

## IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ESTABILIDADE DE BACTERÍOFAGOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Helena Camargo Ferraz Fischer (IC) e José Luiz Caldas Wolff (Orientador)

**Apoio: PIBIC Mackenzie**

### RESUMO

*Ralstonia solanacearum* é um dos mais preocupantes e importantes fitopatógenos bacterianos da atualidade devido à sua ampla distribuição geográfica, diversidade de hospedeiros, variações genéticas, alta letalidade e difícil controle. Os fitopatógenos reduzem o rendimento das colheitas em 14%, dentre estes, os de solo, que inclui a *R. solanacearum*, são responsáveis por 10-20% das perdas anuais. Para seu controle, o uso de antibióticos é o mais utilizado, entretanto, esse método se mostra insustentável. Nesse contexto, os bacteriófagos se mostram uma ótima alternativa de biocontrole agrícola a ser explorada, devido à sua alta especificidade de hospedeiro, baixa toxicidade para os humanos e para o meio ambiente e sua capacidade de auto multiplicação, autorregulação e evolução. Foram utilizadas quatro amostras referidas como fagos A1, A2, D1 e AB12. Foi realizada identificação molecular das amostras e teste de estabilidade em tampão sob refrigeração e em terra autoclavada e não autoclavada, em temperatura ambiente. A partir dos resultados obtidos, inferiu-se que os fagos A1 e A2 são iguais ou muito parecidos com o fago D1, já sequenciado e identificado como pertencente à família *Siphoviridae* e subfamília *Septimatrevirus*. Foi confirmada a identificação do fago AB12 como pertencente à família *Podoviridae*, subfamília *Autographivirinae*. As análises de estabilidade sugerem que o fago D1 apresenta ótima estabilidade em tampão sob refrigeração e em terra, mostrando maior resistência a alterações ambientais. Comparativamente, o fago AB12 apresentou baixa estabilidade em ambas as análises indicando maior sensibilidade a situações adversas e, consequentemente, menor viabilidade para uso comercial.

**Palavras-chave:** *Ralstonia solanacearum*, bacteriófagos, biorremediação.

### ABSTRACT

*Ralstonia solanacearum* is one of the most concerning and important bacterial phytopathogens nowadays due to its wide geographic distribution, host diversity, genetic variation, high lethality and difficult control methods. Phytopathogens reduce crop yields by 14%, among them, the ones found in soil, which includes *R. solanacearum*, are responsible for 10-20% of annual losses. For its control, antibiotics are the most used method, however, it has been proven to be unsustainable. In this sense, bacteriophages show an excellent alternative for agricultural

biocontrol to be explored, due to its high host specificity, low toxicity for humans and the environment and its capacity for self-multiplication, self-regulation and evolution. Four samples, referred to as phages A1, A2, D1 and AB12, were used. Molecular identification was performed and stability was analyzed in buffer under refrigeration and in sterilized and non-sterilized soil, at room temperature. Based on results, it was inferred that phages A1 and A2 are equal or very similar to phage D1, already sequenced and identified as belonging to the family *Siphoviridae* and subfamily *Septimatrevirus*. The identification of phage AB12 was confirmed as belonging to the family *Podoviridae*, subfamily *Autographivirinae*, and being different from the other samples. Stability analyzes suggest that phage D1 has excellent stability in buffer under refrigeration and in soil, showing greater endurance to environmental changes. Comparatively, phage AB12 showed low stability in both analyzes, indicating greater sensibility to adverse situations and, consequently, lower feasibility for commercial use.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*, bacteriophages, bioremediation.

## 1. INTRODUÇÃO

*Rastonia solanacearum* é uma bactéria aeróbica, bastonetiforme, gram-negativa, polarmente flagelada, catalase e oxidase positiva, e pertencente ao filo das  $\beta$  proteobactérias (Fig. 1) (ROSSATO, 2016). Em termos taxonômicos, essa espécie foi, inicialmente, nomeada *Bacillus solanacearum* (Smith 1896), o que foi rapidamente revisto para que fosse renomeada como *Pseudomonas solanacearum* (Smith) (Smith 1914).

A murcha bacteriana é causada pelo complexo de espécies do gênero *Ralstonia*, grupo de isolados bacterianos com grande proximidade, mas que apresentam variações genéticas significantes entre eles (FEGAN; PRIOR, 2005; ROSSATO, 2016). Fegan e Prior (2005) propuseram um sistema hierárquico de classificação para este grupo bacteriano, dividido em quatro filótipos. Os filótipos, por sua vez, são subdivididos em sequevares, sendo identificados 57 até 2016 (ROSSATO, 2016).

*R. solanacearum* é um dos mais preocupantes e importantes fitopatógenos bacterianos da atualidade devido à sua ampla distribuição geográfica, diversidade de hospedeiros, variações genéticas e alta letalidade. Sua capacidade de permanecer ativa no solo e na água, por anos, e sem hospedeiro, além de sua disseminação pela água corrente, dificultam métodos eficazes de controle. Tais fatores permitem considerá-la como um dos fitopatógenos de maior importância econômica (GENIN, 2010; DENNY; GENIN, 2012).

A *R. solanacearum* infecta cerca de 200 espécies de plantas de mais de 53 diferentes famílias botânicas, incluindo as da família *Solanaceae* (espécies como batata, tabaco, tomate e pimentão) e se encontra em todos os continentes, nas proximidades dos trópicos e, em regiões com climas temperados, incluindo diversas ilhas. A doença acontece inicialmente pela raiz, mas seu principal sintoma é o entupimento dos vasos condutores, devido à grande multiplicação nessa área e a produção de exopolissacarídeos, e o murchamento das folhas (DENNY, 2007; GENIN, 2010; SHE *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Sintomas da murcha bacteriana no tomate (*Solanum lycopersicum*). (A) Sintomas nas folhas. (B) Aparência do indivíduo doente. (C) Sintomas nas folhas e caule. (D) Sintomas no interior do caule. (E) Detalhes do caule infectado. (F) Sintomas no fruto verde e maduro.



Fonte: AGRIOS, 2005.

Dados de 2015 mostram que, mundialmente, os fitopatógenos reduzem o rendimento das colheitas em 14%, dentre estes, os de solo, que inclui a *R. solanacearum*, são responsáveis por 10-20% das perdas anuais das colheitas (YULIAR; YANETRI; TOYOTA, 2015). Formas de controle para a murcha bacteriana, empregadas atualmente, consistem em métodos químicos, biológicos, físicos, de cultivo e em precauções para evitar a propagação da doença. (YULIAR; YANETRI; TOYOTA, 2015).

