



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



ESTUDO DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA FRENTE A QUIMIOTERÁPICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SISTEMA BIOLÓGICO

Carine Emile Menezes Lagrange

Recife
2020

Carine Emile Menezes Lagrange*

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA FRENTE A
QUIMIOTERÁPICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE
SISTEMA BIOLÓGICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Área de concentração: Química
Inorgânica

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Mônica Freire Belian.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva.

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L178e Lagrange, Carine Emile Menezes
 Estudo da resistência adquirida frente a quimioterápicos através da análise de sistema biológico /
Carine Emile Menezes Lagrange. - 2020.
 177 f. : il.
- Orientadora: Monica Freire Belian.
 Coorientador: Wagner Eduardo da Silva.
 Inclui referências e apêndice(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Química, Recife, 2020.
1. Resistência a múltiplas drogas . 2. Cisplatina . 3. Oxaliplatina. 4. Zymomonas mobilis. I. Belian,
Monica Freire, orient. II. Silva, Wagner Eduardo da, coorient. III. Título

Carine Emile Menezes Lagrange*

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA FRENTE A
QUIMIOTERÁPICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SISTEMA
BIOLÓGICO**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em
Química pela Universidade Federal
Rural de Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Mônica Freire Belian (Orientadora)

Departamento de Química - UFRPE

Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva (Orientador)

Departamento de Química - UFRPE

Prof. Dr. Jandyson Machado Santos

Departamento de Química - UFRPE

Profº. Dr. João Rufino de Freitas Filho

Departamento de Química - UFRPE

Profº. Dr. Marcílio Martins Moraes

Departamento de Química – UFRPE

Profº. Dr. Ricaro Yara

Departamento de Engenharia Biomédica – UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais, Nadja e Roger, por toda dedicação e amor. A minha tia Valdeci por sempre me apoiar. Ao meu querido esposo Amós, pela força e amor.

Obrigada a todos, por tantos momentos ao meu lado e por todo o incentivo prestado durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre caminhar ao meu lado me dando forças;

Aos meus pais, que mesmo com todas as dificuldades sempre estiveram ao meu lado, em especial a minha mãe que é minha maior inspiração, um exemplo de mulher guerreira;

Ao meu esposo, Amós, que sempre teve muita paciência, que me apoiou, me deu forças e incentivo para que eu tomasse minhas próprias decisões, sempre ao meu lado, obrigada por não soltar minha mão em nenhum momento durante toda essa jornada;

A minha Tia, Valdeci, que mesmo longe sempre está presente em minha vida;

A minha família “*a família que a gente escolhe*”, Kikinha, Jairo, Amós, Dmis, Jeferson, Tina e Amanda, por sempre estarem comigo, por todo momento de paz, alegria e amor que vocês me proporcionam. Só gratidão por vocês permitirem que eu seja família de vocês.

Aos meus amigos Danilo, Nattany, Renê, Nayara, Lidiane e Aline, que sempre estiveram presentes e que me ajudaram no que foi preciso;

Aos meus orientadores, Mônica e Wagner, pela oportunidade, paciência, pelos conselhos, por todo o apoio e pela contribuição em minha formação científica, só tenho gratidão a vocês;

A todos do nosso grupo de pesquisa, e do LAMTESA, que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

A todos do LABIO, em especial Isaac e Aldenise por me ajudarem no que foi preciso, contribuindo com este trabalho.

A todos os professores, que contribuíram imensamente para minha formação acadêmica;

A FACEPE pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Um grande desafio dentro da medicina voltada para o tratamento do câncer é o surgimento da resistência adquirida pelos pacientes frente aos fármacos que são empregados para o tratamento da doença, com base nessa problemática, este trabalho faz uso bactéria *Zymomonas mobilis* para analisar o tempo de resistência adquirida provocada pelo uso continuado desses fármacos. O perfil de crescimento desse micro-organismo foi analisado com e sem adição dos fármacos antineoplásicos, a cisplatina - $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2]$ e a oxaliplatina - $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{ox})(\text{dach})]$. Os testes foram feitos através do uso de um espectrofotômetro de absorção eletrônica (UV-VIS) com comprimento de onda fixado em 660 nm e contagens dos micro-organismos, realizadas em câmara de *Neubauer*, observando as mudanças provocadas na morfologia das bactérias submetidas aos fármacos. Neste trabalho também foi desenvolvido um modelo matemático para melhor interpretar o surgimento de resistência celular encontrada. Os dados observados revelaram o aparecimento de resistência adquirida causada pelo uso continuado dos dois fármacos, os resultados mostraram tempos de resistência de 31, 33, 36, 37, 39 e 51 h com o uso de 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,8; 2,081 e $4,163 \times 10^{-7}$ mol respectivamente, de cisplatina, e para a oxaliplatina os resultados encontrados foram 55 h para $0,5 \times 10^{-7}$ mol, 37 h usando $1,0 \times 10^{-7}$ mol e 33 h para o uso de 1,3; 2,0; 2,5 e $3,146 \times 10^{-7}$ mol e 36h para e $4,405 \times 10^{-7}$ mol. Verificou-se que a melhor resposta obtida para o sistema biológico foi com o uso da oxaliplatina, por possuir uma taxa evolutiva de $11,376 \times 10^4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, superior à da cisplatina com $4,624 \times 10^4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, demonstrando que o uso desta ultima provoca o surgimento de resistência mais rapidamente que a oxaliplatina.

Palavras-chaves: Resistência a múltiplas drogas (MDR), cisplatina, oxaliplatina, *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT

A major challenge of medicine aimed at treating cancer is the emergence of resistance acquired by patients against drugs used to treat the disease, based on this problem, this work uses the bacterium *Zymomonas mobilis* to analyze the time of acquired resistance caused by the continued use of these drugs. The growth profile of this microorganism was analyzed with and without the addition of antineoplastic drugs, Cisplatin- *cis*- [Pt (Cl)₂(NH₃)₂] and Oxaliplatin - *cis*- [Pt(ox)(dach)]. The tests were carried out using an electronic absorption spectrophotometer (UV-VIS) with a wavelength fixed at 660 nm and microorganism counts, which were carried out in a Neubauer chamber, observing the changes caused in the morphology of the submitted bacteria to drugs. In this work, a mathematical model was also developed to better interpret the emergence of cellular resistance found. The observed data revealed the appearance of acquired resistance caused by the continued use of the two drugs, the results showed resistance times of 31, 33, 36, 37, 39 and 51 h with the use of 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,8; 2,081 and 4,163 x 10⁻⁷ mol respectively of Cisplatin, and for Oxaliplatin the results found were 55 h for 0,5 x 10⁻⁷ mol, 37 h using 1,0 x 10⁻⁷ mol and 33 h for the use of 1,3; 2,0; 2,5 and 3,146 x 10⁻⁷ mol and 36h for e 4,405 x 10⁻⁷ mol. We also found that the antimitotic with the best response in this system was Oxaliplatin, for possessing an evolutionary rate of 11,376 x 10⁴.h⁻¹.mol⁻¹, higher than that of Cisplatin with 4,624 x 10⁴.h⁻¹.mol⁻¹, this shows that the use of this last causes the emergence of resistance faster than Oxaliplatin.

