

Vírus benéficos em biotecnologia: aplicações dos vírus em biotecnologia

João Lúcio Azevedo

11.1 Introdução

A palavra vírus tem sua origem em veneno ou mesmo toxina. Foi primeiramente usada por Beijerinck no final do século XIX, para designar um agente responsável por certa doença vegetal em plantas de tabaco cuja causa não estava relacionada com qualquer micro-organismo detectado na época. Nota-se logo de início que os vírus eram, e, até hoje, são vistos como danosos prejudiciais causando problemas para a saúde humana, animal e vegetal. Os vírus podem ser definidos como elementos genéticos contendo ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) e sempre sua multiplicação ocorre no interior de células, embora possam possuir um estado extracelular. Multiplicando-se dentro de células, em grande número dos casos, eles podem danificar e destruir estas células que os hospedam, sejam elas de animais, vegetais ou de micro-organismos. No entanto, nem sempre é isto que ocorre; algumas células são beneficiadas pela presença dos vírus. Em outros casos embora destruindo células de plantas, animais ou micro-organismos, eles favorecem do ponto de vista biotecnológico o controle de pragas e moléstias vegetais, isto sem falar no uso de vacinas animais e humanas contra graves doenças. São estes alguns pontos a serem apresentados no presente capítulo, resgatando a imagem positiva dos vírus, tão condenados pela maioria dos habitantes de nosso planeta. Eles são também importantes para estudos de genética microbiana e na tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, como pode ser visto no presente capítulo e por publicações em artigos científicos, revisões e livros texto que se ocupam dos vírus, alguns dos quais serão citados no decorrer deste capítulo.

11.2 Vírus: histórico

Os micro-organismos, como as bactérias e outros seres microscópicos só foram melhor conhecidos, entendidos e estudados depois da invenção de um microscópio, idealizado por Leeuwenhoek na segunda metade do século XVII que foi usado para observar e descrever bactérias e outros micro-organismos até então desconhecidos. Na realidade o microscópio ótico ou composto havia sido idealizado pela primeira vez no final do século XVI pelos holandeses Hans Janssen e seu filho Zacharias. Entretanto, eles não o utilizaram para examinar seres microscópicos. Como os vírus são bem menores que as bactérias e outros seres observados por Leeuwenhoek, eles permaneceram desconhecidos na época. No entanto, já havia relatos na literatura de que certos fenômenos descritos na literatura poderiam ser devido ao que bem mais tarde foram explicados pela presença de vírus. É o caso apresentado por Evelyn no seu livro Sylva, (1664 apud ALVES, 1998) verificou que material triturado de insetos, atacados e mortos por algum fator desconhecido, se fosse espalhado em florestas, causava a morte de insetos sadios, este é na realidade um processo de controle biológico de pragas que atualmente pode ser explicado como devido a vírus que infectavam insetos mortos e que transmitidos aos sadios, causavam também sua morte.

Na última década do século XIX, Dmitri Yvanovsky apresentou, pela primeira vez, um trabalho na Academia de Ciências de São Petersburgo (Rússia) associando uma doença do tabaco (*Nicotiana tabacum*) que era problema na Crimeia, cujo agente causal era filtrável, isto é, não era retido por filtros que impediam a passagem de bactérias. Este material filtrado continha algo que inoculado em tabaco sadio, transmitir a doença. Foi concluído, portanto, que o agente filtrável devia ser menor do que bactérias tendo também na época sendo sugerida a possível presença de uma toxina. Casos semelhantes foram também descritos por outros pesquisadores. Relatos de doenças humanas e de animais domésticos eram também descritos como transmitidas sem um agente causal detectável. Estes agentes foram denominados de infrabactérias por Pasteur. Ainda no final do século XIX, Beijerinck descreveu a mixomatose, uma doença em coelhos causados por estes agentes filtráveis e, bem no início do século XX o norte-americano Walter Reed isolou o que poderia ser o agente causal, ou seja, um vírus da febre amarela. Os bacteriófagos, ou abreviadamente denominados de fagos, que são vírus que atacam bactérias destruindo (lisando) suas células hospedeiras, foram descobertos por Twort em 1915 na Inglaterra e, independentemente, por D`Herelle em 1917 conforme descrito por Azevedo (2008). Twort e também D`Herelle verificaram a presença destes elementos filtráveis, por inoculação de um filtrado após eliminação de micro-organismos não filtráveis em uma cultura turva, repleta

de bactérias que se tornava límpida por morte de lise destas bactérias. Também por semeadura de bactérias em meio sólido, e posterior inoculação de filtrados diluídos, contendo possíveis vírus, detectaram as denominadas 'placas de lise' cuja aparência está apresentada na Figura 1. Entretanto, os vírus só foram visualizados após a descoberta e uso de microscopia eletrônica de transmissão que começou a ser introduzida em pesquisa com vírus a partir dos anos 1930 a 1940 e cujos equipamentos vêm sendo constantemente aperfeiçoados. Também na mesma década iniciaram-se os experimentos mostrando serem os vírus constituídos por proteínas e ácidos nucleicos e, pela primeira vez, Stanley, nos EUA, cristalizou um vírus, o denominado TMV (*Tobacco mosaic virus*) do mosaico do tabaco que, como já mencionado havia sido estudado por Beijerinck e por Yvanovsky.

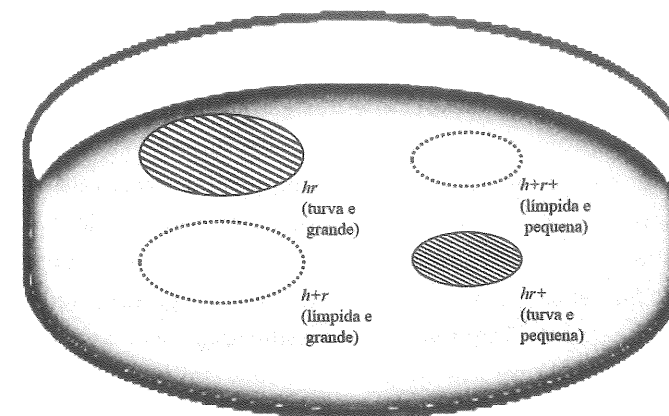


Figura 1 - 'Placas de lise' de vírus em placas de Petri com bactérias. Gene h+ placa límpida: h- placa turva. Gene r+placa pequena: r- placa grande.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

11.3 Multiplicação, classificação e formas dos vírus

Os processos de multiplicação dos vírus envolvem modificações do metabolismo das células que os albergam, ou seja, suas células hospedeiras. No estado extracelular eles são metabolicamente inertes, mas no estado intracelular, podem se duplicar muitas vezes utilizando os mecanismos das células hospedeiras para produzir mais partículas de vírus. Eles, em geral, possuem ou DNA ou RNA como material genético,

mas alguns podem usar DNA e RNA em diferentes fases da duplicação, como os denominados retrovírus. As partículas virais são, normalmente, muito pequenas, só observáveis através de microscopia eletrônica de transmissão, o que justifica a sua descoberta, apenas mais recentemente quando comparado com micro-organismos maiores como bactérias e fungos microscópicos, observáveis ao microscópio ótico. Também os vírus como não possuem maquinário para multiplicação autônoma, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios, o que não permite sua definição como seres vivos. Entretanto, a biologia deve ser entendida, como um todo, possuir características diversas das ciências exatas e, em termos evolutivos. Em biologia, sempre existe um gradiente dentro dos diferentes sistemas e etapas biológicas. É isto que ocorre em biologia quando se estuda a separação do inanimado em relação ao animado ou à vida; neste particular os vírus, independentemente de sua origem, que ainda é discutida, podem ser considerados o limite entre formas viventes e não viventes, sendo dependentes de células vivas para reproduzirem-se. Eles são encontrados tanto em eucariotos como em procariotos e arqueias, constituindo um grupo a parte não formando um reino, filos ou classes.

São considerados, por muitos autores, como pertencentes à ordem Virales, família Viridae, gênero *Virus* e a espécie é designada de acordo com suas células hospedeiras; por exemplo, se um vírus foi pela primeira vez descrito em certa planta ele pode ser designado pela espécie da planta que o hospeda e pelo sintoma que causa na planta; o mesmo ocorre se ele foi encontrado em uma célula animal incluindo as células humanas. Os vírus encontrados em fungos são denominados de micovírus e os de bactérias, como já mencionado são designados por bacteriófagos ou abreviadamente fagos. Também são classificados pelo seu ácido nucleico podendo ser vírus de DNA de fita simples ou dupla (ssDNA e dsDNA) ou de RNA (ssRNA e dsRNA) ou retrotransposons (ssRNA-RT e dsDNA-RT). Os vírus variam em tamanho, forma e composição química. O tamanho situa-se, desde 20 a 60 nm, podendo chegar a 300 nm ou ainda maiores; recentemente foram descritos vírus enormes, os denominados gigantes como será mencionado mais adiante neste mesmo capítulo.