Dentre as formas de controle citadas para *R. solanacearum*, nenhuma se mostra totalmente eficaz isoladamente. Atualmente, os químicos, especialmente antibióticos, são a forma mais utilizada (GERHARDSON, 2002; YULIAR; YANETRI; TOYOTA, 2015). É inegável a importância que os antibióticos tiveram, e ainda tem, para a saúde humana, tratamento animal e agricultura, entretanto, a disseminação de seu uso levou a um dos maiores problemas da atualidade, que ainda se encontra sem solução.

Ao utilizar antibióticos, ocorre uma pressão seletiva, na qual bactérias que já apresentam genes de resistência não são eliminadas. Essa característica que permanece, pode então ser passada para outros indivíduos de mesma ou de outras espécies por meio da transferência horizontal de genes. A resistência bacteriana envolve genes responsáveis por características de resistência que surgem por três principais caminhos: genes de resistência naturais do organismo produtor do antibiótico (fungos e bactérias), genes de resistência de outros organismos do ambiente e de mutações espontâneas no genoma bacteriano. Devido à coevolução de diversos organismos naturalmente produtores de antibióticos e bactérias,

genes de resistência já são presentes na natureza (SUNDIN; WANG, 2018; LEVY; MARSHALL, 2004).

Esse fenômeno acontece repetidamente e resulta na ineficiência de tratamentos, na constante necessidade de desenvolver novos antibióticos e no seu uso em doses cada vez mais altas. Além disso, as bactérias podem desenvolver múltiplas resistências, sendo assim, imunes a mais de um tipo de antibiótico (SUNDIN; WANG, 2018; LEVY; MARSHALL, 2004).

De acordo com Sundin e Wang (2018), tratando-se de fito bactérias, existem poucos bactericidas disponíveis, sendo streptomina e oxiteraciclina os mais utilizados. Ademais, devido à não especificidade dos químicos, outros organismos nativos da microflora do solo são afetados. Os pesquisadores, Sundin e Wang (2018), também relataram que o solo é o maior reservatório de genes de resistência e que a presença dos destes vem aumentando drasticamente. Considerando o potencial de transferência genética mencionado anteriormente, tais genes de resistência podem chegar a bactérias de outros ambientes, inclusive as responsáveis por doenças humanas. Já existem relatos de espécies do gênero *Ralstonia* responsáveis por infecções em pacientes com fibrose cística (FLUIT, *et al.*; 2021). Sua patogenicidade é baixa e apresenta prevalência de menos de 5% nos pacientes, entretanto, os relatos aumentaram desde a década passada (FLUIT, *et al.*; 2021). Para além disso, os bactericidas que são pulverizados em plantas são, muitas vezes, carregados para outros ambientes e organismos, afetando microbiotas acidentalmente. Calcula-se que 44 - 71% dos antibióticos aplicados em spray são perdidos para o ambiente e não chegam na planta alvo (SUNDIN; WANG, 2018; SABRI *et al.*, 2021).

O controle de fitopatógenos agrícolas com antibióticos atualmente é caracterizado pela baixa especificidade dos produtos, uso em grandes quantidades, pressão seletiva e aumento no número de genes de resistência, levando à ineficiência de tratamentos. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de estratégias para substituir os tratamentos químicos em diferentes áreas, especialmente no controle de fitopatógenos, buscando métodos que respeitem a saúde humana, animal e do planeta (SUNDIN; WANG, 2018; LEVY; MARSHALL, 2004).

Os bacteriófagos, ou simplesmente, fagos foram descobertos em 1915 por Frederick Twort, que os descreveu como agentes bacteriolíticos. Em seguida, em 1917, Felix D'Herelle descobriu um organismo antagônico ao bacilo da disenteria (*Shigella sp*) e o denominou bacteriófago. O nome desse pesquisador ficou mais atrelado aos fagos pois ele continuou suas pesquisas e isolou diversos outros, capazes de lisar bactérias responsáveis por doenças preocupantes como cólera e difteria. Esses organismos foram utilizados no controle de diferentes bacterioses e, apesar de sua ampla funcionalidade, nos anos 1920 e 1930 foram

caindo em desuso devido à descoberta dos antibióticos, seguido por um crescente uso deles para diferentes fins. A partir de 1980, estudos com bacteriófagos foram retomados aos poucos, especialmente com a crescente adaptação de bactérias resistentes à antibióticos (CALZADILLA; GONZÁLEZ, 2014).

O uso destes vírus para agricultura vem sendo cada vez mais explorado como ferramenta para o controle de fitopatógenos devido ao desenvolvimento de resistência a antibióticos, falta de métodos de controle eficazes e, mais recentemente, a preferência dos consumidores por produtos orgânicos e livres de químicos como bactericidas. As características que o fazem um bom método de controle biológico é a alta especificidade de hospedeiro, baixa toxicidade para os humanos e para o meio ambiente e sua capacidade de auto multiplicação e coevolução junto ao hospedeiro. A alta especificidade dos fagos é um fator extremamente positivo pois impede que eles impactem outras populações não alvo, entretanto, pode ser um fator limitante para o tratamento de cepas diversas de uma determinada bactéria. Testes de especificidade de hospedeiro são essenciais para sanar tal problema e a elaboração de coquetéis com mais de um fago também se mostra eficiente. Sua capacidade de se autorregular e evoluir permite que eles superem genes de resistência do hospedeiro, podendo ser uma alternativa para bactérias multirresistentes (CALZADILLA; GONZÁLEZ, 2014; HERNÁNDEZ-ROMANO *et al.*, 2017; SVIRCEV; ROACH; CASTLE, 2018; SABRI *et al.*, 2021).

Esses organismos são abundantes e presentes em todos os lugares, o que facilita seu isolamento, além de serem facilmente purificados, multiplicados e manipulados em laboratório. Dessa forma, necessitam de pouca tecnologia, baixo investimento e pouco tempo para serem cultivados. Ao ser utilizado em um ambiente, seu efeito é extremamente local pois apenas sobrevive onde seu hospedeiro estiver, sendo assim biodegradáveis e livres de resíduos (SABRI *et al.*, 2021). Exemplos de usos já empregados com bacteriófagos são a descontaminação de produtos alimentícios, higienização dos ambientes de fabricação e ainda a redução ou prevenção de fitopatógenos utilizando-os para detectar sua presença em alimentos (HERNÁNDEZ-SANTIAGO; JIMÉNES-SALAS; PLA-SOLER, 2011).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Diversos autores vêm analisando a eficácia dos bacteriófagos para o controle da murcha bacteriana causada pelo patógeno *R. solanacearum*. As pesquisas se concentram principalmente no isolamento e caracterização de amostras seguido de testes de estabilidade e biológicos em condições laboratoriais, em estufas, em amostras de solo e na planta doente diretamente, utilizando um ou mais fagos juntos, em forma de coquetéis (RAMÍREZ; NEUMAN; RAMÍREZ, 2020). Para além dos testes mencionados, os tratamentos foram

eficientes para higienização de solos contaminados, plantas hospedeiras já infectadas e sua prevenção em estufas. As reduções nas populações bacterianas foram expressivas, chegando a zerar especialmente quando houve o uso de coquetéis e permanecer dessa forma sem crescimento de bactérias resistentes (ÁLVAREZ *et al.*, 2019; RAMÍRES; NEUMAN; RAMÍREZ, 2020; WEI *et al.*, 2017).