Keywords: Resistance to multiple drugs (MDR), cisplatin, oxaliplatin, *Zymomonas mobilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de Carcinogênese.....	23
Figura 2. Estrutura da Cisplatina.....	24
Figura 3. Fotografia de uma lâmina contendo <i>Escherichia coli</i> em meio nutritivo, retirada de teste que teve duração de 3 horas em contato com 13 g mL ⁻¹ de Platina: a) assim que foi retirada do teste; b) após 225 min da sua retirada do teste.....	25
Figura 4. Reações de formação dos complexos ativos no meio celular.	26
Figura 5. Tipos de coordenação da CDDP ao nDNA: (a) Monofuncional (X= Cl ⁻ ou H ₂ O); (b) Interfita; (c) Intermolecular; (d), (e) e (f) Intrafita.....	27
Figura 6. Estrutura da Oxaliplatina.....	29
Figura 7. Curva de crescimento microbiano e suas fases.....	35
Figura 8. Câmara de Neubauer, utilizada em contagens microbianas.	36
Figura 9. Esquema resumido de Turbidimetria, onde: I ₀ = Intensidade da radiação incidente; e I = Intensidade da radiação transmitida.....	37
Figura 10. Esquema de teste realizado para conhecimento de melhor concentração estoque de antimetabólico.....	43
Figura 11. Esquema de teste realizado para conhecimento das melhores quantidades de números de mol de antimetabólico.....	44
Figura 12. Esquema da recuperação dos resíduos de platina.....	47
Figura 13. Cristais de hexacloroplatinato de potássio (a) e tetracloroplatinato de potássio (b).....	48
Figura 14. Difratoograma de Raios-X dos dados experimentais (hexacloroplatinato de potássio sintetizado) e do banco de dados sobrepostos.....	48
Figura 15. Difratoograma de Raios-X dos dados experimentais (tetracloroplatinato de potássio sintetizado) e do banco de dados sobrepostos.....	49
Figura 16. Esquema simplificado da obtenção da CDDP.....	50

Figura 17. Difratoograma de raios-X da CDDP.....	50
Figura 18. Esquema reacional de formação da Oxaliplatina.....	51
Figura 19. Difractometria de Raios-X da Oxaliplatina, referências retiradas de ULLAH, <i>et al.</i> , 2019.....	52
Figura 20. Curva de crescimento, momento em que microrganismo atinge fase estacionária.....	53
Figura 21. Controle, teste de crescimento microbiano sem adição de antimetabólito.....	54
Figura 22. Controle: morfologia das bactérias <i>Z. mobilis</i> sem agente antimetabólico, imagens com: A) 12h, B) 36h C) 60h de evento.....	57
Figura 23. Dados da análise turbidimétrica com adição de cisplatina, momento em que a fase estacionária é atingida.....	62
Figura 24. Dados da análise turbidimétrica com adição de oxaliplatina, momento em que a fase estacionária é atingida.....	63
Figura 25. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $5,0 \times 10^{-8}$ mol de antimetabólito.	65
Figura 26. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $7,0 \times 10^{-8}$ mol de antimetabólito.....	65
Figura 27. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,0 \times 10^{-7}$ mol de antimetabólito.....	66
Figura 28. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,5 \times 10^{-7}$ mol de antimetabólito.....	66
Figura 29. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,8 \times 10^{-7}$ mol de antimetabólito.....	67
Figura 30. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $2,081 \times 10^{-7}$ mol de antimetabólito.....	67
Figura 31. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $4,163 \times 10^{-7}$ mol de antimetabólito.....	68
Figura 32. Dados referentes à contagem de células totais por tempo com $0,5$; $0,7$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol de cisplatina.....	69
Figura 33. Dados referentes à contagem de células totais por tempo com $1,5$ e $1,8 \times 10^{-7}$ mol de cisplatina.....	69

Figura 34. Dados referentes à Contagem de células totais por tempo com 2,081 e 4,163 x 10 ⁻⁷ mol de cisplatina.....	70
Figura 35. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 5,0 X 10 ⁻⁸ mol de antimitótico.....	71
Figura 36. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 1,0 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	72
Figura 37. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 1,3 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	72
Figura 38. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 2,0 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	73
Figura 39. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 2,5 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	73
Figura 40. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 3,146 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	74
Figura 41. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de 4,405 X 10 ⁻⁷ mol de antimitótico.....	74
Figura 42. Contagem de células totais por tempo com 0,5; 1,0 e 1,3 x 10 ⁻⁷ mol de Oxaliplatina.....	75
Figura 43. Contagem de células totais por tempo com 2,0 e 2,5 x 10 ⁻⁷ mol de oxaliplatina.....	76
Figura 44. Contagem de células totais por tempo com 3,146 e 4,405 x 10 ⁻⁷ mol de Oxaliplatina.....	76
Figura 45. Efeito causado na morfologia das bactérias <i>Z. mobilis</i> com o uso de CDDP: A) 5,0 x 10 ⁻⁸ mol, 36h; B) 7,0 x 10 ⁻⁸ mol, 36h; C) 1,0 x 10 ⁻⁷ mol, 36h; D) 1,5 x 10 ⁻⁷ , 24h; E) 1,8 x 10 ⁻⁷ mol, 36h; F) 2,081 x 10 ⁻⁷ mol, 36h e G) 4,163 x 10 ⁻⁷ mol, 48h.....	82
Figura 46. Efeito causado na morfologia das bactérias <i>Z. mobilis</i> com o uso de OXP: A) 5,0 x 10 ⁻⁸ mol, 36h; B) 1,0 x 10 ⁻⁷ mol, 36h; C) 1,3 x 10 ⁻⁷ mol, 24h; D) 2,0 x 10 ⁻⁷ , 12h; E) 2,5 x 10 ⁻⁷ mol, 12h; F) 3,146 x 10 ⁻⁷ mol, 24h e G) 4,405 x 10 ⁻⁷ mol, 24h.....	85
Figura 47. Gráficos referentes à velocidade específica de crescimento nos diferentes eventos, para teste com o uso do antimitótico CDDP. A) 5,0 x 10 ⁻⁸ mol, B) 7,0 x 10 ⁻⁸ mol, C) 1,0 x 10 ⁻⁷ mol, D) 1,5 x 10 ⁻⁷ mol, E) 1,8 x 10 ⁻⁷ mol, F) 2,081 x 10 ⁻⁷ mol, G) 4,163 x 10 ⁻⁷ mol de CDDP.....	92