Nos vírus, o ácido nucleico fica rodeado por proteína e esta pode ser de apenas um tipo em envoltório denominado de capsídio que pode conter subunidades, denominadas de capsômeros. Em muitos vírus, certas proteínas, as chaperonas, auxiliam a montagem das subunidades embora sem fazer parte dos vírus. O conjunto capsídio mais ácido nucleico forma o nucleocapsídio que pode ser também envolvido por uma membrana lipídica. Quanto à sua simetria, os vírus podem ser bastonetes (helicoides), por exemplo, o vírus do mosaico do tabaco (TMV) ou esféricos (icosaédricos) como o vírus das verrugas humanas ou ainda no formato típico encontrado nos bacteriófagos. Os principais formatos de vírus estão representados na Figura 2.

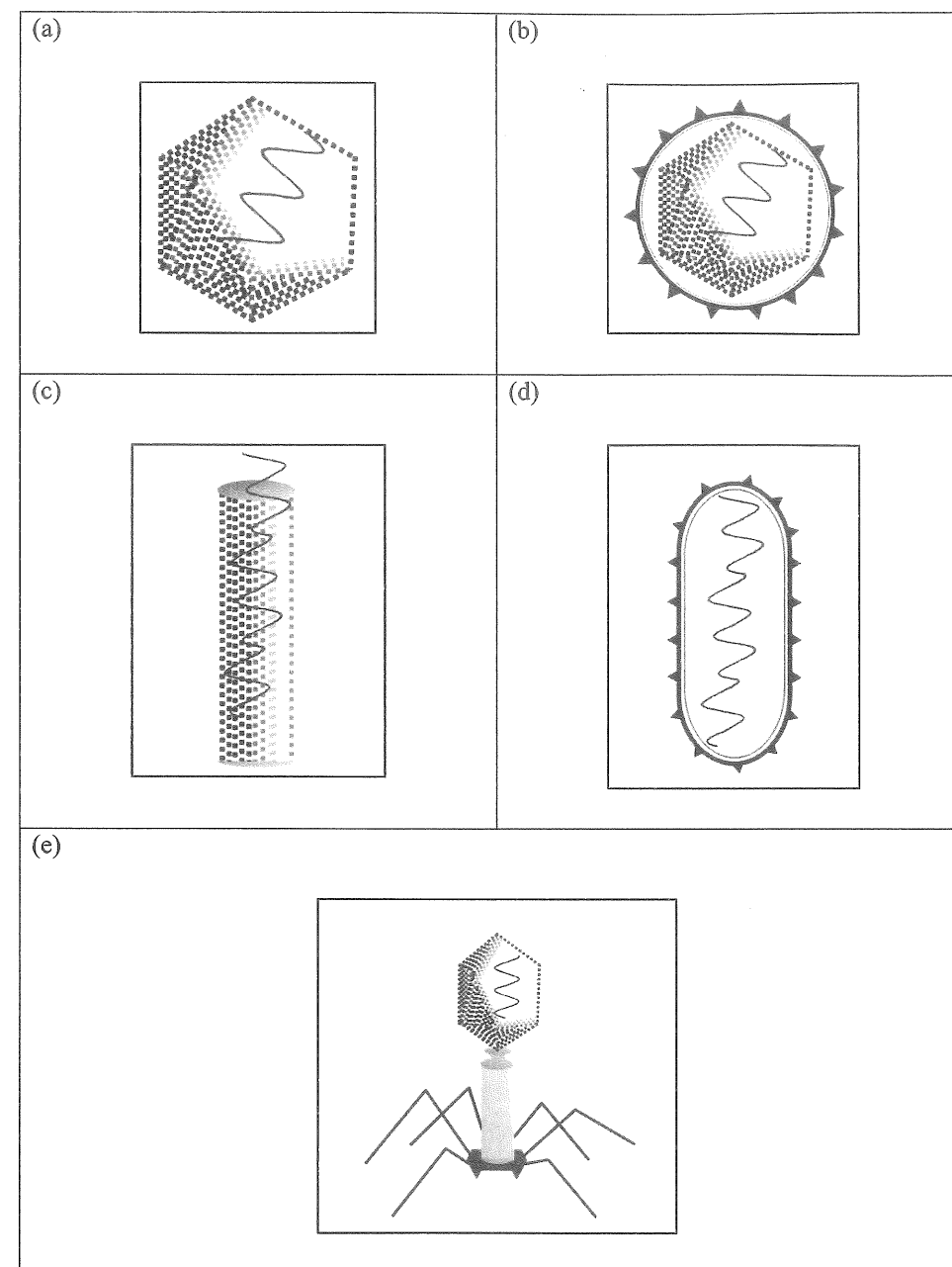


Figura 2 - Diferentes formas de vírus: a) icosaédrico sem envelope; b) icosaédrico envelopado; c) helicoidal não envelopado; d) helicoidal envelopado; e) bacteriófago (fago) típico.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

Para sua reprodução, os vírus usam o maquinário das células hospedeiras para duplicar o DNA ou RNA e montar as proteínas; detalhes desta reprodução estão descritos em livros de virologia ou textos gerais de microbiologia e genética como Madigan, Martinko e Parker (2000), Azevedo (2008) e Harper (2011).

11.4 Pontos positivos sobre os vírus

A finalidade do presente capítulo não é descrever em detalhes as mais distintas características dos vírus que, como já mencionado, podem ser encontradas em textos especializados. Vai-se procurar aqui, salientar os pontos positivos dos vírus, principalmente em relação aos aspectos ecológicos, proteção de plantas e animais e, para a saúde humana e animal, bem como seu papel na pesquisa, seu valor biotecnológico e sua importância benéfica para a vida no planeta Terra. Serão destacados alguns dos muitos pontos positivos dos vírus, especialmente na agroindústria, o que distingue esta breve revisão da maioria dos textos sobre vírus que salientam suas características prejudiciais, causadores principalmente de doenças em plantas, animais domésticos e seres humanos. Pode-se mesmo dizer que há estimativas da presença de milhares ou mesmo milhões de tipos de vírus distintos, mas, mais de 90% deles são benéficos e apenas uma pequena porcentagem causa malefícios. Dentre os diferentes efeitos benéficos de vírus, serão mencionados processos em que os vírus controlam insetos-pragas da agricultura, doenças de plantas, são usados na produção de vacinas, na fagoterapia e enzibióticos, auxiliam a degradação de bactérias marinhas, poluentes e mecanismos de controle de poluição e outros aspectos ecológicos e até sua função como vetores e auxiliares das descobertas principais da genética moderna e tecnologia do DNA recombinante, principalmente seu papel no desenvolvimento de pesquisas genéticas e de biologia molecular entre outras antes e após as descobertas de Watson e Crick em 1953, sobre a natureza e função do material genético.

11.4.1 O papel dos vírus na proteção de plantas

Os vírus, embora muitos deles sejam prejudiciais aos vegetais causando doenças, podem também atuar protegendo as plantas tanto selvagens como cultivadas, contra doenças causadas por bactérias e fungos ou reduzindo os efeitos danosos causados nas plantas por insetos, pragas da agricultura. Os vírus podem atuar também protegendo as plantas contra diferentes formas de estresse tais como o estresse hídrico (seca) ou

alta umidade, temperaturas extremas entre outros fatores ambientais. No presente capítulo vão ser descritos os principais processos pelos quais os vírus naturalmente ou por ação induzida, podem atuar favorecendo especialmente culturas de importância agrícola.

11.4.2 Fatores de estresse

As plantas estão constantemente sendo submetidas a fatores de estresse especialmente climáticos e adversidades presentes no solo tais como pH, inapropriado, compostos químicos indesejáveis e outros, além de ataques de patógenos e pragas. É natural, portanto, que os vegetais possuam mecanismos de defesa contra estes fatores de estresse. Em muitos casos existem micro-organismos tais como bactérias e fungos endofíticos que protegem as plantas contra estes fatores. Os micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem pelo menos uma parte de seu ciclo no interior de plantas, sem causar danos e inclusive podendo favorecer seus hospedeiros. Tem sido recentemente constatado que em certas plantas que vivem em solos de climas extremamente quentes e secos, só há crescimento satisfatório quando estas plantas são colonizadas, por exemplo, por alguns tipos de fungos endofíticos. O que parecia ser uma simbiose entre plantas e fungos benéficos foi reavaliada recentemente. Constatou-se que existem vírus, os denominados micovírus, no interior destes fungos. Quando estes micovírus são eliminados do interior dos fungos que os albergam, cessa esta proteção contra estresse climático, mostrando que no caso, os micovírus têm papel fundamental nesta proteção contra solos secos e temperaturas elevadas. Isto foi constatado em plantas no Parque Nacional de Yellowstone nos Estados Unidos. Da mesma maneira foram identificados vírus em beterraba que permitem a estes vegetais sobreviverem a climas secos e frios. Mais um fator de estresse é a alta salinidade dos solos a que estão submetidos os vegetais neste ambiente. No caso a tolerância de plantas a esta condição tem também sido constatada ser devida a fungos e possivelmente a micovírus que ocupam o interior destes fungos. Estes e outros fatores de estresse relacionados à proteção de plantas influenciada por vírus benéficos podem ser encontrados em Rodrigues et al. (2008) e principalmente os descritos por Roossinck (2012), Bao e Roossinck (2011).