Uma das características fundamentais para a aplicação de fagos no controle de fitopatógenos é a estabilidade destes agentes no ambiente e no laboratório. Fagos pouco estáveis, ou seja, que rapidamente perdem a viabilidade quando estão fora de um hospedeiro, tem baixo potencial de utilização no controle microbiano.

A estabilidade do bacteriófago PE204, um fago com potencial de uso no controle de *R. solanacearum*, foi analisada por Bae *et al.* (2012). A partir deste, concluiu-se que a atividade do fago se mantém estável em temperaturas de 15-60°C e em pH de 4-11 a 30°C, ambos incubados por uma hora. Em outro estudo, Lee e Park (2016) analisaram quatro fagos de *R. solanacearum* e concluíram que eles se mostraram estáveis na faixa de temperatura de 16-44°C quando incubados por 15 minutos. Em relação ao pH, os fagos se mantiveram estatisticamente estáveis entre 6-10 quando armazenados por 3 horas. Testes em amostras de solo foram conduzidos por Bae *et al.* (2012) em temperaturas de 25, 30 e 35 °C com o fago PE204. Foi possível observar que o fago perdia estabilidade à 35°C após 10 dias de incubação, mas se manteve estável à 25 e 30°C por mais de 13 dias.

A diversidade de fagos é enorme, sendo considerado o grupo de organismos mais abundante na terra (ROHWER, 2003). Um levantamento realizado por Rohwer (2003), deduz que existam em torno de 100 milhões de espécies de fagos e que destas, metade são ainda desconhecidas. O grupo mais estudado e descrito de bacteriófagos pertence à ordem dos *Caudovirales*, caracterizados por possuírem uma cauda, que varia em sua morfologia e tamanho, e material genético DNA fita dupla. Essa ordem compreende cinco famílias: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Ackermannviridae* e *Herelleviridae* (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020).

De acordo com Trotereau *et al.* (2021), apenas 35 fagos de *R. solanacearum* tem seu genoma completamente sequenciado e classificado na base de dados do GenBank. Destes, apenas um foi classificado como *Siphoviridae* e um como *Podoviridae*, o restante, pertence à família dos *Inoviridae* (ordem *Tubulavirales*) e *Myoviridae*. Dessa forma, foram propostas análises complementares com 4 fagos, denominados Bacteriófago Ralstonia AB12, Bacteriófago Ralstonia A1, Bacteriófago Ralstonia A2 e Bacteriófago Ralstonia D1. Estes fagos serão referidos respectivamente como fagos AB12, A1, A2 e D1. Os fagos AB12 e D1 tiveram seus genomas completamente sequenciados por colaboradores do professor

proponente. O genoma do fago AB12 tem 42519 pb e sua anotação preliminar indica potencial para codificar 63 genes. A partir da comparação com dados do Genbank, concluiu-se que se trata de um fago da ordem *Caudovirales*, Família *Podoviridae*, subfamília *Autographivirinae*. Da mesma forma, as informações coletadas indicam que o fago D1 possui um genoma com 43546 pb e trata-se de um fago da ordem *Caudovirales*, família *Siphoviridae* e subfamília *Septimatrevirus*.

A ausência de técnicas eficazes para o controle de *R. solanacearum*, sua alta incidência em diversas espécies de plantas de consumo humano no mundo todo e sua alta patogenicidade, gerando grandes perdas anuais, revelam a importância econômica desse fitopatógeno. O uso de antibióticos, principal método para controle, se mostra cada vez mais insustentável e ineficaz. Considerando o potencial dos fagos para biocontrole agrícola e o limitado conhecimento de sua diversidade, se faz necessária a pesquisa de base para identificar os fagos existentes, assim como, testes para analisar sua estabilidade, são essenciais para avaliar seu potencial de uso como produto comercial.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Material biológico**

Foram utilizadas duas cepas de *R. solanacearum*, originárias da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, S.P. Quatro amostras de fagos foram utilizadas, A1, A2, D1, AB12, sendo que a AB12 infecta apenas a cepa 624 e as outras três infectam a cepa 1677 e 624. Os fagos AB12 e D1 foram sequenciados por dois pesquisadores da Universidade de Brasília que colaboram com o professor proponente deste projeto (Dr. Fernando Lucas de Melo, professor visitante no Instituto de Biologia/ Departamento Fitopatologia e Dr. Bergmann Morais Ribeiro, professor titular do Departamento de Biologia Celular).

As amostras bacterianas foram estocadas a partir de uma colônia isolada em meio Kelman's suplementado com 15% de glicerol e mantidas à -80°C.

#### **3.2 Meio de cultura e soluções**

O meio Kelman's foi utilizado para manutenção e estocagem das cepas de *R. solanacearum*. Ele consiste em 1% de peptona, 0.1% de caseína hidrolisada, 0.25% de dextrose e, para forma sólida, foi acrescentado 1,8% de ágar. O meio ágar Kelman's TZC foi utilizado a fim de confirmar a presença de colônias da bactéria em questão. Uma solução estoque foi feita utilizando 1g de corante 2,3,5-triphenyltetrazolium (TZC) em 100ml de água destilada. Esta solução foi autoclavada e, para uso, foi adicionada ao meio sólido em concentração final de 0,005% mantido à 50°C antes do plaqueamento (KELMAN, 1954; OLSON, 2005).

Uma solução salina foi preparada a parte a fim de melhorar a multiplicação viral. Esta consistiu nos sais  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4$ , a partir de 400mg de cada em um litro de água destilada, gerando uma solução 100x concentrada e foi incrementada ao meio Kelman líquido em 1%.

O tampão SM foi utilizado para diluição e posterior titulação das amostras virais no teste de estabilidade. Para 1 litro foi necessário 5,8g de cloreto de sódio, 2g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 50 ml de solução 1M Tris HCl com pH 7,4 e 5 ml de gelatina 2% concentrado.