Figura 48. Gráfico referente à taxa específica de crescimento nos diferentes eventos, para teste com o uso do antimitótico Oxaliplatina. A) $5,0 \times 10^{-8}$ mol, B) $1,0 \times 10^{-7}$ mol, C) $1,3 \times 10^{-7}$ mol, D) $2,0 \times 10^{-7}$ mol, E) $2,5 \times 10^{-7}$ mol, F) $3,146 \times 10^{-7}$ mol, G) $4,405 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.....	93
Figura 49. Gráfico referente a Taxa Evolutiva com CDDP, tempo de inversão populacional e desvio padrão.....	98
Figura 50. Gráfico referente a Taxa Evolutiva com OXP, tempo de inversão populacional e desvio padrão.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem microbiana e tempo do evento para controle.....	55
Tabela 2. Média de comprimento microbiano na fase estacionária sem adição de agente antimetabólico.....	57
Tabela 3. Teste para definir concentração de CDDP.....	58
Tabela 4. Teste para definir concentração de oxaliplatina.....	59
Tabela 5. Dados obtidos nos testes para verificar o número de mols de cisplatina para usar em análise microbiana.....	60
Tabela 6. Dados obtidos nos testes para verificar o número de mols de oxaliplatina para usar em análise microbiana.....	61
Tabela 7. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com 5×10^{-8} mol de CDDP.....	77
Tabela 8. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com 7×10^{-8} mol de CDDP.....	78
Tabela 9. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	78
Tabela 10. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	78
Tabela 11. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	79
Tabela 12. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	79
Tabela 13. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	79
Tabela 14. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.....	80
Tabela 15. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	80
Tabela 16. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	80
Tabela 17. Média de comprimento microbiano na fase estacionária	81

para teste com $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	
Tabela 18. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	81
Tabela 19. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $3,146 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	81
Tabela 20. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $4,405 \times 10^{-8}$ mol de OXP.....	82
Tabela 21. Valores de μ para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.....	87
Tabela 22. Valores de μ para $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.....	88
Tabela 23. Valores de μ para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	88
Tabela 24. Valores de μ para $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	88
Tabela 25. Valores de μ para $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	88
Tabela 26. Valores de μ para $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	89
Tabela 27. Valores de μ para $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	89
Tabela 28. Valores de μ para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.....	89
Tabela 29. Valores de μ para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	90
Tabela 30. Valores de μ para $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	90
Tabela 31. Valores de μ para $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	90
Tabela 32. Valores de μ para $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	90
Tabela 33. Valores de μ para $3,146 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.....	91
Tabela 34. Valores de μ para $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	91
Tabela 35. Valores referentes à Taxa Evolutiva com CDDP.....	97
Tabela 36. Valores referentes à Taxa Evolutiva com Oxaliplatina.....	97
Tabela 37. Valores de g para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.....	100
Tabela 38. Valores de g para $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.....	100
Tabela 39. Valores de g para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	100
Tabela 40. Valores de g para $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	101
Tabela 41. Valores de g para $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	101
Tabela 42. Valores de g para $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	101
Tabela 43. Valores de g para $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.....	102
Tabela 44. Valores de g para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.....	102
Tabela 45. Valores de g para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	102
Tabela 46. Valores de g para $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	103

Tabela 47. Valores de g para $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	103
Tabela 48. Valores de g para $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	103
Tabela 49. Valores de g para $3,146 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	103
Tabela 50. Valores de g para $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AN	Agar Nutritivo
ATP	Trifosfato de adenosina
ABC	ATP-binding Cassette
C.C	<i>Contagem Celular</i>
CDDP	<i>Cisplatina</i>
CETENE	<i>Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste</i>
DRX	Difratometria de Raios-X
FDA	Food and Drug Administration
DACH	Diaminociclohexano
GSH	Glutathione
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Data</i>
LaBio	Laboratório de Bioprocessos
LaMTESA	Laboratório de Medicamentos, Tecnologias, Energias e Soluções Ambientais
MDR	<i>MultiDrug Resistance</i>
MRPs	<i>Multi-Drug Resistance Associated Protein</i>
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
OMP	Oxalipatina
SDL	Meio de Cultura Sabouraud Líquido
UV-VIS	Ultravioleta-visível
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos.....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1 Câncer.....	22
3.2 Cisplatina.....	24
3.3 Oxaliplatina.....	28
3.4 <i>Multi-Drug Resistance (MDR)</i>	30
3.5 <i>Zymomonas mobilis (Z. mobilis)</i>	33
3.6 Curva de crescimento Microbiano.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Soluções e reagentes.....	38
4.2 Equipamentos e acessórios.....	38
4.3 Recuperação dos resíduos de platina e síntese dos complexos: Hexacloro e Tetracloroplatinato de Potássio.....	39
4.4 Síntese da cisplatina – <i>cis</i> -[Pt(Cl) ₂ (NH ₃) ₂]	40
4.5 Síntese da oxaliplatina - <i>cis</i> -[Pt(oxp)(dach)].....	41
4.6 Preparo das soluções de cisplatina e oxaliplatina.....	41
4.7 Procedimento para inocular a <i>Zymomonas mobilis</i>	42
4.8 Curva de crescimento de microrganismo.....	42
4.9 Análise do crescimento do microrganismo através da geração de várias curvas de crescimento.....	43
4.10 Estudo de Concentração do Antimitótico.....	43
4.11 Estudo do número de mol de antimitótico.....	44
4.12 Testes utilizando <i>Z. mobilis</i> e antimitóticos.....	44
4.13 Método de coloração de GRAM.....	45

4.14 Método para medida do comprimento bacteriano.....	45
4.15 Estudo do valor da velocidade específica de crescimento (μ)	46
4.16 Estudo do valor da Taxa Evolutiva (W)	46
4.17 Estudo do Tempo de Geração (g).....	46
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Síntese dos complexos: Hexacloroplatinato e Tetracloroplatinato de Potássio.....	47
5.2 Síntese Cisplatina - <i>cis</i> -[Pt(Cl) ₂ (NH ₃) ₂]	49
5.3 Síntese da oxaliplatina - <i>cis</i> -[Pt(ox)(dach)].....	50
5.4 Curva de crescimento da <i>Z. mobilis</i>	52
5.5 Análise de Comportamento Microbiano sem Adição de Antimitótico.....	53
5.6 Ensaio para Estabelecer a Concentração estoque de Antimitótico Ideal.....	58
5.7 Ensaio para Estabelecer o número de mol de Antimitótico.....	59
5.8 Análise de Comportamento Microbiano com Adição de Antimitótico.....	61
5.9 Análise de Comportamento Microbiano para teste utilizando o Antimitótico CDDP.....	64
5.10 Análise de Comportamento Microbiano para teste utilizando o Antimitótico Oxaliplatina.....	70
5.11 Estudo do comprimento das bactérias.....	77
5.12 Estudo do valor da velocidade específica de crescimento (μ).....	87
5.13 Estudo do valor da Taxa Evolutiva (W).....	94
5.14 Estudo do Tempo de Geração (g).....	99
6. CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
APÊNDICE A – TABELA DE MÉDIA DE COMPRIMENTO MICROBIANO PARA O SEGUNDO CONTROLE UTILIZADO E SUAS IMAGENS.....	115