11.4.3 Proteção contra insetos-pragas

Já foi mencionado na introdução deste capítulo e bem descrito por Alves (1998), em livro sobre controle microbiano de insetos, que uma das primeiras

observações de John Evelyn, no século XVII, de que morte de insetos pragas em florestas na Inglaterra era motivada por causas não bem elucidadas. Atualmente presume-se que os vírus possam ter sido responsáveis pela morte destes insetos e hoje em dia, vários vírus vêm sendo empregados no controle biológico de insetos pragas da agricultura. Em diversos casos este controle é natural, já existindo vírus que no interior de plantas, sem qualquer interferência humana, são capazes de proteger seus hospedeiros. Por exemplo, foram encontrados vírus tais como o ALPV (*Aphid paralysis virus*) que ocorre naturalmente em certas plantas e protegem seus hospedeiros contra pragas agrícolas, especialmente afídeos. Eles são capazes de infectar e matar estas pragas de vegetais. Alguns destes vírus são transmitidos por sementes ou podem até ser incorporados a fungos funcionando como micovírus (BAO; ROOSSINCK, 2011; ROOSSINCK, 2012).

Como técnica no controle de pragas, o biocontrole tem adquirido importância devido ao uso abusivo de produtos químicos causando aumento de poluição, efeitos tóxicos e emergência de resistência genética dos insetos a estes produtos químicos, tornando muitas vezes o controle dispendioso, poluidor e ineficaz. Por outro lado, alguns vírus que atacam insetos e são inócuos aos humanos e à vida selvagem funcionam de maneira altamente conveniente e específica como bioinseticidas. Este é o caso dos baculovírus, que se tornam opções de valor (ALVES, 1998). Com aprimoramento das formulações e sua eficiência, atualmente existem excelentes alternativas de controle biológico de certos insetos-pragas da agricultura, por exemplo, da lagarta da soja, a *Anticarsia gemmatalis* e lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) (CRUZ, 1999). A eficiência destes biocontroladores virais tem sido também ampliada pelo uso de transgênicos graças às tecnologias de biologia molecular (SZEWCZYK et al., 2006).

O baculovírus tem um nucleocapsídeo em forma de bastão e é recoberto por uma membrana. Possui oclusão cristalina (poliedro ou grânulo) envolvendo o núcleo capsídeo. Há dois tipos de baculovírus, o extracelular e o ocluso. O inseto atacado pelo vírus continua se alimentando até morrer. Há uma procura pelo melhoramento genético do vírus e pela inclusão de genes para aumentar sua eficiência. Pode-se melhorar a virulência, a resistência dos vírus à radiação solar sua granulometria, molhabilidade etc. A técnica inicialmente desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Londrina no Paraná, foi e vem sendo usada em todo país, principalmente no controle da lagarta da soja, com alta eficiência. Em Cascavel, Paraná, há produção em larga escala do vírus *Gemmatalis multiple nucleopolihedrose virus* (AGHNVPV) que produz material para inoculação de centenas de milhares de lagartas por dia.

Além dos baculovírus, outros tipos de vírus podem ser usados no controle de insetos pragas. Alguns causam danos não só contra insetos, mas também em outros

artrópodos e até em coelhos, usados no controle destes animais quando se tornam problemas e multiplicam-se rapidamente e alimentam-se de culturas agrícolas, como será visto mais adiante. Outro exemplo de vírus de valor no biocontrole, além dos baculovírus é o *Oryctes rhinoceros virus*, contra insetos do gênero *Rhinoceros*. No entanto os inseticidas virais constituem apenas cerca de 2% do mercado em comparação com produtos químicos. Isto é devido a serem muito específicos o que, embora representem vantagem ecológica por não eliminar insetos úteis, por exemplo, abelhas e bicho da seda, tem a desvantagem de produzir efeitos mais demorados quando comparados com os produtos químicos, custos altos, além de serem muito sensíveis aos fatores ambientais, entre outros, a luz solar. Deve aqui ser mencionado também que vírus no interior de fungos (micovírus), de um lado podem ser usados no controle de fitopatógenos, pois diminuem sua virulência como será visto no próximo item. Entretanto, quando estão presentes em fungos entomopatogênicos, que são utilizados no controle de insetos pragas, eles podem prejudicar esse controle e nestes casos reduzem o controle biológico de pragas por fungos patógenos de insetos. Por exemplo, Dalzoto et al. (2006) verificaram que isolados do fungo *Beauveria bassiana* que é usado no controle biológico de insetos, foram estudados para a presença de micovírus sendo demonstrado que dois isolados possuíam micovírus de dsRNA com cerca de 35 nm de diâmetro. Por parassexualidade ele foi transmitido para linhagens sem vírus, demonstrando transmissão horizontal e vertical. O vírus pode ser eliminado com o composto cicloheximida. A virulência na comparação de linhagens isogênicas com e sem micovírus revelou que a presença de micovírus resultou em hipovirulência como ocorre em patógenos hipovirulentos de plantas (ver adiante). Entretanto, a eliminação de micovírus pode ter valor, ao contrário do que ocorre em plantas, na 'cura' de linhagens hipovirulentas tornando-as virulentas, o que seria uma vantagem no controle biológico de insetos pragas da agricultura ou insetos vetores de doenças animais e humanas. Em *Euschistus heros* (percevejo marrom, praga da soja), os fungos com vírus deram em média 28% de mortalidade, comparados com os sem vírus que causaram 60% de mortalidade, cinco dias após sua inoculação (DALZOTO et al., 2006).

Como já mencionado, além de artrópodes os vírus podem ser utilizados no controle de animais que se tornam pestes agrícolas, caso de alguns mamíferos. Um exemplo de controle biológico por vírus foi descrito na Austrália quando coelhos provenientes da Europa tornaram-se pragas, após serem introduzidos no continente em 1859. O *Mixoma virus* da família Poxviridae produz mixomatose em coelhos e, este tipo de biocontrole foi introduzido na Austrália em 1950 e causou morte de mais de 85% da população de coelhos. Em 1957 já 25% dos coelhos se tornaram resistentes ao vírus o que é um exemplo de coevolução. Também notou-se que estes vírus que controlam

coelhos podem ser transmitidos por certos insetos embora eles não persistam muito tempo nos mesmos.

Além de servirem no controle biológico de vários insetos e outros tipos de pragas, os vírus especialmente o baculovírus, podem também ser usados como vetores para terapia gênica e produção de vacinas como será citado no item sobre este assunto mais adiante neste mesmo capítulo.

11.4.4 Proteção contra fitopatógenos

Os micro-organismos, entre eles as bactérias e, principalmente os fungos fitopatogênicos, são altamente danosos para culturas agrícolas. Como patógenos de plantas eles causam prejuízos de alta monta com redução e até perda total de grãos, frutas e hortaliças entre muitas outras culturas atacadas. Um ponto interessante que tem sido verificado é que muitos fungos causadores de moléstias em plantas possuem linhagens que têm no seu interior micovírus, ou seja, vírus que se multiplicam dentro dos fungos. Embora a maioria destes fungos seja críptica, ou seja, não ocasionam qualquer diferença fenotípica em relação a outras linhagens da mesma espécie, que não possuem vírus no seu interior, uma notável diferença que pode existir na sua funcionabilidade é de que fungos com micovírus, em grande parte dos casos, tem sua virulência atenuada sendo hipovirulentas portanto. Assim, uma maneira idealizada para controlar fungos fitopatogênicos é a busca de linhagens hipovirulentas possuidoras de micovírus e que podem ocupar o mesmo nicho nas plantas competindo com as virulentas, reduzindo os danos causados pelas formas virulentas, altamente patogênicas. Possivelmente do ponto de vista evolutivo é uma maneira de tanto fungos como plantas viverem em conjunto graças a uma atenuação da mortalidade das plantas atacadas pelos fungos. Com esta atenuação os fungos podem persistir dentro dos seus hospedeiros sem eliminá-los, com vantagem para fungos e plantas, com o auxílio dos vírus.