### **3.3 Multiplicação dos fagos**

O procedimento consistiu em realizar inóculos virais em suas cepas hospedeiro alvo, sendo: AB12 com cepa 624 e os fagos A1, A2 e D1 com cepa 1677 ou 624. No início do projeto não era sabido que os fagos A1, A2 e D1 infectavam a cepa 624, portanto, os primeiros testes utilizaram apenas a 1677 para multiplicá-lo.

As cepas bacterianas foram inoculadas em 2 tubos de ensaio, um para a cepa 624 e outro para a cepa 1677. Cada tubo continha 5 ml de meio de cultura Kelman enriquecido com sais e foi colocado em uma estufa a 30°C de um dia para o outro. No dia seguinte, 1ml de inóculo bacteriano foi transferido para 4 tubos de ensaio contendo 5ml de meio de cultura Kelman enriquecido com sais, de forma que 3 tubos continham a cepa 1677 e um tubo a cepa 624. Esses tubos foram colocados uma estufa (modelo C24 incubator shaker, New Brunswick Scientific®) com agitação de 120 RPM e cultivados durante 2h a 30°C até atingir fase de crescimento exponencial. Logo em seguida, foram inoculados 100ul dos fagos A1, A2, D1 e AB12 em seus respectivos hospedeiros.

O inóculo retornou para a estufa com as mesmas condições, na qual ficou por 16 horas. Após esse período, os fagos se multiplicaram e estavam prontos para purificação.

### **3.4 Purificação**

Foi retirada uma alíquota de 700ul da cultura infectada na etapa anterior e transferida para um microtubo que, em seguida, foi centrifugado a 4000xg por 5 minutos. Foram adicionados 250ul de clorofórmio em outro microtubo e este foi reservado. O sobrenadante foi então transferido para o microtubo contendo e o precipitado foi descartado. As duas fases foram então homogenizadas no vórtex por aproximadamente 3 minutos e, em seguida, centrifugadas a 4000xg por 10 minutos com o intuito de precipitar as células bacterianas que foram inativadas pelo clorofórmio. O sobrenadante foi retirado e reservado em novo microtubo, pois é onde se encontra o fago purificado, e a fase precipitada, descartada.

### **3.5 Preparação da sobrecamada**

Para iniciar, uma de Petri com meio Kelman's sólido foi preparada e deixada a parte. Em seguida, em um frasco shot foi acrescido 6ml de meio Kelman's líquido suplementado com sais e 0,25% de agarose (Agargen) ultrapura. Esse frasco foi colocado dentro de um béquer com água e deixado no banho maria a 50°C para que não solidifique. Em um tubo de ensaio, foram colocados 5ml do meio com agarose e 1ml das células bacterianas de *R. solanacearum* (1677 ou 624 dependendo do fago que estava sendo manipulado) (SERWER et al., 2007). Os inóculos foram homogeneizados e vertidos cada um sobre a superfície de uma das placas preparadas no início do procedimento.

### 3.6 Titulação por teste de microgotas

Primeiramente foi realizada a diluição em série das amostras virais purificadas em triplicata. Para cada diluição foram utilizados 450ul de tampão SM e 50ul de fago. Utilizando as placas de Petri com sobrecamada já preparadas, foram inoculados 25 microlitros das quatro últimas diluições em sua superfície com uma pipeta de precisão. Cada fago foi inoculado em sua respectiva cepa hospedeira utilizada na placa com sobrecamada. As placas serão colocadas em estufa e mantidas à 30°C por 24 horas. Após esse período, será possível obter uma estimativa da concentração de fagos pela contagem das placas de lise. O cálculo do título é dado pela fórmula:

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{\# \text{ de placas} \times 1000}{\mu L \text{ de estoque plaqueado} \times \text{fator de diluição}} \quad (\text{PELZEK, et.al, 2013}).$$

Onde # consistiu na média das placas de lise obtidas na triplicata em uma mesma diluição, o volume plaqueado foi de 25ul e o fator de diluição é dado por uma potência de dez elevado à diluição utilizada para a contagem de placas. O resultado foi dado em unidades formadoras de placa por mililitro e se refere à concentração de fagos na amostra inicial.

### 3.7 Extração do DNA viral

A extração de DNA foi realizada com os fagos purificados. A extração de ácido nucleico viral foi realizada de acordo com o procedimento descrito por SU e colaboradores (1998). A partir do material viral, foi transferido 8 ml para um tubo e adicionado 160μl (1/50 vol/vol) de cloreto de zinco na concentração 2M, seguido da incubação do tubo a 37°C por 20 minutos. Em sequência, o material foi submetido à centrifugação a 15000 x g por 2 horas, o que causou a formação de um precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500μl de tampão TENS (50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,3% de SDS). O precipitado foi homogeneizado em banho maria a 60°C e transferido para um microtubo. Em seguida, foi adicionado 20μl de proteinase K (concentração final de 100 μg/ml) e a amostra foi incubada a 55°C durante 16 horas. A remoção das proteínas desnaturadas para separação do material genético realizada com fenol e clorofórmio na proporção 1:1

vol/vol. Por fim, houve a precipitação do material genético com isopropanol, com a formação de um precipitado após centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 100µl de água milliQ, que posteriormente foi submetido à análise eletroforética.

### **3.8 Análise eletroforética em géis de agarose**

A partir dos ácidos nucleicos extraídos no procedimento anterior, foi realizada uma análise eletroforética para confirmar se as extrações de fato funcionaram, além de mostrar o tamanho aproximado das moléculas e a quantidade de DNA extraído.

O gel para a eletroforese foi feito utilizando 30 ml de TBE 0,5x com 0,8% de agarose (0,24 gramas). Foi utilizado 1ul para cada amostra de corante Blue Green + Loading Dye (LGC biotecnologia®) e 10ul de cada amostra de DNA viral extraído na etapa anterior. Como controle, foi utilizado 1,3ul de DNA padrão Lambda HindIII pronto para uso (Thermo scientific®– 0,1µg/µl) com 5ul de água miliQ.

### **3.9 Reação em cadeia polimerase (PCR)**

Como mencionado anteriormente, os fagos AB12 e 1D já se encontram sequenciados, dessa forma, o DNA dos mesmos foi utilizado como molde para a análise. O intuito é verificar se os isolados não identificados são semelhantes ao D1 ou ao AB12. Essa conclusão pode ser tirada quando o produto da PCR de um dos fagos em análise gera um produto do mesmo tamanho do que aquele observado quando usamos o DNA do fago de referência.