APÊNDICE B – TABELAS REFERENTES ÀS CONTAGENS MICROBIANAS DOS TESTES COM ADIÇÃO DOS ANTIMITÓTICOS AO SISTEMA.....	116
APÊNDICE C – TABELAS DE CONTINUAÇÃO DOS TESTES COM ANTIMITÓTICO – COMPROVAÇÃO DE NÃO INVERSÃO DE POPULAÇÃO APÓS ADQUIRIDOS TEMPOS DE RESISTÊNCIA.....	141
APÊNDICE D – TABELA DO SEGUNDO CONTROLE DOS TESTES COM ANTIMITÓTICO – REFERÊNCIA PARA OS TESTES COM 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 E $1,8 \times 10^{-7}$ mol DE CDDP E 0,5; 1,0; 1,3; 2,0; 2,5; 3,146 E $4,405 \times 10^{-7}$ mol DE OXALIPLATINA.....	163
APÊNDICE E – IMAGENS DA BACTÉRIA <i>Z. MOBILIS</i> SOB AÇÃO DO ANTIMITÓTICO - CDDP.....	166
APÊNDICE F – IMAGENS DA BACTÉRIA <i>Z. MOBILIS</i> SOB AÇÃO DO ANTIMITÓTICO – OXP.....	167
APÊNDICE G – VALORES E GRÁFICOS DA TAXA EVOLUTIVA.....	168
APÊNDICE H – PATENTE DEPOSITADA.....	174

1. INTRODUÇÃO

Na literatura são descritos alguns fatores limitantes para a utilização clínica da Cisplatina (CDDP) – *cis*-[Pt(Cl)₂(NH₃)₂] e de seus análogos, como a resistência às múltiplas drogas e severos efeitos colaterais associados ao seu uso. Os fármacos baseados em platina são utilizados em tratamentos do câncer de pulmão, colorretal, testículo, entre outros. Apesar da grande janela de atuação desses fármacos, a presença da resistência tanto intrínseca como adquirida pode ser observada em tumores tratados por esses medicamentos (JUNG; LIPPARD, 2007). Além das dificuldades enfrentadas pelo sistema celular (biológico) em se manter vivo e funcional, frente aos compostos citotóxicos utilizados para o tratamento do câncer; também se destacam as problemáticas enfrentadas pelos portadores da doença no insucesso dos tratamentos.

O crescimento desordenado de uma célula tumoral pode ser impedido quando esta é exposta a um agente quimioterápico, como por exemplo, a Cisplatina – *cis*-diclorodiaminoplatina(II); e a Oxaliplatina (OXP) - [oxalato(1*R*,2*R*-diaminociclohexano)platina(II)] - *cis*-[Pt(ox)(dach)]. Na literatura já é bem elucidado o mecanismo de ação dessa classe de fármacos, onde atuam na promoção da inibição do processo de divisão celular (DI FRANCESCO *et al*, 2002). Diante dessas informações, surgem pesquisas com o objetivo de produzir compostos que tenham atividade antitumoral e efeitos colaterais reduzidos; e que principalmente não provoquem a resistência celular. Em 2013, Warad e colaboradores, relataram alguns estudos publicados no âmbito da química inorgânica nessa busca por melhores respostas. Arelado a essas investigações por novos medicamentos, também encontram-se diversas publicações sobre os motivos causadores da resistência celular.

Em 2011 pesquisadores de Taiwan publicaram uma revisão acerca das proteínas transportadoras-ABC e sua ligação com os Fenômenos de Resistência à Múltiplas drogas, encontrados em cânceres metastáticos e em tumores sólidos (CHUNG-PU *et al.*, 2011).

O termo conhecido como resistência às múltiplas drogas, do inglês *Multi-Drug Resistance* – MDR; consiste na habilidade desenvolvida, por algumas células, de resistirem aos tratamentos baseados em uma combinação de

fármacos não relacionados estruturalmente, e sem quaisquer semelhanças em seus mecanismos de atuação (BOLHUIS, *et al.*, 1997; BAGULEY; MARSHALL, 2008; MEADS; HAZLEHUR; DALTON, 2008; HULS; RUSSEL; MASEREEUW, 2009; TURCO, *et al.*, 2004). O MDR constitui atualmente uma barreira para muitos tratamentos oncológicos e ocorre, geralmente, após o paciente iniciar o tratamento com o fármaco.

Diante dessas informações, acerca do impedimento de divisão celular e do fenômeno de MDR provocado pelo uso de medicamentos utilizados na terapia do câncer, este trabalho propõe estudar esse fenômeno, através do uso de cisplatina e oxaliplatina, partindo da análise da curva de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*. Para este estudo foi feita a análise turbidimétrica, o método de contagem celular direta (pelo uso da câmera de Neubauer) e o emprego de um artifício matemático.

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Geral

Desenvolver um método de avaliação cronológica para avaliar resistência adquirida frente a quimioterápicos (antimitóticos) platínicos, através da análise da curva de crescimento microbiano da bactéria *Zymomonas mobilis* em várias gerações.

2.2 Específicos

- Observar o perfil de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*, através do método turbidimétrico e da análise de sua morfologia;
- Sintetizar e caracterizar os complexos *cis*-[Pt(Cl)₂(NH₃)₂] e [Pt(ox)(DACH)], através do tratamento de resíduos de Platina;
- Analisar a mudança no comportamento da bactéria *Zymomonas mobilis* quando exposta aos antimitóticos – CDDP e OXP;
- Verificar o tempo em que a bactéria adquire resistência frente à droga;
- Apresentar um modelo matemático que demonstre a ocorrência de resistência adquirida;
- Desenvolver um método que avalie a resistência adquirida pela presença de fármacos antineoplásicos, que apresente fácil execução e análise.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

No ano de 2018, apenas no Brasil, houve a ocorrência de cerca de 68.220 mil novos casos de câncer de próstata e 59.700 mil para câncer de mama, os quais são os mais frequentes em homens e mulheres (INCA, 2017). O índice de mortalidade da doença é alto, atualmente, 7,6 milhões de pessoas morrem por ano de câncer em todo o mundo, estima-se que para 2025 esses dados fiquem na faixa de 6 milhões de casos de morte prematuras, estudos mostram que muitas dessas mortes poderiam ser evitadas com tratamentos adequados (INCA, 2020).

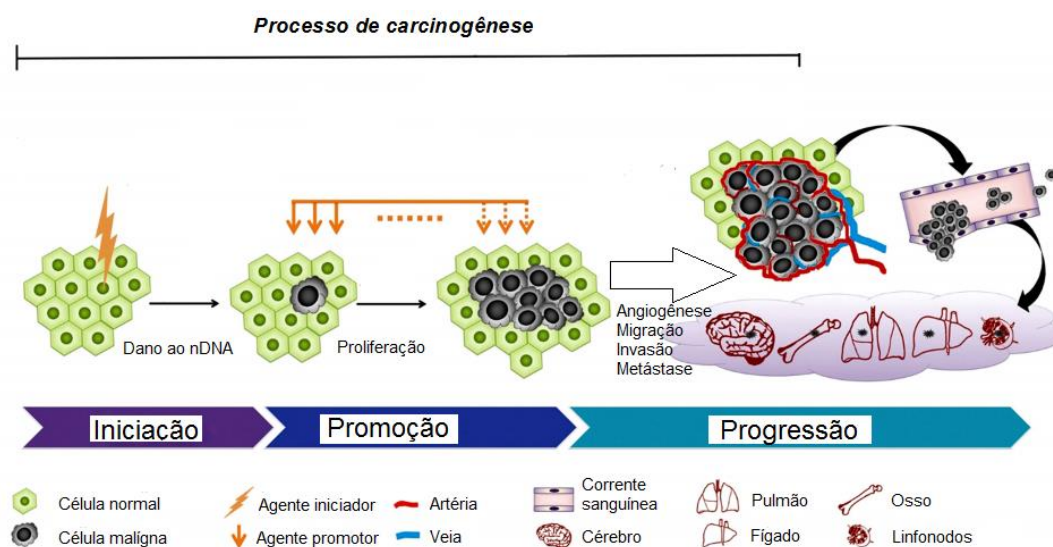
De acordo com a Organização mundial de saúde (*World Health Organization*- WHO), o câncer é uma denominação dada para doenças que tem as características de apresentarem um crescimento desordenado das células, e que podem se propagar por tecidos e órgãos resultando no que se denomina metástase.