Existem micovírus em muitas espécies de fungos fitopatogênicos. Em geral eles são transmitidos durante a divisão celular e também podem ser transmitidos por protoplastos ou por parassexualidade isto é, por anastomose de hifas de linhagens distintas em crescimento, mas, não apresentam transferência extracelular (DALZOTO et al., 2006) A maioria dos micovírus tem dupla fita de RNA (dsRNA) englobadas por partículas isométricas embora sejam também encontrados micovírus não capsulados com RNA de fita simples (ssRNA) também conferindo hipovirulência aos seus fungos hospedeiros. Uma revisão sobre vírus encontrados em fungos fitopatogênicos a de Ghabrial e Suzuk (2009), na qual são relatados vários casos de hipovirulência ocasionados por micovírus.

Recentemente, vírus de DNA de fita simples (ssDNA) foram encontrados em *Sclerotines scleotiorum* conferindo hipovirulência em fungos (YU et al., 2010; JIANG et al., 2013). Como já pode ser deduzido, estes fungos portando micovírus são usados no controle biológico dos fitopatógenos, descritos na revisão de Pearson et al. (2009). Já foram relatadas mais de 80 espécies de micovírus pertencentes a dez famílias. Muitos outros exemplos de fungos portadores de micovírus e de seu uso no controle biológico são encontrados nas revistas especializadas. Como já mencionado, a maioria dos micovírus é críptica, isto é, eles não causam aparentes modificações nos fungos hospedeiros e assim só podem ser encontrados por análise de ácidos nucleicos e microscopia eletrônica de transmissão em fungos que os albergam.

No Brasil existem vários exemplos de fungos fitopatogênicos contendo micovírus. Por exemplo, o trabalho de Figueiredo et al. (2012) demonstrou existência de diversidade em *Colletotrichm gloeosporioides*, indicando a presença de formas mais e menos patogênicas (hipovirulentas) em cajueiro, potencialmente utilizáveis no controle biológico da antracnose. Uma linhagem do fungo *C. gloeosporioides* (linhagem URM 4903, Depto. Micologia da Universidade Federal de Pernambuco) após análise molecular indicou uma banda de dsRNA e análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas isométricas (30-35 nm em diâmetro) ou seja um micovírus, sendo este um dos raros casos descritos em *C. gloeosporioides*, um fungo causador da antracnose em muitas plantas cultivadas. Estudos preliminares indicaram que esta linhagem possivelmente é hipovirulenta e poderá ser usada no controle biológico da antracnose. Um recente exemplo de controle de antracnose 'in vivo' foi realizado por Bezerra (2015) em sua tese de doutorado, realizada na Universidade Federal do Amazonas, quando estudou fungos endofíticos e patogênicos do guaranazeiro. A autora verificou que, de dois isolados estudados e identificados morfológicamente como *C. gloeosporioides*, um deles mostrou a presença de vírus icosaédricos (Figura 3) enquanto o segundo não apresentou micovírus. Ensaio efetuados *in vivo* no guaranazeiro, em condições de casa de vegetação, demonstraram que houve diferença significativa em relação ao ataque de folhas, com os dois fungos isolados separadamente e quando em conjunto houve redução dos efeitos no guaranazeiro do fungo patogênico. Provavelmente um controle biológico deve ter ocorrido e, se ensaiado em campo poderá ter sucesso contra uma das mais importantes doenças do guaranazeiro na Amazônia. No Quadro 1 são apresentados os dados obtidos pelo uso do isolado hipovirulento controlando parcialmente o patógeno. Este e outros casos revelam a importância dos vírus, no caso micovírus, no controle biológico de doenças de interesse na agricultura.

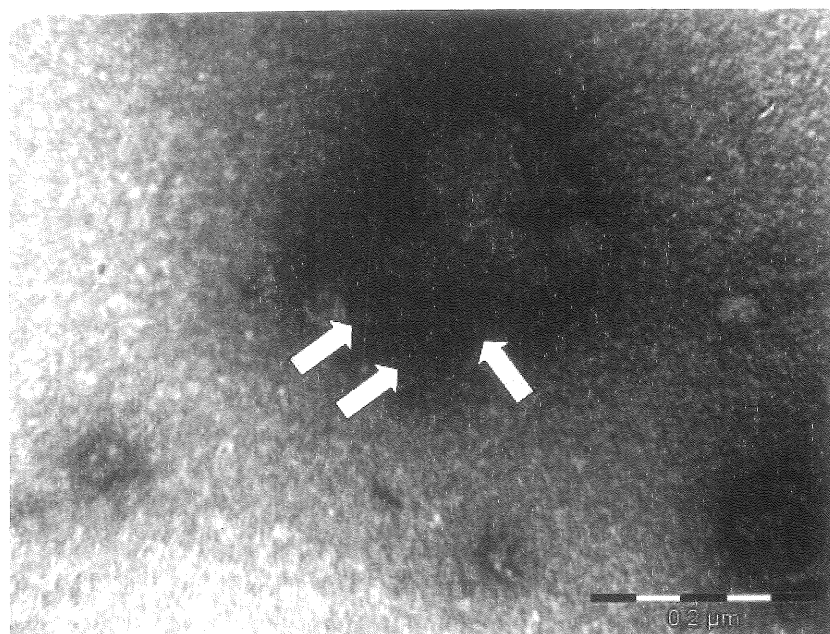


Figura 3 - As setas indicam a presença de micovírus (genoma de fita dupla de RNA (dsRNA)) em fungo filamentosos da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de guaranazeiro.

Fonte: Bezerra (2015).

Patógenos	Sintomas (cm)
<i>C. gloeosporioides</i> (com micovírus)	0,92 b
<i>C. gloeosporioides</i> (sem micovírus)	2,43 a
<i>C. gloeosporioides</i> (com e sem micovírus)	0,70 b
Controle	0,00 c

Quadro 1 - Sintomas da inoculação 'in vivo' de *Colletotrichum gloeosporioides* sem e com micovírus nas folhas jovens de *Paullinia cupana*. Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus - AM.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para cada patógeno.

Fonte: Bezerra (2015).

11.5 Papel dos vírus em ecologia

Quando se citam as bactérias, ao contrário do que se pensa, a maioria de suas espécies é benéfica em muitos aspectos com relação à existência de seres vivos e ao ambiente em geral. Embora possa parecer estranho com relação aos vírus, estima-se

que, do total de tipos de vírus que são encontrados no nosso planeta, a maioria deles tem um papel fundamental na preservação do ambiente. Já foi discutido como os vírus podem controlar doenças e pragas, especialmente as que afetam e prejudicam as práticas agrícolas. Embora, nestes exemplos, o principal beneficiário seja a espécie humana, pois os vírus eliminam pragas tais como os insetos ou reduzem os efeitos prejudiciais de outros micro-organismos, principalmente os fitopatógenos, os vírus têm papel importante na ecologia. Os vírus multiplicam-se em células vivas e, em geral, eliminam seus hospedeiros durante este processo. Sempre haverá espécies prejudicadas por vírus, mas em muitos casos o processo de eliminação de formas vivas é essencial para continuidade da vida. Um dos casos mais evidentes desta função dos vírus vem a ser sua atuação controlando bactérias dos mais distintos ambientes. Examinando oceanos constata-se que existem muito mais vírus do que bactérias no ambiente submarino. O que se verificou é que os vírus (bacteriófagos) atacam as bactérias destruindo-as fazendo com que elas não contaminem e ocupem todo o oceano e, pelo contrário, tornando o material bacteriano lisado, uma fonte de alimento para outras formas de vida nos mares como foi relatado por Engelen, da Universidade de Oldenburgo, na Alemanha, citado na breve revisão de DiGregorio em 2013. Pode-se mesmo dizer que os bacteriófagos que destroem bactérias marítimas impedem com que elas se acumulem nos mares poluindo os oceanos. Principalmente a lise das bactérias pelos bacteriófagos é o fator que permite a alimentação e sobrevivência de muitas outras formas de vida marítima em um equilíbrio que seria afetado sem a presença de vírus. Também tem sido constatado, que muitos vírus marinhos que apresentam como material genético hélice dupla de DNA possuem genes codificadores de enzimas do sistema usado por bactérias que oxidam enxofre, mostrando que eles são agentes do ciclo do enxofre aumentando a oxidação bacteriana deste elemento. Também deve haver transferência horizontal de genes de vírus para bactérias e vice-versa. Os vírus estão então envolvidos em vários ciclos como os do carbono e do enxofre. Do carbono, 50% deste elemento que são fixados no ambiente marinho provêm dos vírus (DiGREGORIO, 2013; ROHWER; BAROTT, 2013).