Dois pares de primers foram utilizados nas reações PCR. O primeiro par foi composto pelos primers ab21\_for (5'-AATTCCTTGGTCAAGCATCG-3') e ab21\_rev (5'-CGATGCCTTTAAGCTTCGTC), desenhados tendo por base o genoma do fago D1. O segundo par será composto pelos primers ab12\_For (5'-GAGGAGTGCGGAGAACTGAC-3') e ab12\_Rev (5'-GTACGTCATGGCCTCAACCT-3'), desenhados tendo por base o genoma do fago AB12. As reações foram realizadas com aproximadamente 50 nanogramas de DNA viral. Foram utilizadas 5 unidades de enzima *Taq* polimerase (Sigma) e 10 pmol de cada primer. O tampão do fabricante foi utilizado e dNTPs foram adicionados de forma que a concentração final de cada nucleotídeo será de 200µM. Água ultrapura (osmose reversa) foi utilizada para completar 50 µlitros, o volume final de cada reação. Como marcador molecular, foi utilizado o DNA 100 bp Ladder plus (Sinapse inc®) O programa da PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 de 94°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Os resultados foram submetidos à análise eletroforética de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

### **3.10 Digestão com enzimas de restrição**

Foi realizada a digestão das amostras de DNA com a enzima de restrição ECOR I a fim de analisar os padrões dos filamentos de material genético e complementar a caracterização dos fagos. O protocolo foi repetido para todas as amostras de material genético extraído.

Em um microtubo foram adicionados 12µl de água milliQ, 5µl de DNA, 2µl de tampão e 1µl de enzima EcoRI (Thermo scientific®). Como marcador molecular, foi utilizado o DNA Lambda Hind III (Thermo scientific®). O resultado foi analisado por meio da análise eletroforética por géis de agarose.

### **3.11 Estabilidade dos fagos mantidos sob refrigeração**

Os testes de estabilidade, sob refrigeração e no solo, foram realizados apenas com os fagos AB12 e D1, pois foi verificado, a partir dos resultados obtidos com o PCR e a digestão com enzimas de restrição, que se tratava de dois fagos, ao invés de quatro. Dessa forma, o teste se deu partir da titulação em triplicata descrita anteriormente os dois estoques virais purificados, utilizando o teste de microgotas em sobrecamada para determinar a concentração de fagos em cada diluição. As diluições seriadas de cada fago foram armazenadas sob refrigeração e os títulos obtidos nesta data foram chamados de "T = 0" (título no início do armazenamento). As titulações foram realizadas novamente após 150 e 240 dias. Os títulos virais obtidos nestes ensaios foram chamados de "T = 150" e "T = 240". A estabilidade dos fagos mantidos sob refrigeração foi avaliada pela comparação dos títulos obtidos. Foi utilizada ANOVA de uma via para analisar os resultados obtidos.

### **3.12 Estabilidade dos fagos na terra**

A estabilidade dos fagos foi analisada em amostra de solo coletada no Bairro do Jaguaré em São Paulo (SP), Brasil. A amostra foi enviada ao LAGRO laboratório agrônomo S/C Ltda, e foi realizada uma análise no mesmo.

Esse teste analisou a estabilidade dos fagos AB12 e D1, independentemente, quando colocados no solo autoclavado e não autoclavado ao longo do tempo. Foram realizadas medições do título em 4 tempos: dia 0, dia 1, dia 6 e dia 14, nomeados "T=0", "T=1", "T=6" e "T=14" respectivamente.

Inicialmente, para cada fago, foram preparadas 8 amostras de solo, que foram pesadas e colocadas em microtubos separados contendo 1g de solo em cada. Dentre estas, 4 amostras foram autoclavadas e 4 permaneceram com sua microbiota natural. Logo em seguida, em cada microtubo, foi adicionado uma alíquota de fago em uma concentração de  $10^7$  PFU/ml.

A primeira medição, T=0, foi obtida 1 hora após a inoculação do volume de fago indicado. A amostra foi ressuspensa em 5ml de tampão SM, homogeneizada no vórtex e

transferida para um tubo Falcon. Esse, por sua vez, foi centrifugado a 5000 RPM por 10 minutos para precipitar a terra no fundo do tubo. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro (Biofil® Syringe Filter – 0.22 $\mu$ ) e transferido para um tubo de ensaio. Essa amostra foi então diluída em triplicata e seu título foi analisado por meio do teste por microgotas. O procedimento foi executado para as amostras autoclavadas e não autoclavadas dos dois fagos e repetido para o “T=1”, “T=6” e “T=14”. A estabilidade dos fagos no solo foi avaliada pela comparação dos títulos obtidos. Foi utilizada ANOVA de duas vias para analisar os resultados obtidos.

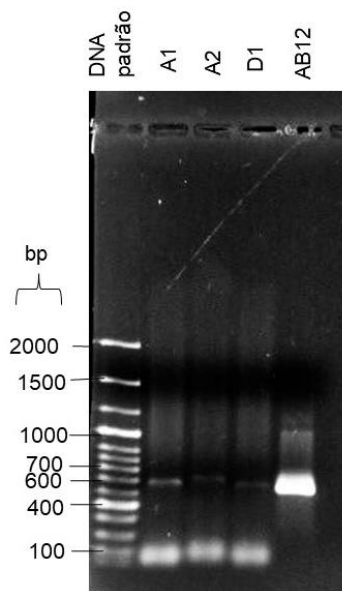
#### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

##### 4.1 Identificação molecular dos fagos

###### 4.1.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A extração do material genético dos quatro fagos (A1, A2, D1 e AB12) foi confirmada por eletroforese em géis de agarose. O marcador molecular utilizado foi o Lambda-Hind III. O DNA extraído foi submetido à PCR com o par de primers AB12, observou-se que houve anelamento e amplificação expressiva apenas na amostra de fago AB12 (Fig. 3). O amplicon gerado possui cerca de 600pb. Nas outras amostras (A1, A2 e D1), podem ser observadas bandas leves, de baixo peso molecular, e pouco delimitadas. Essas bandas são, provavelmente, resíduos dos primers que não foram anelados com a sequência. Nota-se também uma pequena amplificação dos mesmos fagos, com aproximadamente 600pb (Fig.3). Essas bandas podem ser indicação de contaminação durante o manuseio desses fagos no laboratório.

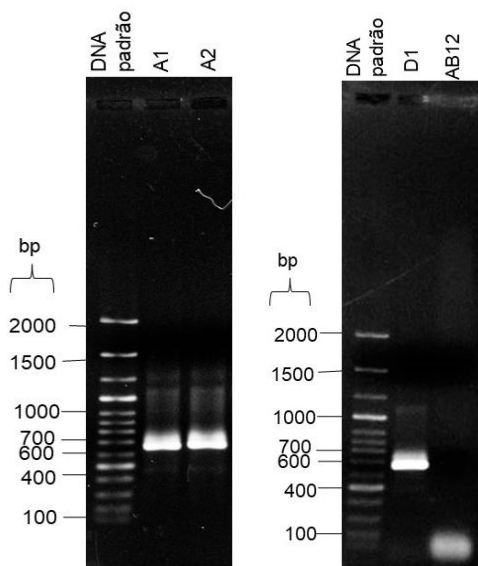
**Figura 2.** Eletroforese do produto da PCR dos fagos A1, A2, D1 e AB12. Reação feita com primers AB12 e DNA 100 pb Ladder como marcador molecular.



