDNA e pertencendo à família *Myoviridae*. Essa família de vírus bacterianos, segundo a literatura, integra os fagos de interesse em fagoterapia.

A formulação desenvolvida, um gel à base de hidroxietilcelulose integrando geranato de colina (1:2, DES) e o coquetel de bacteriófagos líticos, promoveu a permeação transdérmica das partículas fágicas. Foi possível também concluir que o gel HEC produzido, não obstante a presença de geranato de colina 1:2, foi capaz de estabilizar tanto a estrutura arquitetónica tridimensional das partículas fágicas como a sua funcionalidade, isto é, a sua viabilidade lítica. O geranato de colina 1:2 facilitou a permeação transdérmica dos fagos, e não teve qualquer impacto negativo em termos de citotoxicidade em queratinócitos humanos imortalizados.

Assim, a formulação desenvolvida apresenta elevado potencial para utilização em terapia fágica no tratamento de infecções piodérmicas em animais, permitindo evitar a utilização de antibióticos convencionais.

7 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

No sentido de melhorar a abrangência terapêutica da formulação desenvolvida integrando tanto o coquetel fágico como o agente facilitador da permeação transdérmica (isto é, o geranato de colina 1:2), sugere-se que outros bacteriófagos estritamente líticos para outras subespécies do grupo *Staphylococcus intermedius* sejam isolados e caracterizados, e um novo coquetel fágico seja produzido e integrado na formulação de gel HEC.

Uma identificação mais precisa das células bacterianas hospedeiras também poderia ser realizada através de análises moleculares, pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

As partículas bacteriofágicas poderão também ser melhor caracterizadas, através da sequenciação do seu genoma, para elucidadção daqueles genes constantes no seu genoma que possam codificar endolisinas. As endolisinas secretadas pelos bacteriófagos poderiam também ser isoladas e caracterizadas visando potenciais aplicações na área da saúde animal.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biology,** n. 5, p. 370, 2015.

ACKERMANN**,** H.W.**5500 Fagos examinados no microscópio eletrônico.**Archives of Virology, v.152, n. 2, p. 227 – 243, 2007.

ALBARELLOS, G. A.; KREIL, V. E.; LANDONI, M. F. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats**. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n. 27, p.155-162, 2004.

ÁLVAREZ, V. H. et al. Synthesis and Thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with oleate anion. **Fluid Phase Equilibria**, v. 299, p. 42-50, 2010.

ALVES, M. et al.Fluorianted ionic liquids for protein drug delivery systems: Investigations their impact on the structure and function of lysozyme. **International Journal Pharmaceutica,** v. 526, n.1-2, p. 309-320, 2017.

ALVES, P. A. et al. Piodermite em uma cadela: Um breve relato de caso. **Revista Científica de Medicina Veterinária,** n. 32, p. 1- 6, 2019.

AMBROSE, P. G.; OWENS, R. C.; GRASELA, D. Antimicrobial pharmacodynamics. **Medical Clinics of North America,** n. 84, p.1431-1446, 2000.

ANDREOTTI, R; NICODEMO, ML.F. Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência. **Embrapa Gado de Corte.** 1ª edição. Campo Grande, MS. 50p. , 2004.

APLEY M. D., et al. Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public health perspectives. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** n. 212, p.1209-1213, 1998.

ARAKAWA, T.; BHAT, R.; TIMASHEFF, S. N. Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. **Biochesmitry***,* n. 29*,* p. 1924-1931, 1990.

AULTON, M. E. **Pré- formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas,** 2 ed Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 677.

BALCÃO, V. M; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.93, p. 25-41, 2015.

BENINGO, K. E et al. Observations on the use of. tetracycline and niacinamide as antipruritic agents in atopic dogs. **Canadian Veterinary Journal,** n. 40, p. 268-270, 1999.

BOECKH, A.; BOOTHE, D. M.; WILKIE, S. Time course of enrofloxacin and its active metabolite in peripheral leukocytes of dogs. From the Proceedings from the Third International Veterinary Symposium on Fluoroquinolones. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian,** n. 21, p. 40-43, 1999.