No nosso planeta estima-se que existem 10^{32} vírus e se considerarmos o tamanho de cada um deles, em média como sendo de 100 nanômetros, se colocados lado a lado elas iriam atingir um comprimento capaz de passar por cerca de 60 galáxias ou 100 milhões de anos luz! É uma estimativa assombrosa, mas que está a indicar a importância do papel dos vírus ainda pouco estudado e, portanto, pouco conhecido (WOMMACK, 2010). Tudo indica então que uma nova era da virologia está por surgir. Só para dar mais alguns dados, em 200 litros de água do mar há milhares de tipos distintos de vírus e, em 1 kg de sedimento marinho estima-se a existência de milhões de tipos assim como é estimado que em um ser humano ocorram cerca de 3 trilhões de vírus, muitos ocupando até nosso genoma e convivendo harmoniosamente no interior de nosso material genético. Pesquisadores que se constituem verdadeiros 'caçadores de

vírus' trabalhando em várias universidades nos EUA e pesquisando os mais diversos ambientes, estão acrescentando informações que cada vez mais atestam a importância dos vírus na existência de outros seres na face da Terra; novos conhecimentos vão sendo incluídos na virologia. Um dos muitos exemplos recentes é o papel dos vírus em controlar bactérias que atacam a superfície de metazoários. Para prevenir este ataque bacteriano há todo um sistema de proteção constituído pelo muco que é um tipo de defesa antibacteriana. Há uma simbiose entre bacteriófagos e animais (metazoários como anêmonas, peixes e até seres humanos). Estes bacteriófagos que se aderem à superfície do muco, lisam bactérias protegendo assim os metazoários, Estes dados principalmente os trabalhos de Barr (San Diego State University, EUA) podem ser encontrados na revisão de Skawarecki em 2013. De fato, uma das defesas de animais contra bactérias é a proteção que reveste células; nos seres humanos e outros animais; este muco ocorre na boca, nariz, olhos, trato digestivo. No muco existem proteínas rodeadas por açúcares, as mucinas, e na proximidade das células este muco não contém bactérias, mas, a superfície do muco é atacada por bactérias. Aí entram os vírus do tipo bacteriófagos ou fagos, que eliminam as bactérias e protegem os animais, inclusive os seres humanos contra a destruição da capa protetora do muco. Trabalhos, utilizando, em laboratório culturas de tecidos pulmonares com dois tipos de tecidos, um possuindo e outro sem muco, mostraram que cerca de 50% das células morriam, mas, se fagos eram adicionados, a mortalidade nos tecidos com muco foi muito menor. Este foi o primeiro exemplo de simbiose fagos-animais. Este exemplo, além de outros, mostram a importância dos fagos a cada vez que novas pesquisas vão sendo realizadas, por exemplo, em seu papel no controle de úlceras estomacais (SKAWARECKI, 2013).

Em plantas, há vírus denominados de agudos, que são patógenos de seus hospedeiros, mas há outros, os persistentes, que são mantidos em sementes e passam de geração a geração e possivelmente devem ser benéficos às plantas (BAO; ROOSSINC, 2011). Também pelo emprego de técnicas mais modernas a diversidade e metagenômica principalmente relativas às plantas empregadas em amostras para vírus ambientais (ROOSSINCK, 2012), revelam mais uma vez que os vírus apresentam alta diversidade e embora possam causar efeitos prejudiciais, muitos deles causam benefícios não só para plantas, mas devem possuir efeitos benéficos nos mais diversos ambientes. Por exemplo, em águas poluídas por bactérias em ambientes tais como esgotos, os fagos exercem efeito na eliminação de bactérias patogênicas e o mesmo ocorre nos mais distintos ambientes.

Os recentes trabalhos de pesquisas com vírus têm revelado a presença de alguns deles com tamanho bem maior aos até então encontrados. São os vírus denominados de gigantes que, pelo seu grande tamanho, não são filtráveis equiparando-se a pequenas bactérias. Isto inclusive faz com que a definição de vírus como sendo elementos filtráveis aos filtros que não permitem passagem de bactérias, tenha sido reavaliada.

Vírus gigantes com DNA como material genético infectando amebas foram encontrados recentemente em sedimentos marinhos e lagos por Claverie e Abergel (2013), na França. Foram denominados de vírus Pandora. O primeiro, denominado de *Pandora salinus* foi encontrado no Chile e o segundo na Austrália (*Pandoradulcis*) com genomas de 2,47 Mb e 1,91 Mb, respectivamente (STONE, 2013). No Brasil, no rio Negro, próximo à cidade de Manaus, pesquisadores franceses e da Universidade Federal de Minas Gerais, também encontraram vírus gigantes. Segundo Jonatas Abraão, da Universidade Federal de Minas Gerais (DORNAS et al., 2014), ele é patogênico, infectando células de sangue humano. É um vírus de DNA com 1,2 Mb que possui no seu interior outro vírus que foi denominado de virófago. Os vírus gigantes podem ser importantes quando estudados do ponto de vista evolutivo. Eles podem servir para explicar a origem da vida na Terra ou ainda podem ser provenientes de outros tipos ainda não bem conhecidos de células vivas, abrindo desta maneira a possibilidade de um novo domínio, acrescentado a outros domínios já estabelecidos, ou seja, os eucariotos, bactérias e arqueias.

11.6 Vírus na pesquisa

Os vírus tiveram e continuam a ter um papel muito importante no desenvolvimento de pesquisas genéticas. Eles foram os responsáveis por boa parte do que se conhece em biologia molecular microbiana e também na engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante. Para maiores detalhes basta consultar revisões de periódico como *Nature Reviews Microbiology* ou textos gerais e especializados de genética, especialmente de genética de micro-organismos. Pode-se verificar, por exemplo, que Peters em 1959 em sua coletânea sobre os mais clássicos artigos de genética, destaca o de Fraenkel-Conrat e William sobre a reconstituição do vírus do mosaico do tabaco a partir de proteína e ácido nucleico e o de Benzer sobre a ultraestrutura do gene, pela primeira vez evidenciando que o gene é divisível em mutons (unidades de mutação) recons (unidades de recombinação) e cistron (unidade de função) graças ao uso de vírus, os bacteriófagos (PETERS, 1959). Se procurarmos as publicações de livros clássicos sobre genética como os de Wagner e Mitchell (1955), ou seja, cerca de duas décadas após a primeira visualização de um vírus ao microscópio eletrônico, verifica-se que naquela época, ainda eram poucas as contribuições dos vírus à genética. Neste livro foram dedicadas cerca de uma dezena de páginas às contribuições dos fagos e do TMV à genética. Em textos mais recentes o número de dados que a virologia tem produzido está em constante incremento demonstrando que seu papel foi, é e deverá ser cada vez maior dada a sua importância como material de experimentação que proporciona rápidos resultados graças a sua diversidade, multiplicação rápida, com grande número de partículas sendo produzidas em pouco tempo e podendo ser encontrados nas mais

diversas células e habitats. Eles podem ser considerados os 'buracos negros' da biologia. Atualmente, as técnicas de metagenômica permitem o estudo do conjunto de vírus, o denominado viroma, nos mais diversos sistemas. Por exemplo, devem existir cerca de 3 trilhões de vírus em nosso corpo e 43% do nosso DNA é constituído por transposons ou vírus. Cada bactéria pode produzir cerca de 25 vírus antes de se dividir. Então dá para estudar assuntos relacionados à evolução, pelo menos 25 vezes mais rápido do que estudos de evolução em bactérias e o que não dizer quando comparados a estudos de evolução em plantas e animais. Apenas mais um exemplo de contribuição de um único bacteriófago, vem a ser o denominado fago lambda (λ). Este fago tem oferecido notáveis contribuições a problemas nos últimos 40 anos (ALLEN, 2010). Então, como sistema de pesquisa, os vírus foram e continuam sendo alicerces para adição de novos conhecimentos em genética, microbiologia e biologia como um todo, apesar de não serem propriamente considerados como seres vivos! Finalmente alguns dados de sua importância na pesquisa relacionada à genética de micro-organismos serão a seguir resumidos: o maior conhecimento dos sistemas de recombinação em bactérias; a contribuição para descobertas sobre o material genético (DNA e RNA); a mutação e recombinação em fagos; os vírus sendo usados como vetores.