O câncer também pode ser definido como uma doença genética que é resultante do somatório de mutações celulares, que dessa sairá uma nova mutação, essa sequência de crescimento vai provocar o surgimento de tumores benignos, os quais continuarão se multiplicando até o ponto de adquirir malignidade (VOGELSTEIN; KINZLER,1993)

Os mecanismos de formação dos tumores ou carcinogênese acontece em sua maioria por fatores externos, como agentes químicos, radiação, hormônios, fatores da dieta, agentes infecciosos e estresse oxidativo (FRAUMENI, 2001); e fatores genéticos, como a hereditariedade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Os vários processos da carcinogênese (Figura 1) podem ser explicados segundo um modelo dividido em três estágios: (i) Iniciação, (ii) Promoção e (iii) Progressão. A iniciação consiste em uma interação irreversível, característica por provocar um dano ao DNA nuclear (nDNA) ocasionado por agentes carcinogênicos, ficando as células geneticamente alteradas para sofrer novas mutações. A promoção é reversível, consiste em uma expansão clonal de células iniciadas, pela exposição continuada aos agentes carcinogênicos, as quais lideram a produção de uma lesão precursora e tumores benignos. No caso da progressão, os tumores benignos são

convertidos em malignos, ocorrendo como decorrência disso um acúmulo de alterações genéticas múltiplas, onde através de um crescimento desordenados conduzem células normais a células malignas, aqui temos uma instabilidade genética, um crescimento invasivo que provoca alterações bioquímicas e morfológicas, resultando na metástase, quando se chega a esse estágio a progressão é irreversível (YUSPA; POIRIER, 1988; YUSPA, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2000; MURAD; KATZ, 1996; LIU et al., 2015).

Figura 1. Processo de Carcinogênese



Fonte: Adaptado de Liu (LIU et al., 2015).

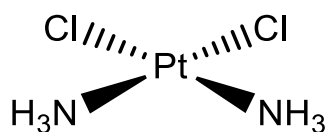
Quando um paciente é diagnosticado com câncer se inicia o processo de tratamento, que ocorre geralmente através da cirurgia, radioterapia e quimioterapia; podendo ser utilizados separados ou conjuntamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A quimioterapia é o tratamento feito através do uso de medicamentos, dependendo do nível de gravidade da doença, do tipo de tumor, do seu tamanho ou até mesmo da sua disseminação através do corpo. O uso da quimioterapia pode ocasionar atraso, impedimento de processos proliferativos ou até mesmo a cura (SUGERMAN, 2013). Os quimioterápicos antineoplásicos atuam geralmente em processos de divisão celular (mitose), interferindo no ciclo celular, levando a interromper e alterar o seu processo de proliferação, podendo levar a apoptose (DICKENS; AHMED, 2018).

Dentre os quimioterápicos antineoplásicos comercializados, merecem destaque os baseados em platina, pelo fato de que, desde a aprovação do primeiro fármaco constituído por esse metal, a *cis*-diclorodiaminoplatina(II), conhecida como cisplatina (CDDP), aprovada como finalidade antitumoral em 1978 pela *Food and Drug Administration* (FDA), que o seu uso e de seus análogos, são vastamente empregados no tratamento do câncer, destacando-se aqui o fármaco [(*cis*- Pt(oxalato)(1R,2Rdiaminocicloexano)₂)], conhecido como Oxaliplatina (OXP), que assim como a CDDP é vastamente empregado no tratamento do câncer (ALVES, et al., 2010). Os dois medicamentos são objetos de estudo nesta tese.

3.2 Cisplatina

O primeiro químico a sintetizar a CDDP (**Figura 2**) foi o italiano Michele Peyrone, em 1845. Peyrone descreveu um composto que afirmou ser um exemplo de isomerismo, e por conta desse fato, em homenagem ao químico, o primeiro nome dado a CDDP foi cloreto de Peyrone (KAUFFMAN *et al.*, 2010). Mais tarde em 1913, foi dado ao químico Alfred Werner o Prêmio Nobel de Química, alcançado pelos estudos acerca dos compostos de coordenação, onde propôs a geometria quadrática plana da CDDP e distinguiu as suas formas *cis* e *trans* (ALDERDEN, et al., 2006).

Figura 2. Estrutura da Cisplatina.

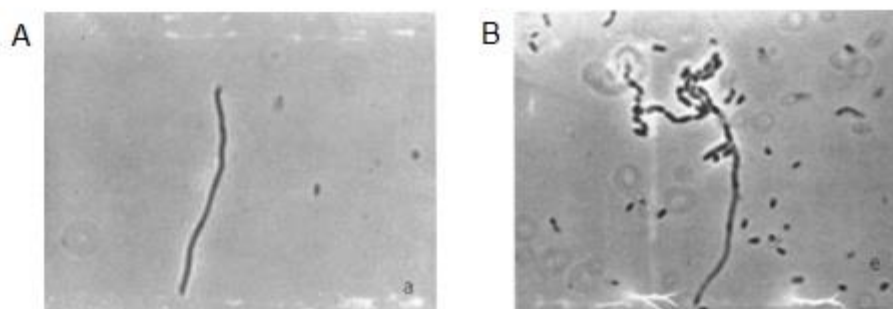


Fonte: Própria autora.

Um marco para a comunidade científica foi quando o professor Rosenberg e colaboradores da Universidade de Michigan – EUA, em 1965, publicaram estudos realizados acerca dos efeitos causados por um campo elétrico aplicado a um meio de cultura contendo bactérias do tipo *Escherichia coli*. Para a realização desses experimentos, foi utilizado um eletrodo de platina e a análise do crescimento dessas bactérias foi feita através da medição da turbidez do meio. Após isso, foi verificado que ao aplicar o campo elétrico

essas bactérias formavam filamentos cerca de 300 vezes maiores (**Figura 3**) que seu tamanho original bem como, constataram que a divisão celular dessas bactérias era inibida. Ao estudar o que causava essa mudança de comportamento na morfologia dessas bactérias, chegou-se à conclusão que era por conta da formação de alguns compostos de platina que eram produzidos durante a aplicação do campo elétrico, mais precisamente o resultado da reação entre platina com íons cloreto e amônia. Os resultados dos experimentos comprovaram que o composto *cis*-[Pt(Cl)₂(NH₃)₂], a cisplatina, era o maior responsável por esse impedimento de divisão e pela formação da espécie filamentosa (ROSENBERG, *et al.*, 1965; ROSENBERG, *et al.*, 1967).