Fonte: autoral

Ao submeter os DNAs virais à reação de PCR com o par de primers ab21, observou-se que houve anelamento e amplificação nas amostras dos fagos A1, A2 e D1 (Fig. 4). A reação gerou um amplicon de cerca de 600pb. Em relação ao material genético do fago AB12, não houve anelamento e amplificação, ademais, observa-se uma banda de aproximadamente 100pb, resultado dos primers não anelados que sobraram na reação.

**Figura 3.** Eletroforese do produto da PCR dos fagos A1, A2, D1 e AB12. Reação feita com primers ab21 e DNA 100 pb Ladder como marcador molecular.

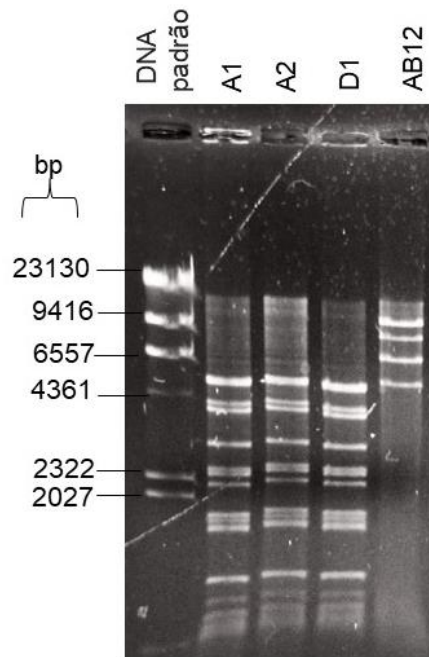


Fonte: autoral

#### 4.1.2 Digestão com enzima de restrição

A digestão utilizando a enzima de restrição EcoRI apresentou fragmentos idênticos para os fagos A1, A2 e D1 e fragmentos diferentes para o fago AB12 (Fig. 5).

**Figura 4.** Eletroforese do produto da digestão enzimática com enzima ECOR1 dos bacteriófagos A1, A2, D1 e AB12. Lambda Hind III utilizado como marcador molecular.



Fonte: autoral

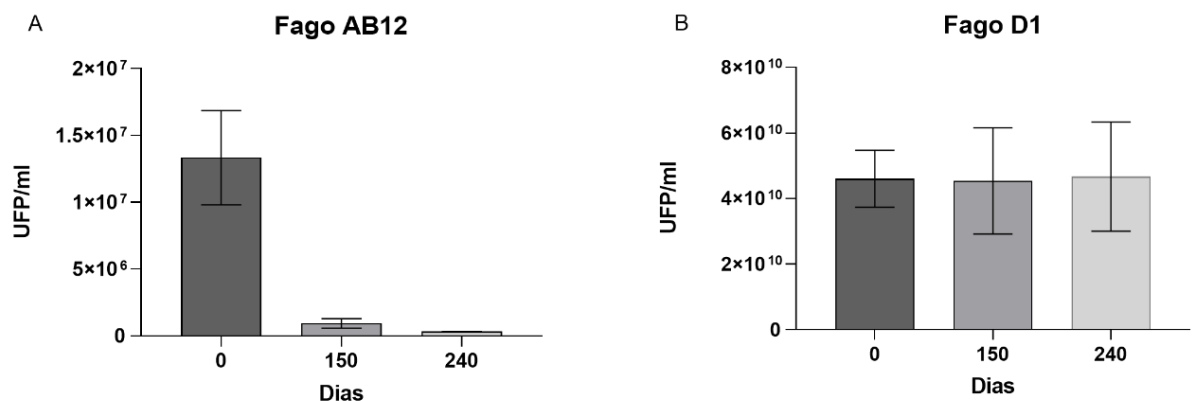
## 4.2 Estabilidade

Devido à identificação obtida nas análises anteriores, apenas os fagos D1 e AB12 foram utilizados para os testes de estabilidade.

### 4.2.1 Estabilidade dos fagos mantidos sob refrigeração

Para o fago AB12, observou-se uma queda grande no título obtido de 0 – 150 dias ( $p=0,0156$ ) e 0 – 240 dias ( $p=0,0124$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dias 150 – 240. Para o fago D1, o título se manteve estável durante todo o experimento, não apresentando diferença significativa entre nenhum dos tempos (fig. 6).

**Figura 5.** Estabilidade dos fagos AB12 (A) e D1 (B) em tampão SM sob refrigeração ao longo do tempo



Fonte: autoral

#### 4.2.2 Estabilidade dos fagos na terra

O fago D1 autoclavado apresentou aumento no título com diferença estatisticamente relevante entre os dias 0 – 1, 0 – 7, com valores de  $p$  igual a 0,0278 e  $<0,0001$ , respectivamente. Da mesma forma, foi relatado aumento significativo no período de 1 – 7 dias ( $p=0,0234$ ). Entre os dias 7 – 14 não houve diferença significativa, indicando estabilidade do título nesse período (Fig. 7- A).

Ainda sobre o fago D1, considerando a terra não autoclavada, observou-se aumento significativo no título entre 0 – 7 e 1 – 7 dias, com valores de  $P$  iguais a  $<0,0001$  em ambos os casos. Não houve aumento significativo no período de 0 – 1 dia, entretanto, entre os dias 7 – 14, houve um decrescimento significativo ( $p=0,0021$ ) no título (Fig. 7 - A).