11.7 Tipos de recombinação em bactérias

Três tipos clássicos de recombinação foram descritos em bactérias, a transformação, a conjugação e a transdução. Dois deles, descritos na década de 1940 no século passado, foram baseados na contribuição dos vírus. A transdução vem a ser a recombinação envolvendo bacteriófagos que podem transmitir características genéticas de células bacterianas para outras. No sistema de recombinação por conjugação, características genéticas são também transmitidas entre bactérias de mesma espécie e mesmo entre espécies distintas; este sistema envolve a presença de plasmídios que muito provavelmente tem origem viral podendo ser considerados provenientes de vírus (bacteriófagos) sem capa proteica, mas que usam pontes, os *pilli* sexuais de bactérias, que possibilitam sua transferência e mesmo transferência de parte ou todo cromossomo de uma célula bacteriana para outra. Sem a descoberta dos sistemas de recombinação em bactérias não ocorreria o rápido desenvolvimento da genética microbiana, bem como a elucidação dos sistemas de regulação gênica e da tecnologia do DNA recombinante que ocorreram do início dos anos 1950 em diante. As Figuras 4 e 5 apresentam os sistemas de recombinação em bactérias por transdução em seus dois principais tipos, a transdução generalizada (Figura 4) e a restrita (Figura 5).

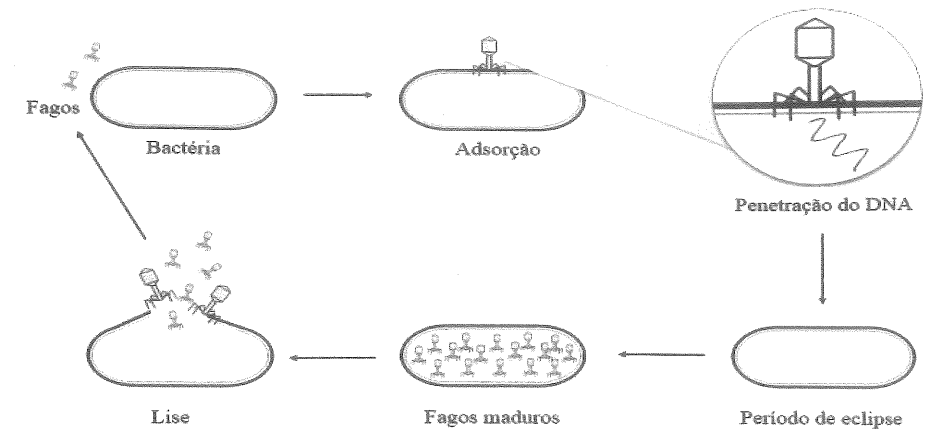


Figura 4 - A transdução generalizada mediada por bacteriófagos em bactérias. O vírus não é integrado ao cromossomo bacteriano, multiplica-se e lisa a célula.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

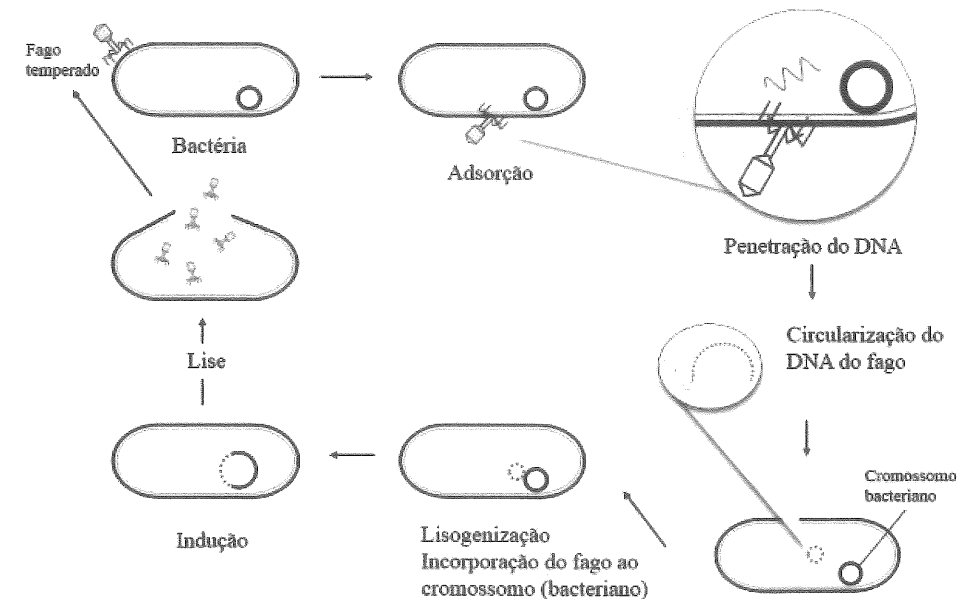


Figura 5 - A transdução restrita. O vírus é integrado ao cromossomo bacteriano (estado de profago) e pode conferir certas propriedades ao hospedeiro. Por indução pode ser liberado do cromossomo e no estado livre, lisa a célula.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

11.8 Material genético

Como revisto por Azevedo (2008), Hershey e Chase mostraram pela primeira vez, usando bacteriófagos marcados radiativamente com fósforo (DNA) e enxofre (proteínas), que embora haja penetração do DNA e de proteínas em células bacterianas, apenas o DNA era transmitido para a progênie dos vírus resultantes da lise das bactérias. Embora experimentos de transformação bacteriana mostrassem o mesmo neste sistema de recombinação em bactérias, esta pesquisa foi outro exemplo de que o DNA era o material genético, antes mesmo das clássicas descobertas de Watson e Crick (1953), mais uma vez colocando os vírus em papel de destaque no desenvolvimento da genética e biologia molecular. Outros dados importantes descobertos após a introdução dos vírus em genética foram relacionados à constatação de que os genes não são indivisíveis, mas possuem unidades de mutação, recombinação e função como já mencionado anteriormente quando foi citado o trabalho de Benzer em 1955. Estes dados foram, logo a seguir, usados para a descoberta de propriedades do código genético. Antes mesmo da decifração integral deste código. Neste caso foi empregado o fago T4 na forma selvagem e mutantes que atacam a bactéria *Escherichia coli* e cujos genes envolvidos ocupavam duas posições (A e B) do material genético do fago, quando foi mostrado pelo uso do mutagênico acridina que tem a capacidade de se inserir no DNA do fago, que o código genético devia ter três letras (03 nucleotídeos ou múltiplo de 03 nucleotídeos para cada aminoácido de 01 proteína) e deveria ter um ponto inicial e ponto final; este é mais um exemplo do valor dos vírus para elucidação e desenvolvimento de pesquisas na época. Muitos outros exemplos podem ser citados. Só para finalizar, há que se mencionar a descoberta de sistemas de restrição de entrada de bacteriófagos em bactérias que resultaram na descoberta de enzimas de restrição de grande importância para a tecnologia do DNA recombinante.

11.9 Mutantes em vírus e recombinação

Mutantes em vírus, especialmente em bacteriófagos foram inicialmente sendo descritos, a maioria relacionados às 'placas de lise' de diferentes tipos que formam em placas de Petri com meio de cultura semeado com bactérias hospedeiras. Estas placas de diferentes tipos (maiores, menores, turvas ou límpidas, circulares ou não) (Figura 1) permitiram a demonstração de que existem sistemas de recombinação em fagos e que eles trocam material genético. Surgiram assim pesquisas com genética de vírus

mesmo sem que eles fossem incapazes de formar colônias mas simplesmente pelos seus efeitos em células hospedeiras.

Vírus como vetores: um vetor é uma molécula de ácido nucleico podendo ser circular, de existência independente ou ligado ao cromossomo bacteriano e capaz de duplicar-se em células. Em geral, os vetores podem ser um plasmídeo ou vírus, o que dá no mesmo, se considerados os plasmídios como tendo origem viral. Estes vetores ou veículos são extremamente importantes, pois podem levar genes clonados (os passageiros) até uma célula hospedeira. Neste particular os vírus têm contribuído para um sistema de recombinação muito utilizado na tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética. Além de sua importância no estudo de vários aspectos básicos da pesquisa, eles têm enorme valor biotecnológico pela possibilidade de formação de produtos ditos transgênicos, combinando qualidades de diferentes espécies, gêneros e até reinos tendo assim enorme valor aplicado, tais como, na área de agricultura, para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a herbicidas, insetos pragas ou com maior qualidade nutricional. No caso de vírus, por exemplo, o *Caulimovirus*, o *Geminivirus* e outros podem ser usados para introdução de genes em plantas visando produção de proteínas de interesse. Genes introduzidos nestes vírus podem, quando incorporados a vegetais, levar estes genes de interesse a se manifestar embora os próprios vírus não necessariamente sejam multiplicados, mas permitindo pelas plantas a produção de proteínas de genes passageiros, proteínas estas que podem ser de grande valor agrônômico. Os vírus ou parte deles podem ser inseridos em um plasmídeo como o de *Agrobacterium tumefaciens* (Ti) em um processo denominado de agroinfecção. Certos promotores de *Caulimovirus* podem ser empregados em plantas transgênicas como as resistentes a herbicidas, produtoras de toxinas de insetos e outras. Da mesma maneira, os vetores virais têm valor na área de saúde, na produção de vacinas, antígenos e anticorpos. O vírus pode também ser usado como vetor para terapia gênica e produção de vacinas e o baculovírus é usado como instrumento para produção de proteínas recombinantes em células de insetos (LU; CHEN; LIU, 2012). Entretanto essas são áreas que, por não fazer parte da área de alimentação e agricultura objeto principal do presente capítulo, não serão aqui discutidas em detalhes.