Figura 3. Fotografia de uma lâmina contendo *Escherichia coli* em meio nutritivo, retirada de teste que teve duração de 3 horas em contato com 13 g mL⁻¹ de Platina: a) assim que foi retirada do teste; b) após 225 min da sua retirada do teste.



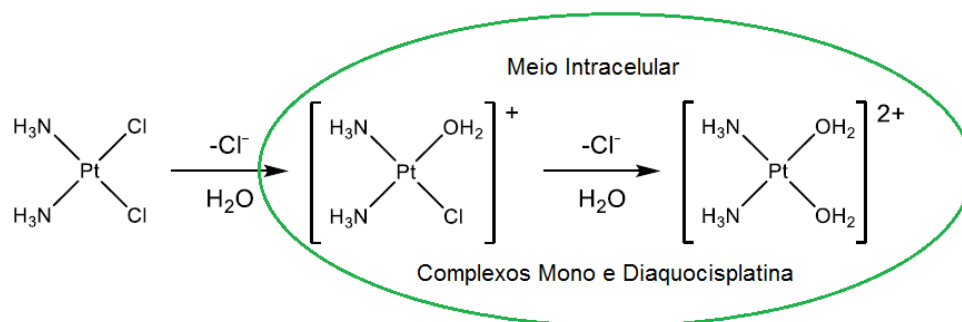
Fonte: ROSENBERG *et al.*, 1967.

Com essa descoberta, em 1970, Rosenberg e Camp, realizaram testes *in vivo*, onde comprovaram que a CDDP ocasionou uma regressão do tumor sólido, sarcoma 180, de 63 a 100%. Desde então, foram iniciadas novas pesquisas, agora em relação à atividade antitumoral dos compostos contendo platina em sua estrutura e drogas análogas à CDDP foram criadas.

A cisplatina é um composto adicionado ao protocolo de tratamento do câncer de pescoço, bexiga, linfoma, pulmão, entre outros, mas, sua melhor resposta e maior eficiência são observadas para os tratamentos voltados para câncer de ovário e testículo (NATILE; COLUCCIA, 2001; KELLAND, 2007).

O mecanismo de entrada da CDDP na célula é atribuído a difusão passiva, proteínas transportadoras de cobre e proteínas transportadoras de cátions orgânicos, sendo as últimas atuando juntas ou não (KELLAND, 2007). Ao chegar à corrente sanguínea, que possui uma alta concentração de íons cloretos (100 mmol L^{-1}), a cisplatina permanece estável. Após entrar no meio intracelular a concentração de cloretos é reduzida (4 mmol L^{-1}), o que provoca reações de substituição dos cloretos existentes no complexo por moléculas de água; formando um complexo ativo ou lábil (mono e/ou diaquocisplatina) que se liga ao nDNA (**Figura 4**) (JUNG; LIPPARD, 2007).

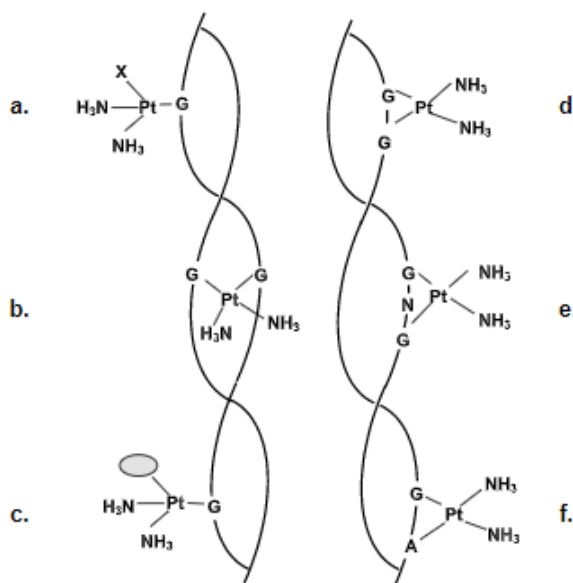
Figura 4. Reações de formação dos complexos ativos no meio celular.



Fonte: Própria autora.

Estudos afirmam que o mecanismo de ação da CDDP se dá através da ligação coordenativa do íon metálico com as bases nitrogenadas do nDNA, tendo preferência pela adenina e guanina, por possuírem centros mais básicos (bases púricas) e menos impedidos, sendo a posição N7 da guanina a de maior ocorrência. Essas interações com o nDNA pode se dá por uma única ligação chamada de monofuncional, ou cada centro platínico pode ligar-se a regiões diferentes do nDNA, sendo bifuncional. As interações bifuncionais podem ser classificadas em interfitas, quando as ligações de platina estão interagindo com diferentes fitas do nDNA; intrafitas, quando se ligam a mesma fita; e intermolecular, quando uma ligação interage com o nDNA e a outra com uma biomolécula presente no meio. O complexo formado com o nDNA vai promover uma torção dessa molécula, impedimento a sua duplicação e da transcrição, resultando na apoptose celular (JUNG; LIPPARD, 2007; JAMIESON; LIPPARD, 1999) (**Figura 5**).

Figura 5. Tipos de coordenação da CDDP ao nDNA: (a) Monofuncional (X= Cl⁻ ou H₂O); (b) Interfita; (c) Intermolecular; (d), (e) e (f) Intrafita.



Fonte: CRUL *et al.*, 2002.

Embora a cisplatina tenha uma boa eficácia antitumoral e seja administrada até os dias atuais em pacientes com câncer, o seu uso gera várias consequências aos pacientes, desde respostas provocadas pela presença de efeitos colaterais como, náuseas, vômitos, problemas gastrointestinais, ototoxicidade, a nefrotoxicidade (que é vista como um dos efeitos mais agressivos), a outro agravante que é a resistência celular, tanto a intrínseca (verificada, por exemplo, em tumores colo retais), como a resistência adquirida por alguns tumores durante o tratamento, como no caso do câncer de ovário (PANG, *et al.*, 2007; KELLAND, 2007).

Na busca de minimizar os efeitos causados pelo uso da cisplatina, iniciaram-se pesquisas para a obtenção de novos complexos baseados em platina, com o intuito de terem uma melhor atividade antitumoral, menos efeitos colaterais e não desencadeiem resistência.

Dentre os análogos a CDDP que foram produzidos, apenas dois foram aprovados internacionalmente para uso clínico, que foi a carboplatina e a oxaliplatina. Apesar dos medicamentos terem gerado uma diminuição dos efeitos colaterais produzidos, os mesmos carregam também, o fenômeno de

resistência celular. No caso da carboplatina, este fármaco apresenta resistência cruzada com a CDDP, ou seja, as células tumorais que foram resistentes a cisplatina responderam da mesma forma quando tratadas pela carboplatina (PASETTO *et al.*, 2006).

3.3 Oxaliplatina

Vários estudos foram relatados até a aprovação da Oxaliplatina, em 1978. Os pesquisadores Kidani e Inagaki fizeram um ensaio para ver a ação antitumoral em Sarcoma 180 de complexos que possuíam como ligante transportador o diaminociclohexano (DACH), ao final, relataram que a melhor resposta, atividade antitumoral, entre os complexos testados foi quando em sua estrutura tinha os ligantes o DACH e o grupo de saída oxalato.