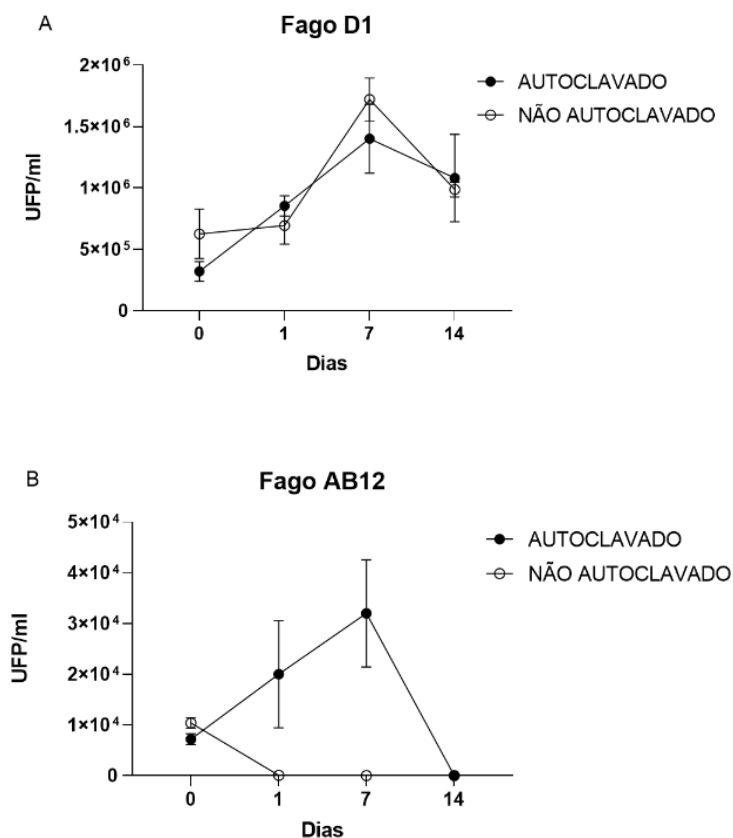
Ao comparar os valores obtidos no teste realizado com terra autoclavada e não autoclavada, tem-se que não houve diferença significativa em nenhum dos tempos analisados. Dessa forma, conclui-se que o fago D1 se comportou da mesma maneira em ambas as situações. Observa-se, por fim, que houve um aumento expressivo do título no período de 0 – 7 dias nas duas análises. Esse resultado não é condizente com o esperado para um teste de estabilidade. Deduz-se que, mesmo com a purificação com clorofórmio para inativar as células bacterianas de *R. solanacearum*, algumas ainda permaneceram no inóculo, possibilitando multiplicação do fago e aumento do título. Bae, *et al.* (2012) relatam que a presença de células bacterianas, de preferência de cepas não virulentas, pode ser uma estratégia para melhorar a estabilidade viral quando inoculado em solo.

Em relação ao fago AB12, para a terra autoclavada, houve um aumento significativo apenas entre 0 – 7 ( $p=0,0002$ ) e um decrescimento significativo entre 7 – 14, com valor de  $p <0,0001$ . Observa-se aumento até o dia 7 como no fago D1, entretanto, a queda no título até a última medição foi brusca, chegando a zerar o número de unidades formadoras de placa por mililitro (Fig. 7 – B). O aumento observado entre os dias 0 – 7, assim como os resultados obtidos para o fago D1, não vão de acordo com o esperado para esse teste.

Em terra não autoclavada, o título do fago AB12 apresentou uma queda para números extremamente próximos à zero entre os dias 0 – 1 (Fig. 7 – B). A partir da análise estatística, não houve diferença significativa entre os dois tempos pois, comparado a todos os valores considerados no gráfico, o decrescimento não teve magnitude expressiva. No entanto, seu comportamento foi muito diferente das análises anteriores, não havendo aumento do título em nenhum momento, mas uma queda expressiva logo na segunda medição. Em seguida, do dia 1 – 14, o título permaneceu em zero, não sendo encontradas unidades formadoras de placa. (Fig. 7 – B).

Ao comparar com os resultados obtidos com o mesmo fago em terra autoclavada, nota-se que a microbiota presente no solo teve grande influência no título ao longo do experimento. Foi encontrada diferença significativa entre autoclavado e não autoclavado nos dias 1 e 7, sendo os valores de p iguais a 0,0012 e <0,0001, respectivamente.

**Figura 6.** Estabilidade dos fagos D1 (A) e AB12 (B) em amostra de terra ao longo do tempo em dias.



Fonte: autoral

A partir da identificação molecular das amostras, concluiu-se que existem apenas dois fagos. O primeiro, que inclui as amostras A1, A2 e D1, pertence à ordem *Caudovirales*, família *Siphoviridae* e subfamília *Septimatrevirus*, como já havia sido confirmado pelo sequenciamento do fago D1. O segundo, o fago AB12, pertence à ordem *Caudovirales*, Família *Podoviridae*, subfamília *Autographivirinae*, como as anotações preliminares mostravam. Com isso, para analisar os resultados do teste de estabilidade de forma integrada, buscou-se compreender as características das duas famílias.

Testes de estabilidade realizados por Marmo, *et al.* (2020), Hu *et al.* (2021) e Chen, *et al.* (2020) sob diferentes situações de pH e temperatura, mostraram que fagos pertencentes à família *Siphoviridae* apresentam ótima estabilidade, dentro das condições analisadas. Em todos os estudos, os fagos se mostraram viáveis dentro de uma ampla variação de condições, se mostrando viável para uso em ambientes diversos e com condições adversas. Essas

informações condizem com o observado para o fago D1 em ambos os testes de estabilidade, que apresentou ótima viabilidade sob as condições analisadas.

Alic, *et al.* (2012) Elhalag, *et al.* (2018) e Lee e Park (2016) analisaram a estabilidade de bacteriófagos identificados como pertencentes à família *Podoviridae*, sob diferentes temperaturas e pH. Quando comparados com os resultados obtidos para fagos da família *Siphoviridae*, observa-se que são mais sensíveis às condições ambientais, se tornando inviáveis em situações muito ácidas (abaixo de 5) ou muito alcalinas (acima de 10) e em temperaturas acima de 60°C. Essa maior sensibilidade ao ambiente pode explicar o que foi observado no teste de estabilidade em terra para o fago AB12, quando analisado em solo não autoclavado. Além disso, os resultados mostram que esse fago não possui boa estabilidade, quando comparado com o fago D1.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da identificação molecular dos quatro fagos, tem-se que A1 e A2 são iguais ou muito parecidos com o fago D1, já sequenciado e identificado como pertencente à ordem *Caudovirales*, família *Siphoviridae* e subfamília *Septimatrevirus*. Foi confirmada a identificação do fago AB12 como pertencente à ordem *Caudovirales*, Família *Podoviridae*, subfamília *Autographivirinae* e sendo diferente das outras amostras.

As análises de estabilidade sugerem que o fago D1 apresenta ótima estabilidade em tampão sob refrigeração e em terra, mostrando maior resistência a alterações ambientais. O fago AB12 apresentou baixa estabilidade em ambas as análises indicando maior sensibilidade a situações adversas e, conseqüentemente, menor viabilidade para uso comercial.