11.10 Vírus usados como antibióticos

Antibióticos são empregados em rações animais com várias finalidades, por exemplo, aumentar o crescimento e peso de bovinos, aves e outros animais domésticos. A tendência é banir estas práticas em animais, pelo uso de antibióticos empregados no tratamento de infecções bacterianas na saúde humana, pois o problema de

resistência genética de micro-organismos está cada vez mais sério tornando muitos antibióticos ineficazes. O problema é incrementado pelo uso indevido e indiscriminado de antibióticos na saúde humana, animal e vegetal. Mais ainda, cada vez menos novos antibióticos são lançados no mercado tornando o problema ainda mais grave. Atualmente, a cefalosporina e o cloranfenicol são dois antibióticos já banidos para uso animal. Além disso, indústrias farmacêuticas têm diminuído ou cessado a busca de novos antibióticos de origem bacteriana ou de origem fúngica.

Uma alternativa vem a ser o uso de bacteriófagos que são os tipos mais comuns de vírus. A maioria pertence à ordem Caudovirus (caudados) e possuem como material genético o dsDNA com desde 33 mil até 170 mil pares de bases. Eles são muito limitados no tocante ao ataque de espécies bacterianas e podem lisar células, bem como nos profagos, podem ser lisogênicos (Figura 4), isto é, serem incorporados ao cromossomo bacteriano. Os fagos têm sido empregados desde o início do século XX no controle da *Salmonella* em aves. Eles foram também e ainda vêm sendo esporadicamente empregados, em pequena escala, em plantas atacadas por bactérias fitopatogênicas por aspersão de bacteriófagos em vegetais atacados por elas.

Mais recentemente fagos intactos ou suas enzimas líticas são empregadas e, neste caso, tomam o nome de enzibióticos, provenientes tanto de vírus como de outras fontes. Estes enzibióticos estão sendo usados também para preservação de queijos e vinhos, colírios e pastas dentífricas como será mencionado mais adiante. Eles não acarretam efeitos imunogênicos e alguns deles já foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*) e reconhecidos como GRAS, ou seja, considerados seguros. Este é mais um exemplo do uso benéfico dos vírus. O termo enzibióticos refere-se principalmente a vírus (fagos) que atacam e lisam bactérias luta contra doenças. (VEGA-CRESPO et al., 2007). É interessante que este tipo de emprego dos fagos como antibióticos já teve uma boa aceitação nos primórdios do século XX, após os trabalhos de Twort e D`Herelle já citados anteriormente. Foram muitas, na época, as pesquisas realizadas nos EUA, Europa Ocidental e principalmente na antiga União Soviética e Polônia, mas pouco divulgados por seus trabalhos serem publicados em russo o polonês, O denominado fenômeno Twort-D`Herelle já mencionado na introdução do presente capítulo desencadeou inclusive o uso de fagos por D`Herelle para curar crianças de surtos de disenteria. Em 1919/1921, os fagos foram usados contra doenças de pele causadas por *Staphylococcus*. Também foram relatados tratamentos da cólera e peste bubônica por meio de fagos. Estes remédios foram comercializados pela famosa empresa L`Oreal. Em 1940, a Ely Lilly Co., empresa norte-americana, também comercializou estes produtos de fagos mas, os mesmos foram quase que abandonados a partir dos anos 1940 em diante, devido ao sucesso dos antibióticos especialmente a penicilina. No entanto, um melhor e maior conhecimento dos fagos só ocorreu após 1939 com o uso da microscopia eletrônica. Esse fato limitava seu emprego, pois

pensava-se que eles eram muito amplos em espectro o que não era verdadeiro. Também o modo de aplicação limitava seu uso, pois muitos fagos já estavam inativos quando aplicados reduzindo assim sua eficiência. Como resultado, os fagos empregados como antibióticos foram praticamente deixados de lado e apenas na União Soviética este estudo ainda persistiu em pequena escala. Entretanto com o aumento da resistência aos antibióticos comuns e redução do número de novos antibióticos no mercado, vários produtos à base de fagos continuam sendo comercializados especialmente na Rússia destacando-se o Eliava Institute (EIBMV) que testou e está empregando vários destes produtos. Neste instituto já trabalharam cerca de 1.200 técnicos envolvidos em formulações contra *Proteus* e *Staphylococcus*. Também o Hirszfeld Institute (HIET), fundado em 1952, tem produtos contra as bactérias do gênero *Shigella*. Mais recentemente, o instituto contra doenças animais no Reino Unido, usa produtos de fagos no controle de doenças de porcos, carneiros e bovinos contra *Klebsiella* e *E. coli*. Este tipo de controle ou fagoterapia utiliza coleções de fagos contra infecções bacterianas humanas e de outros animais ou contra bactérias fitopatogênicas. Têm sido descritos casos de sucesso da ordem de 75% a 100% após 15 dias de tratamento.

Recentemente, uma instituição designada de GLOBAL VIRAL foi fundada em San Francisco, Califórnia, em 2009, por Nathan Wolfe, que procura meios de minimizar efeitos de doenças de alto impacto. Em 1980, William Smith, no Reino Unido, mostrou em camundongos, que os fagos estavam sendo mais efetivos que antibióticos comuns no controle de diarreias em porcos, carneiros e outros animais domésticos. A partir de 2007, cinco produtos foram licenciados nos EUA contra bactérias fitopatogênicas de tomateiros e pimentão, e também na destruição de bactérias que causam envenenamento de alimentos bem como no controle da febre aftosa animal. Há ainda problemas de aceitação, mas o futuro da fagoterapia é promissor e esperam-se novos produtos empregando vírus que venham a ser mais numerosos à medida que os antibióticos clássicos vão perdendo sua ação devido ao problema da resistência genética bacteriana aos mesmos. Mais detalhes sobre a fagoterapia pode ser encontrada em Sulakvelidze et al. (2001).

11.11 Vírus empregados na alimentação e outros produtos

Já foi mencionado que a fagoterapia pode ser usada no controle de alimentos prevenindo emergência de bactérias danosas que são eliminadas pelos fagos. Outros exemplos podem aqui ser descritos.

Um dos exemplos mais bem estudados da utilização de vírus na indústria alimentícia é na produção de vinhos, bebidas destiladas e fermentações. É

conhecido que fungos do tipo leveduras são empregados em fermentações para produção de vinhos, bebidas destiladas, panificação etc. Muitas destas leveduras, por exemplo, as vinícolas são conhecidas por possuírem uma forma de vírus no seu interior, os denominados fatores 'assassinos' ou *killers*. O caráter *killer* foi descrito pela primeira vez e, como quase sempre, na microbiologia da época, por Pasteur. Esta característica é encontrada em linhagens de vírus de dsDNA existentes em leveduras e outras espécies que são produtoras de toxinas secretadas para o exterior das células que albergam os vírus *killer*. Leveduras com o fator *killer* isolados de uvas foram avaliadas para produção de vinhos. Duas destas linhagens foram testadas em coexistência com as cepas comerciais Vin 7 e GS 1. A cepa GS-1 mostrou-se muito mais sensível em comparação com a cepa Vn 7. Em fermentações mistas, a produção depende do tamanho da população *killer* e da toxina produzida e o grau de sensibilidade da cepa de vinho usada. Um fator, o *killer-103*, praticamente exterminou a população de uma levedura de vinho em concentração de apenas 0,1% da população total de leveduras (JACOBS; VAN VUUREN, 1991). Então, o emprego de leveduras apropriadas vem se tornando muito importantes em fermentações alcoólicas devendo-se ter em conta as populações de leveduras utilizadas para que produtos de boa qualidade sejam obtidos. Mais recentemente têm sido apresentados resultados que demonstram que micro-organismos endofíticos podem alterar o *terroir* (palavra francesa que indica território e compreendem também outros fatores como clima, solo etc) de vinhos o que pode se constituir em um processo de melhoramento do flavor de vinhos finos. Da mesma forma, leveduras usadas na produção de vinhos podem ser adicionadas ao solo e têm sido visto que elas podem ser incorporadas as uvas (MANDI et al., 2015). Os vinhos modificados pelos micro-organismos são responsáveis pela aceitação do consumidor, aumento de qualidade e valor econômico e isto não é só devido ao clima, tipo de uva, solo etc. Entram os micro-organismos do solo e endofíticos que podem ser introduzidos ou mesmo manipulados geneticamente e aí se incluem leveduras como as *killer* salientando-se que o fator *killer* é um vírus ou originário de partículas virais. Ao se pensar em leveduras contendo vírus do tipo *killer*, isto pode contribuir para alterar para melhor ou pior o flavor de vinhos e outros alimentos que usam leveduras de fermentação. Também fagos da bactéria *Leuconostoc* australianos foram encontrados em quatro fermentações de vinhos tintos e foram inativados em pH menor que 3,5 e adição de dióxido de enxofre. Até o momento, leveduras *killer* são pouco estudadas em fermentação alcoólica. Elas podem prejudicar ou beneficiar a fermentação, eliminando cepas prejudiciais (ANTONINI et al., 2005). Da mesma forma que em vinhos, leveduras *killer* foram encontradas em caldo de cana para fabricação de cachaça e podem alterar sua produção, pois 7% das leveduras encontradas têm o fator *killer*. O mesmo deve estar ocorrendo em casos de fermentações para produção de etanol como combustível; neste caso o

rendimento tem sido aumentado por manipulação das leveduras empregadas e os vírus poderão ter um papel de destaque na eliminação de bactérias contaminantes nas fermentações.