BOOTHE, D. M. Antimicrobial therapy in the critically ill patient. **Compendium on Continuing Education Practising Veterinarian,** n. 1, p. 66-83, 1996.

BOOTHE, D. M.; BOOTHE, H. W. Serum and tissue concentrations of enrofloxacin in dogs. From the Proceedings of the Third International Veterinary Symposium on Fluoroquinolones. **Compendium on Continuing Education Practising Veterinarian,** n. 21, p.33-39, 1999.

BOTONI, L.S et al. Piodermite superficial canina por Staphilococcus pseudointermedius resistente a meticilina (MRSP**). Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia,** v. 3, n. 10, p. 270-277, 2014**.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para controle de infecção relacionada à assistência à Saúde**, Módulo 4, 2013.

BRIONES, F.; GARCÍA, M.; OMEGNA, C. **Determinación de pH normal de la piel de caninos y felinos.** In: XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria da Universidad Autónoma de Chile, Valdivia, 2004.

BROOKS M.B., et al. Survey of antimicrobial susceptibility testing practices of veterinary diagnostic laboratories in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** n. 222, p.168-173, 2003.

BRÜSSOW, H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? **Virology**, v.434, p.138-142, 2012.

CAMPBELL, B. G.; ROSIN, E. Effect of food on absorption of cefadroxil and cephalexin in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** n. 21, p. 418-420, 1998.

CARBON, C. Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens. **Clinical Infections Diseases,** n 27, p. 28-32, 1998.

CARLOTTI, D. N. New trends in systemic antibiotic therapy of bacterial skin disease in dogs. **Compendium on Continuing Education the Practising Veterinarian,** n. 18, p.40-47, 1996.

CARVALHO, C. et al. Bacteriophage characterization. **3 rd International hands- on Phage**. Braga- Portugal, 2017.

CASTELLS, G. et al. Allometric analysis of thiamphenicol disposition among seven mammalian species. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** n. 24, p. 193-197, 2001.

CASTELLS, G. et al. Pharmacokinetics of thiamphenicol in dogs. **American Journal of Veterinary Research,** n. 59, p.1473-1475, 1998.

CATTIN, I. et al. Subcutaneous abscess caused by Clostridium perfringens and osteomyelitis in a dog. **Journal of Small Animal Practice,** v.49, p. 200-203, 2008.

CHAPMAN, J.; MENSE, M.; DUBEY, J. P. Clinical muscular sarcocystosis in a dog. **Journal Parasitology,** n. 91, p.187-190, 2005.

CHEVROT, G.; Fileti, E.; CHABAN, V. Protein remains stable at unusually high temperatures when solvated in aqueous mixtures of amino acid based ionic liquids. **Journal of Molecular Modeling**, n. 22, p. 258, 2016.

CHIBANI-CHENNOUFI, S. et al. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. **Journal Bacteriology**, v. 186 (12), p. 3677–3686, 2004.

CHORILLI M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdermicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira Farmacêutica**, n. 88, p.7-13, 2007.

CHRIST, W. Central nervous system toxicity of quinolones: human and animal findings. **Journal Antimicrobial Chemotherapy,** n. 26, p. 219-225, 1990.

COSTA, P. et al. Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: An in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v.7, p.94, 2019.

CRIBB, A. E. Idiosyncratic reactions to sulfonamides in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.195, n.11, p. 1612-1614, 1989.

DEGHORAIN M.; VAN MELDEREN L. The *Staphylococci* phages family: an overview. **Viruses,** n. 4, p. 3316–3335, 2012.

DELBRÜCK, M. Adsorption of bacteriophage under various physiological conditions of the host. **The Journal of General Physiology.** v. 23(5), p. 631-642, 1940.

DEVESA, J.S.P. **Resistência a antibióticos em *Staphylococcus pseudintermedius* DE isolados cutâneos de cães com piodermite superficial**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2015.

DOSS, J. et al. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**, v.9, n.50, p. 1-10 2017.

DUARTE, J. et al. New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: An in vitro preliminary study. **Aquaculture,** v.495, p.970–982, 2018.