Os resultados obtidos trazem informações relevantes para a identificação dos fagos existentes e suas características quando submetidos à situações de armazenamento e aplicação na terra. Entretanto, mais pesquisas devem ser desenvolvidas para ampliar a identificação dos bacteriófagos, compreender sua viabilidade e capacidade de biocontrole em situações *in vitro* e *in vivo*.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by prokaryotes: Bacteria and Mollicutes. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology** (Fifth Edition). San Diego: Academic press, 2005. p. 615-703.
- ALIC, S.; NAGLIC, T.; TUSEK-ZNIDARIC, M.; RAVNIKAR, M.; RACKI, N.; PETERKA, M.; DREO, T. Newly isolated bacteriophage from the *Podoviridae*, *Siphoviridae* and *Myoviridae* families have variable effects on putative novel *Dickeya* spp. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. 1870, p. 1-13, set. 2017.
- ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Biocontrol of de major plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 10, n. 2813, p. 1-17, dez. 2019.

- BAE, J. Y.; WU, J.; LEE, H. J.; JO, E. J.; MURUGAIYAN, S.; CHUNG, E.; LEE, S. Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. **Journal of microbiology and biotechnology**, Korea, v. 22, n. 12, p. 1613-1620, set. 2012.
- CALZADILLA, R. E. H.; GONZÁLEZ, L. C. Uso de los bacteriófagos en el sector agropecuario. **Agroecosistemas**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 361-371, dez. 2014.
- CHEN, L.; LIU, Q.; FAN, J.; YAN, T.; ZHANG, H. YANG, J.; DENG, D.; LIU, C.; TING, W.; MA, Y. Characterization and genomic analysis of ValSw3-3, a new *Siphoviridae* bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*. **Journal of virology**, v. 94, n.10, maio 2020.
- DENNY, T. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: DORDRECHT S. **Plant-Associated Bacteria**. Netherlands: S.S. Gnanamanickam. 2007. p. 573-606.
- DENNY, T.P.; GENIN S. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. **Annual Review of Phytopathology**, [S.l.], v. 50, p. 67-70, maio. 2012.
- DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 125-138, mar. 2020.
- ELHALAG, K.; NASR-ELDIN, M.; HUSSEIN, A.; AHMAD, A. Potential use of solborne lytic Podoviridae phage as biocontrol agente Against *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 658-669, jun. 2018.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial Wilt Disease and the Solanacearum Species Complex**, Minnesota: APS Press. 2005. p. 449-461.
- GENIN, S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. **New Phytologist**, France, v. 187, p. 920-928, maio. 2010.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in biotechnology**, [S.l.] v. 20, n. 8, p. 338-339, ago. 2002.
- HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; JESÚS, A. G.; MARTÍNEZ-BARNETCHE, J.; TÉLLEZ-SOSA, J. M. Bacteriófagos para el control de la marchitez bacteriana em jitomate. **Biotecnología y Sustentabilidad**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 78-83, jun. 2018.
- HERNÁNDEZ-SANTIAGO, R.; JIMENÉS-SALAS, Z.; PLA-SOLER. Aplicación de bacteriófagos em alimentos. **Revista Salud Pública y Nutrición**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 1-8, jul/set. 2011.
- HU, Z.; CHEN, X.; CHEN, W.; LI, P.; BAO, C.; ZHU, L.; ZHANG, H.; DONG, C.; ZHANG, W. *Siphoviridae* phage PH669 capable of lysing some strains of O3 and O4 serotypes in *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 545, dez, 2021.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, n. 12, p. 693-696, 1954.
- LEE, J.; PARK, T. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Ralstonia solanacearum* from potato fields. **Research in plant disease**, Korea, v. 22, n. 4, p. 236-242, nov. 2016.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12, p. 122-123, dez. 2004.

MARMO, P.; THALLER, M. C.; LALLO, G.; ANGELIS, L. H.; POERIO, N.; SANTIS, F.; FRANZINO, M.; MIGLIORE, L.; D'ANDREA, M. M. Characterization of vB\_StuS\_MMMA13, a newly discovered bacteriophage infecting the agar-degrading species *Sphingomonas turrisvirgatae*. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 894, ago. 2020.

PELZEK, A. J.; SCHUCH, R.; SCHMITZ, J. E.; FISCHETTI, V. A. Isolation, culture, and characterization of bacteriophages. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 7, n.1, p. 4-4, 2013.

RAMÍREZ, M.; NEUMAN, B.; RAMÍREZ, C. A. Bacteriophages as promising agents for the biological control of moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. **Biological control**, [S.l.], p. 1- 32, fev. 2020.

ROSSATO, M. **Espécies de Ralstonia no Brasil**: Caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro. 2016. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016. p. 1-10.

SABRI, M.; BENKIRANE, R.; HABBADI, K.; SADIK, S.; OU-ZINE, M.; DIOURI, M.; ACHBANI, H. E. Phages as potential biocontrol of phyto bacteria. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, mar. 2021.

SERWER, P.; HAYES, S. J.; THOMAS, J. A.; HARDIES, S. C. Propagating the missing bacteriophages: A large bacteriophage in a new class. **Virology Journal**, v. 4, p. 21, fev. 2007.

SHE, X.; YU, L.; LAN, G.; TANG, Y.; HE, Z. Identification and Genetic on Characterization of *Ralstonia solanacearum* Species Complex Isolates from *Cucurbita maxima* in China. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 8, n. 1794, p. 1-10, out. 2017.

SU, M.; VENKATESH, T. V.; BODMER, R. Large- and Small-Scale Preparation of Bacteriophage Lysate and DNA. **Biotechniques**, v. 25, n.1, p. 44-46, jul. 1998.

SUNDIN, G. W.; WANG, N. Antibiotic resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p.161-180, jun. 2018.

SVIRCEV, A.; ROACH, D.; CASTLE, A. Farming the Future with Bacteriophages in Agriculture. **Viruses**, [S.l.], v. 10(5), n. 218, p. 1-13, abr. 2018.

TROTEREAU, A.; BOYER, C.; BORNARD, I.; PÉCHUR, M. J. B.; SHOULER, C.; TORRES-BARCELÓ, C. High genomic diversity of novel phages infecting the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* isolated in Mauritius and Reunion islands. **Scientific Reports**, v. 11, n. 5382, mar. 2021.

WEI, C.; LIU, J.; MAINA, A. N.; MWAURA, F. B.; YU, J.; YAN, C.; ZHANG, R.; WEI, H. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. **Virologica Sinica**, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 476-484, dez. 2017.

YULIAR; NION, Y. A.; TOYOTA, K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and environments**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 1-11, fev. 2015.

**Contatos:** [helenacffischer@gmail.com](mailto:helenacffischer@gmail.com) e [joseluiz.wolff@gmail.com](mailto:joseluiz.wolff@gmail.com)