No caso de laticínios, há também influência dos vírus em produtos lácteos como leite, queijos e outros. Em geral, os fagos podem ser prejudiciais, mas se bem manipulados eles podem deixar de se constituírem em problemas e se usados corretamente podem beneficiar a produção destes produtos à base de leite (MARCÓ; MOINEAU; QUIBERONI, 2012). Foi detectada também na bactéria *Kluyveromyces lactis* um elemento linear de origem viral com multiplicação semelhante à adenovírus que também pode alterar para melhor ou pior a valor comercial dos produtos lácteos.

Finalmente, os fagos podem ser usados em dentifrícios, corantes, cosméticos e outros produtos como eliminadores de bactérias indesejáveis. Estes produtos com vírus protetores ainda deverão se expandir, reduzindo a utilização de antibióticos e consequentemente também o uso de antibióticos para cura de infecções bacterianas. É mais um exemplo do uso dos vírus e seus aspectos benéficos.

11.12 Conclusões

O presente capítulo procurou mostrar que os vírus, muito mais que prejudiciais à vida na Terra, são essenciais para nossa sobrevivência. O seu papel na ecologia, na proteção de plantas e animais e inclusive na perpetuação da espécie humana é relevante e imprescindível. O tema foi abordado principalmente envolvendo a área da agroindústria e pesquisa, mas, espera-se que tenha ficado claro que os vírus têm pontos positivos também nas áreas de saúde e auxiliam o desenvolvimento de outros campos de pesquisas com amplas aplicações biotecnológicas.

Referências

- ALLEN, R. Modelling bacteriophage. **Microbiology Today**, London, v. 37, p. 20-23, 2010.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

- ANTONINI, S. R. C. et al. The killer yeasts and the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, 5° SIPAL, p. 40-46, 2005.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2. ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2008.
- BAO, X.; ROOSSINCK, M. Multiplexed interesting virus of endophytic fungi. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 80, p. 32-58, 2011.
- BENZER, S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, D.C., v. 41, no. 6, p. 344-354, 1955.
- BEZERRA, T. E. **Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos no guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose**. 2015. 101 f. Tese de (Doutorado)-PPGF em Biotecnologia Interunidades, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.
- CLAVERIE, J.-M.; ABERGEL, C. Open questions about giant viruses. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 85, p. 25-56, 2013.
- CRUZ, I. Utilização do baculovírus no controle da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariuna: Embrapa, 1999. p. 201-230
- DALZOTO, P. R. et al. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 110, no. 12, p. 1475-1481, 2006.
- DIGREGORIO, B. In ocean sediments phages outnumber hosts raising questions. **Microbe Magazine**, St. Paul, v. 8, no. 12, p. 485-486, 2013.
- DORNAS, F. et al. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon region Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, no. 3, p. 469-472, 2014.
- FIGUEIRÊDO, L. C. et al. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, Jaipur, v. 2, no. 1, p. 250-259, 2012.
- GHABRIAL, S.; SUZUK, N. Viruses of plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 353-384, 2009.

- HARPER, D. **Viruses: biology, applications and control**. New York: Garland Science, 2011.
- JACOBS, C.; VAN VUUREN, J. Effects of different killer yeasts on wine fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42, p. 295-300, 1991.
- JIANG, D. et al. Virus of the plant pathogenic fungus *Sclerotinea sclerotiorum*. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 86, p. 215-248, 2013.
- LU, H.-Y.; CHEN, Y.-H.; LIU, H.-J. Baculovirus as a vaccine vector. **Bioengineered**, Austin, v. 3, no. 5, p. 271-274, 2012.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- MANDI, K. et al. Vines take up yeasts from soil and transport them through the vine to the stem and skins of grapes. **Journal fur Terroiwien Biodiversitat und Klimafarming**, Ithaka, p. 349-355, 2015.
- MARCÓ, M. B.; MOINEAU, S.; QUIBERONI, A. Bacteriophages and dairy fermentations. **Bacteriophage**, Austin, v. 2, no. 3, p. 149-158, 2012.
- PEARSON, M. et al. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, no. 1, p. 115-128, 2009.
- PETERS, J. **Classic papers in genetics**. New Jersey: Prentice Hall, 1959.
- RODRIGUES, R. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME Journal**, London, v. 2, no. 4, p. 404-416, 2008.
- ROHWER, F.; BAROTT, K. Viral information. **Biology & Philosophy**, New York, v. 28, no. 2, p. 283-297, 2013.
- ROOSSINCK, M. Viruses can be our friends. **Microbiology Today**, London, v. 39, p. 100-103, 2012.
- SKWARECKI, B. Friendly viruses protect us against bacteria. **ScienceAAAS/News**, Washington, D.C., 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/2013/05/friendly-viruses-protect>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

STONE, M. Newly analysed giant viruses suggest reconfigured tree of life. **Microbe Magazine**, Washington, D.C., v. 8, no. 10, p. 386-387, 2013.

SULAKIVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JR., G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, D.C., v. 45, no. 3, p. 649-659, 2001.

SZEWEZYK, B. et al. Baculovirus: re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, no. 2, p. 143-160, 2006.

VEGA-CRESPO, P. et al. Enzybiotics: a look to the future, recalling the past. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 96, no. 8, p. 1917-1924, 2007.

WAGNER, R.; MITCHELL, H. **Genetics and metabolism**. New York: John Wiley, 1955.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Compton. molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose. **Nature**, London, v. 171, no. 4356, p. 737-738, 1953.

WOMMACK, E. Viral ecology: old questions, new challenges. **Microbiology Today**, London, v. 37, no. 2, p. 96-99, 2010.

YU, X. et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, D.C., v. 107, no. 18, p. 8387-8392, 2010.

Microalgas: possível solução para um mundo sustentável?

Vanessa Kava, José Viriato Coelho Vargas, André Bellin Mariano

12.1 Introdução

O crescimento contínuo da demanda de energia global está exigindo o desenvolvimento de alternativas de combustível. Além da necessidade pelo consumo, a conscientização dos problemas ambientais gerados pelo uso de combustíveis fósseis tem impulsionado as pesquisas em busca de alternativas viáveis de energia limpa. Neste cenário, os investimentos na pesquisa e desenvolvimento de fontes energéticas renováveis têm sido incrementados, e a viabilidade econômica no uso de energia limpa que há poucas décadas parecia inatingível, atualmente passou a uma realidade possivelmente próxima. Uma das principais críticas na produção de biocombustíveis de origem vegetal é o uso de áreas agricultáveis para a produção de alimentos para fins energéticos, enquanto a fome continua a fazer parte das deficiências mundiais. Considerando este contexto, o desenvolvimento de uma metodologia economicamente viável para a produção de biocombustíveis e bioprodutos por microalgas aparece como uma solução que atende a todos estes requisitos.

Uma das aplicações mais importantes das microalgas é a energética, uma vez que podem gerar energia de diferentes formas, tais como bio-hidrogênio, biodiesel e biogás. A atenção das indústrias tem se voltado cada vez mais para o ramo de biodiesel derivado de microalgas, pois além de ecologicamente correto, as algas têm um potencial maior do que as culturas tradicionais (oleaginosas), oferecendo um rendimento satisfatório em curto espaço de tempo. Além de fonte energética, as microalgas produzem substâncias de interesse da indústria farmacêutica e nutracêutica de alto valor agregado, como os derivados de carotenoides. As microalgas podem ser cultivadas em fotobiorreatores (FBRs), desta forma não oneram o uso de terras que podem ser destinadas à agricultura. As condições de cultivo podem ser parcialmente controladas e devem ser adequadas para cada espécie de microalga. Atingindo-se as melhores condições, o incremento da produção torna-se limitado, porém estratégias