FADOK V. A. An overview of equine dermatoses characterized by scaling and crusting. **Veterinary Clinics of North America, Equine Practice**, v.11, p. 43-51, 1995.

FARIA, T.T.R. et al. Furunculose estreptocócica em equinos**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 8-11, 2017.

FERREIRA, A. **O Guia prático de farmácia magistral.** 2a. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

GHANDI, K. A Review of ionic liquids, their limits and applications. **Green and Sustainable Chemistry,** v.4, p. 44-53, 2014.

GILBERT, D. N. Once-daily aminoglycoside therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, p. 399-405, 1991.

GOINDI, S.; KAUR, R.; KAUR, R. An ionic liquid-in-water microemulsion as a potential carrier for topical delivery of poorly water-soluble drug: Development, ex-vivo and in-vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 495, p. 913- 923, 2015.

GÓRSKI, A. et al. Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases. **Frontiers in Microbiology**, n. 7, p.1515, 2016.

GRANDA, E. A. **Identificação de Staphylococcus aureus, S. intermedius e S. hypicus através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequencias dos genes coa E nuc.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas,2003.

GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**.4ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. **GUIA DE ANTIMICROBIANOS EM VETERINÁRIA.** Porto Alegre: Artmed, cap.1, p.17-29, 2010.

HANLON, G. B. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 118-128, 2007.

HARADA, L. et al. Insights into protein-ionic liquid interactions aiming at macromolecule delivery systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.29, n.10, 2018a.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38–58, 2018b.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals** v.12, n. 35, p 1-23, 2019. doi:10.3390/ph12010035

HIRSCH, D. C; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

IGLESIAS, M. et al. Bronsted ionic liquids: Study of physico-chemical properties and catalytic activity in aldol condensations. **Chemical Engineering Journal**, v.162, p. 802-808, 2010.

JANSEN, M. et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, **Scientific Reports**, v.8, n. 14140,p.1-12, 2018.

JIN, J. et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, **BMC Microbiology,** v. 12, n.156, p. 1-8, 2012.

JOŃCZYK, E. et al. The influence of external factors on bacteriophages. **Folia Microbiologica**, v.56, n.3, p. 191-200, 2011.

JORGE, L. R. R. **(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético à base de nanocelulose de origem microbiana e líquido iônico, para estabilização e entrega transdérmica de insulina.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2019.

KAUSHIK, J. K.; BHAT, R. Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: Role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. **Journal of Biological Chemistry B**, v.102, p. 7058-7066, 1998.

KLÄHN, M. et al. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 13, 1649, 2011.

KLIBANOV, A. M.; Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p. 1-28, 1983.

KUMAR, A.; BISHT, M.; VENKATESU, P.; Biocompatibility of ionic liquids towards protein stability: A comprehensive overview on the current understanding and their implications. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 96, p. 611-651, 2017.

KUMAR, A.; VENKATESU, P.; Innovative aspects of protein stability in ionic liquid mixtures. **Biophysical Reviews,** v. 10, p. 841-846, 2018.

LARINDJA, A. M. et al.Use of phage φ6 to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: *in vitro* and *ex vivo* experiments. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 104, p. 1319-1330, 2019.

LINDBERG, H. M.; MCKEAN, K. A.; WANG, I.-N. Phage fitness may help predict phage therapy efficacy. **Bacteriophage,** v. 4: 4, e964081, 2014.

LOBA, A.P.F.R. **Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologias da

Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

LU, S. et al. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1: establishment of genus PaP1-like phages, **PLOS ONE***,* v. 8, n. 5, p. 1-13, 2013.

MANGIALARDO, S. et al. Role of ionic liquids in protein refolding: native/fibrillar versus treated lysozyme, **Royal Society of Chemistry Advances,** v 2, p.12329-12336, 2012.

MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M. Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18; p. 3180-3189, 2014

MBONYIRYIVUZE, A. et al. Natural Dye Sensitizer for Grätzel Cells: Sepia Melanin, **Physics and Materials Chemistry,** v.3, n.1, p. 1- 6, 2015.