Já em 1993, Siddik e colaboradores resolveram fazer uma pesquisa sobre a influência provocada na atividade antitumoral de células que já haviam apresentado resistência a CDDP. Nesse estudo, o intuito era verificar se ocorria mudança na atividade antitumoral dos compostos quando se utilizava os diferentes tipos de isômero DACH em complexos de Platina, chegando à conclusão que o tipo de isômero provocava uma resposta antitumoral diferente, e que dependendo do tipo do grupo de saída utilizado e até mesmo do tipo de tumor, essas respostas também sofriam influência. Os estudos por eles realizados, mostraram que o ligante isômero *trans*-1*R*,2*R*-DACH apresentavam uma melhor resposta antitumoral frente a tumores resistentes à CDDP.

Em 1995, quando a oxaliplatina já estava passando por ensaios clínicos na Europa, foram realizados testes usando os diferentes isômeros do ligante DACH, para verificar a ação antitumoral em carcinoma de ovário humano resistentes a CDDP e mais uma vez, foi comprovado que uso do ligante 1*R*,2*R*-DACH proporcionava uma citotoxicidade mais elevada que os demais.

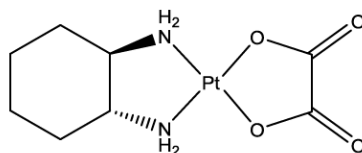
A OXP (**Figura 6**), é um análogo da Cisplatina, que em sua estrutura tem os íons cloretos, vistos na CDDP, substituídos pelo ligante bidentado íon oxalato, que proporciona um efeito quelato ao complexo, já as amônias são substituídas pelo ligante orgânico de (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diaminociclohexano, essa mudança na estrutura gerou um composto com menor toxicidade e uma solubilidade em água cerca de 8 vezes maior em relação à CDDP (DI

FRANCESCO et al, 2002), foi o primeiro medicamento aprovado capaz de superar a resistência da Cisplatina, a OXP teve sua primeira aprovação como fármaco em 1996 na França, seguida dos EUA em 2002 e Japão em 2005 (WHEATE *et al.*, 2010).

A Oxaliplatina apresentou uma melhor resposta na ação contra tumores de câncer colorretal em comparação aos quimioterápicos Carboplatina e Cisplatina. Atualmente a OXP é utilizada para o tratamento de câncer colorretal metastático em conjunto com o 5-Fluorouracil (BOULIKAS, *et al.*, 2007).

Estudos mostram que o mecanismo de ação da OXP tem como princípio a mesma finalidade da CDDP, que é o de se coordenar as bases nitrogenadas do nDNA, provocando o impedimento da replicação desse nDNA, inibindo a formação do ciclo celular, resultando na apoptose celular. Para que isso ocorra o fármaco tem seu ligante Oxalato substituído por moléculas de água, resultando na espécie ativa diaquo que vai interagir com o nDNA (DI FRANCESCO *et al.*, 2002).

Figura 6. Estrutura da Oxaliplatina.



Fonte: Própria autora.

Apesar da descoberta da OXP, que mostrou atividade antitumoral em células resistentes a Cisplatina e Carboplatina, também foram relatadas resistências celulares durante seu uso. Além das muitas limitações provocadas pelos efeitos adversos do uso de medicamentos a base de Platina, o maior problema relatado pelo uso desses fármacos é a ocorrência do fenômeno de resistência a múltiplas drogas, que ocasiona na ineficiência do tratamento, provocando a morte de diversos pacientes.

3.4 Multi-Drug Resistance (MDR)

O insucesso de muitos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer se dá por diversos fatores, como os efeitos colaterais provocados pela ingestão dos medicamentos, e o fenômeno de resistência às múltiplas drogas. O MDR é um fenômeno onde células tumorais passam a resistir aos compostos utilizados, provocando uma incerteza no resultado final da terapia, já que, alguns tumores mostram uma resposta favorável ao tratamento, e outros por sua vez, permanecem de forma estável ou progressiva, sendo vistos como clinicamente resistentes aos medicamentos. O estudo de compostos com diferentes estruturas e mecanismos químicos de ação para se resolver o problema da resistência, já não é o foco principal das pesquisas, isso se dá pelo fato da informação de diversos estudos que mostram que os tumores podem apresentar resistência simultânea a diferentes medicamentos (LAGE, 2008).

Pesquisas apontam que o maior índice de falhas nas realizações de tratamentos quimioterápicos em pacientes com câncer metastático, se dá pela resistência aos agentes químicos (COLEY, 2009). A resistência a quimioterápicos pode ocorrer de forma intrínseca, ocasionada por alterações genéticas que já existem antes do início do tratamento; e pela forma adquirida, quando as células neoplásicas não respondem mais a ação do medicamento. Em ambos os casos existe a ocorrência de alterações epigenéticas e no genoma de células cancerígenas (REBUCCI; MICHIELS, 2013).

A consequência provocada pela resistência resultante da ausência de respostas frente ao uso continuado de uma ou mais drogas, que não apresentem características estruturais e funcionais relacionadas, é chamada de fenômeno de Resistência às Múltiplas Drogas [do Inglês Multi-Drug Resistance (MDR)] (CHUNG-PU, *et al.*, 2011).

Em 2016, Marin e colaboradores relataram a problemática existente nos regimes farmacológicos para o tratamento da Leucemia Mielóide Aguda (LMA). A quimioresistência é um fator frequente em pacientes portadores da doença, que pode existir ou ser adquirida após o início do tratamento. As proteínas pertencentes à superfamília dos transportadores SCL [do Inglês *solute carrier* (SLC)] são reportadas por serem determinantes na eficiência ou não do

tratamento, pois participam do transporte dos agentes antitumorais até seus alvos no meio intracelular. Quando ocorre uma menor expressão dessas proteínas, o resultado é uma menor absorção dos medicamentos por parte das células tumorais, provocando uma resistência ao medicamento. Outras proteínas responsáveis pelo efluxo das drogas, as proteínas transportadoras-ABC [do Inglês *ATP-binding Cassette* (ABC)], também estão envolvidas no processo de quimioresistência de células tumorais em pacientes portadores de leucemia, isso se dá pelo aumento de sua ação. O trabalho também comenta as enzimas metabolizadoras de medicamentos, as quais tanto atuam ativando as drogas que precisam ser biotransformadas, gerando uma resposta positiva, como também podem deixar inativos determinados medicamentos, resultando na falha do tratamento.

A já mencionada família das proteínas transportadoras-ABC possui muitos relatos na literatura, pois possuem uma função reguladora no organismo, promovendo o transporte através dos meios intra e extracelular de diversos substratos, que incluem hormônios, lipídios e drogas (SCOTTO, 2003). Dentro dessa família o primeiro transportador ABC que foi identificado como causador da MDR foi a P-glicoproteína, que foi descoberta em 1976 pelos pesquisadores Juliano e Ling. Eles investigavam o motivo pelo qual células tumorais do ovário de hamsters chineses estavam sendo resistentes a medicamentos, e relataram que essas células apresentavam um composto de alto peso molecular, a P-glicoproteína, e correlacionaram o surgimento da resistência a proteína. Em 1993, Gottesman e Pastan apresentaram os estudos acerca da P-glicoproteína codificada em humanos através do gene MDR1. Essa proteína funciona como uma bomba de efluxo provocando o aumento da retirada do fármaco, consequentemente resulta na diminuição da concentração intracelular do mesmo. Esse efeito foi verificado nas células tumorais que foram expostas aos quimioterápicos paclitaxel, doxorrubicina e vimblastina.