MCOERMOTT, P. F.; ZHAO, S.; WAGNER, O. O.; SIMJEE, S.; WALKER, R. O.; WHITE, O. G. The food safety perspective of antibiotic resistance. **Animal Biotechnology**, New York, V. 13, n. 1, p. 71 -84, 2002.

MERABISHVILI, M. et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against active against *Acinetobacter baumannii*. **Plos One**, v.9, n. 8, p. 1-13, 2014.

MOLDOVAN, R.; CHAPMAN-MCQUISTON, E.; WU, X. On kinetics of phage adsorption. **Biophysics Journal**, v. 93, p. 303–315, 2007.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation. **International Journal Pharmaceutical,** v 400, n.1-2, p. 243-250, 2010.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemistry Engeenering Journal**. v.48, p.295-314, 2010b.

MONIRUZZAMAN, M. et al. **Biochemical Engineering Journal,** v.48*,* p. 295*,* 2010.

NORITOMI, H. et al. Increase in thermal stability of proteins adsorbed on biomass charcoal powder prepared from plant biomass wastes**, Journal of Biomedical Science and Engineering,** v. 4, p. 692- 698, 2011b.

NORITOMI, H. et al. Thermal stability of proteins in the presence of aprotic ionic liquids, **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 4, p. 94- 99, 2011a.

NORITOMI, H. **Ionic Liquids- New Aspects for the Future.** Croácia**:** InTech, cap.22, p. 581-593, 2013.

PAPICH, M. G. Current concepts in antimicrobiol therapy for horses. **American Association of Equine Practioners**, v. 47, p. 94-102, 2001.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R.J; Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green. **Current Opinion in Biotechnology***.* v.14*,* 432, 2003.

PEREIRA, C. et al. Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. **Virus Research,** v. 220, p.179–192, 2016.

PEREIRA, C. et al. Characterization and in vitro evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. **Virus Research**, v. 227, p.171–182, 2017.

PEREIRA, V.G.A. **Estudo retrospectivo da resistência bacteriana na dermatite atópica canina**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

PETKOVIC, M. et al. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids – toxicity and biodegradability. **Green Chemistry**, v. 12, p.643–649, 2010.

PINHEIRO, L. A. M.et al. Efficiency of Phage φ6 for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An *In Vitro* Preliminary Study. **Microorganisms**, v.7 (9), p, 286, 2019.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de Matricaria recutita (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com o gel de diclofenaco sódico**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2008.

QUINN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2ª Ed.,Oxford: Wiley-Blackwelln, 2011.

RAKHUBA, D. V. et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish Journal of Microbiology,** v. 59, n. 3, p. 145-155, 2010.

RIOS, A. C. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances, State-of-the-art, **Microbiological Research**, v. 191, p. 51-80, 2016.

RIOS, A. C. et al. Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for the inhalational treatment of bacterial pneumonia, **Process Biochemistry**, v. 64, p. 177-192, 2018.

ROCHA, L. K. H. et.al. Sericin from *Bombyx mori cocoons*. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical aplications. **Process Biochemistry**, v.61, p. 163-177, 2017.

ROGERO, et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SALERNO, C.; CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. **American Association of Pharmaceutical Scientistics**, v. 11, n.2, p. 986-993, 2010.

SANTOS, F. C. O. et al. Piodermite profunda por *Staphylococcus intermedius* em equino. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.2641-2645, 2008.

SANTOS, S. B. et al. Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: implications of the host bacterial growth rate in modelling, **PLOS ONE,** v.9**,** p. 1-15, 2014.

SASAKI, T. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *Staphylococci.* **Journal of Clinical Microbiology**, p.765-769.

Population Dynamics of a Salmonella Lytic Phage and Its Host: Implications of the Host Bacterial Growth Rate in Modelling.

SCHRÖDER, C. Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations. **Topics in Current. Chemistry**, v. 37, n. 25, p.1-26, 2017.

SCOLARO, L. M. et al. Supramolecular binding of cationic porphyrins on a filamentous bacteriophage template. **Journal of the American Chemical Society,** n. 128, p. 7446-7447, 2006.

SHAO, Y.; WANG, I.-N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time, **Genetics***,* **v.180,** p. 471-482, 2008.

SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMAN, M.; GOTO, M.; Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. **Biotechnology Journal**, v. 11, 1000-1013, 2016.

SOUZA F.L.C. **Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo em água para uso externo de uso mais comum em manipulação.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia Humana** 2 ed., São Paulo: Manole, p.408, 2001.

STOLTE, S. et al. Effects of different head groups and functionalized side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 9, n.11, p. 1170-1179, 2007.

SUHONEN, T.M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release** v. 59, p. 149–161, 1999.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRAIS, J. Bacteriophage therapy, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.3, p. 649-659, 2001.

SUMMERS, W. C. The strange history of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 2, p. 130–133, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 363-383, 2012.

VISPO, N.; PUCHADES, Y. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biologia combinatorial. **Biotecnología Aplicada**, v.18, p.135-147, 2001.

WASSERSCHEID, P.; KEIM, W. Ionic liquids - new “solutions” for transition metal catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v.39, p. 3772-3789, 2000.

WEESE et al. Orientações para o uso de antimicrobiano em Equinos. In:GUARDABASSI,L.;JENSEN,L.B.;KRUSE,H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária.** Porto Alegre: Artmed, cap.10, p. 201-212, 2010.

WELTON, T. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and calalysis, **Chemical Reviews,** v. 99, p. 2071-2084, 1999.

WITTEBOLE, X., ROOCK, S., OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v.5, 226-235, 2014.

ZAKREWSKY, M. et al. Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n.37, p. 13313-13318, 2014

ZHAO, H. Protein Stabilization and Enzyme Activation in Ionic Liquids: Specific Ion Effects. **Journal of Chemical Techn,** v.91, n.25, 2016.

ANEXO A

Certificado do XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, 2018.

XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA
XIII ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL
17 A 21 DE OUTUBRO DE 2018 - GRAMADO, RS

We certify that the work entitled
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE PARTICLES FOR ANIMAL STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS: POTENTIAL FOR VETERINARY PHAGE THERAPY VIA TRANSDERMAL DELIVERY USING IONIC LIQUIDS
authored by
ERICA CRISTINA SANTOS SILVA , LILIAM KATSUE HARADA ROCHA, FERNANDA DE CAMPOS MORELLI, WELIDA FRANCIELLY CAMPOS, ANAHI ARIADNE MIGUEL, THAIS JARDIM OLIVEIRA, MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA, VICTOR MANUEL CARDOSO FIGUEIREDO BALCÃO
was presented in the **Poster Session** during the **XXIX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & XIII MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY**,
held from October 17 to 21, 2018 in Gramado, RS, Brazil.

Gramado, October 21, 2018.

MAURÍCIO LACERDA NOGUEIRA
PRESIDENT OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY

FERNANDO ROSADO SPILKI
PRESIDENT OF THE ORGANIZING COMMITTEE

realização
SBV SOCIEDADE BRASILEIRA DE VIROLOGIA

apoio
CAPES
CNPq
FAPERGS

CERTIFICATE

ANEXO B

Certificado do 12th Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas (CIFARP). Ribeirão Preto, SP, 2019.

12th International Congress of Pharmaceutical Sciences
CIFARP 2019
From November 6th to 9th

Certificate

We certify that the Pôster titled: **CHOLINE GERANATE FOR STABILIZATION AND TRANSDERMAL PERMEATION OF BACTERIOPHAGE PARTICLES IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS INFECTIONS CAUSED BY STAPHYLOCOCCUS SUBSP.** authored by **Erica Cristina Silva, Liliam Rocha, Fernanda de Campos Moreli, Welida Campos, Thais Oliveira, Marta Vila, Victor Balcao** was presented at the 12th International Conference of Pharmaceutical Sciences held in Ribeirão Preto, Brazil, from 6 to 9 November 2019.

Maria Regina Torqueti

ABCF

Certification by Galoá