Grande parte dos agentes quimioterápicos se dissolve na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática e o problema se dá quando a P-glicoproteína age retirando esses medicamentos do meio intracelular. Os agentes quimioterápicos hidrofóbicos, atravessam a membrana citoplasmática através de difusão e a forma de obtenção de resistência como mecanismo de resposta do organismo é através da ativação de transportadores dependentes

de energia, sendo a P-glicoproteína a principal responsável por promover a retirada dos compostos do meio intra para o meio extracelular. Outra forma de provocar a resistência ao medicamento é através de mutações provocadas em transportadores que servem para carregar compostos hidrofílicos que não conseguem cruzar a membrana citoplasmática sozinhos, ficando assim, impedidos de entrar na célula (AMBUDKAR *et al.*, 2003).

Outro membro da família das proteínas transportadoras-ABC são os MRPs (do inglês *Multi-Drug Resistance Associated Protein*), abordados em 1992 por Cole e colaboradores, essas proteínas atuam como bomba de efluxo de agentes quimioterápicos. Os autores relataram que a resistência adquirida por células carcinogênicas de pulmão frente ao medicamento doxorrubicina, eram provocadas pela atuação dessas proteínas provocando o efluxo do medicamento.

As descobertas dos MRPs estimularam as pesquisas do genoma humano, que chegaram à descoberta de um total de nove membros pertencentes a essa família que variam de MRP1 até MRP9, a maioria dessas proteínas promovem um transporte padrão dos medicamentos, sendo assim, são responsáveis por conferir resistência ao mesmo. O MRP1, por exemplo, é visto pela oncologia clínica como um grande influenciador da resistência a múltiplos fármacos, a sua maior ocorrência está relacionado ao insucesso do tratamento do câncer de neuroblastoma (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; COLE, 2014).

A MRP1, como também a MRP2, está associada ao transporte para o meio extracelular do complexo formado pela Glutathione (GSH) e fármacos com platina. Aqui temos um caso de resistência provocada pela inativação da droga. O que ocorre, é que a GSH é responsável por promover uma desintoxicação de agentes no organismo, para realizar esse trabalho se liga, por exemplo, a CDDP (FUERTES; ALONSO; PÉREZ, 2003).

Permeando ainda entra as MRPs, temos a MRP4 e MRP5 que funcionam como bombas de efluxo para tiopurina e metotrexato, o MRP6 ligado a resistência frente aos antineoplásicos etoposida, teniposide, doxorrubicina e daunorrubicina, temos também o efluxo provocado no medicamento 5-fluorouracil pela ação da MRP8 (SCOTTO, 2003).

Para compostos que contêm em sua estrutura platina, estudos realizados mostraram a ligação existente entre transportadores de cobre, ATP7A e ATP7B, e esses compostos, mostrando que esses transportadores participam modulando o nível dos fármacos nas células, com isso, é provocado um controle da sensibilidade aos quimioterápicos, exercendo a absorção e o efluxo dessas drogas do meio intracelular (JUNG; LIPPARD, 2007).

Em 2006, Helleman e colaboradores avaliaram novos mecanismos de resistência provocados pela utilização de análogos a CDDP, em linhagens celulares de câncer de ovário resistentes e verificaram a ocorrência de resistência cruzada com a oxaliplatina, carboplatina e tetraplatina. Ainda não é bem elucidado os fatores que levam ao surgimento da resistência, os autores atribuíram que a resistência cruzada entre os fármacos poderiam ser devido a problemas no mecanismo de influxo de complexos de platina específicos para a configuração *Cis*, chegando à conclusão que o fenômeno de resistência aqui observado era devido ao uso de compostos nesta configuração.

Esses fenômenos são parte de uma grande variedade de mecanismos que provocam a resistência de um tumor frente à ação de um fármaco, onde cada organismo pode reagir de uma forma diferente para cada antineoplásico, sendo essa uma das explicações do porque que alguns pacientes têm um grande sucesso com um quimioterápico enquanto outro que faz uso da mesma droga não responde aos seus estímulos.

3.5 *Zymomonas mobilis*

Em 1911, Barker e Hillier partindo do estudo sobre a “doença da sidra”, foram os primeiros a explorar a bactéria que provocava mudança no aroma e sabor da bebida, contudo, sua descoberta só foi reconhecida em 1924, quando Lindner no México, isolou o micro-organismo partindo da seiva fermentada da Agave. Foi verificado que essa bactéria era a responsável pela fermentação, desde então, muitos estudos foram relatados acerca do isolamento das culturas de *Z. mobilis*. Além dos achados citados, a *Z. mobilis* pode ser encontrada em vinhos de palma, como contaminante em cervejas, na fermentação do caldo de cana, no amadurecimento do mel, entre outros, esses

são fatos abordados por Swings e De Ley, 1977, quando publicaram um extenso estudo sobre a biologia da *Z. mobilis*.

A bactéria se apresenta na forma de bastonete, podendo sua célula se apresentar aos pares ou isoladamente, possuem 2 a 6 μm de comprimento; e 1 a 1,4 μm de diâmetro, não apresentam esporos, quando móveis possuem 1 a 4 flagelos, é anaeróbia, porém, tolera oxigênio se tornando facultativa, Gram-negativa e não patogênica, suas colônias tem como característica coloração branca ou creme, crescem na faixa de 30 °C, sua reprodução é por divisão binária simples (SWINGS & DE LEY, 1977; FALCÃO DE MORAIS, 1982).

A *Z. mobilis* ganha destaque em estudos sobre sua capacidade de fermentação alcoólica, é um micro-organismo quimiorganotrófico, possui um crescimento simples, apenas em meio contendo glicose e extrato de levedura se reproduz, possui uma maior absorção de açúcar e rendimento de etanol, não necessita da presença de oxigênio e desenvolve uma menor produção de biomassa (GOODMAN, *et al.*, 1982; SAHM, *et al.*, 2006). As qualidades e facilidades de desenvolvimento dessa bactéria fazem da *Z. mobilis* um microrganismo promissor em estudos científicos.

3.6 Curva de crescimento Microbiano

Em uma análise de crescimento microbiano verifica-se o aumento populacional das bactérias. Aqui o crescimento está ligado à reprodução, o tempo necessário para que as bactérias cresçam é diferente para cada espécie, e é dependente de diversos fatores, como por exemplo, pH, tipos de nutrientes utilizados para o seu crescimento, bem como a quantidade fornecida desses, a adição ou até mesmo produção de compostos tóxicos, temperatura, entre outros. Mas todos os micro-organismos vão gerar fases de crescimento, essas fases são constituídas de quatro etapas (GUERRA, 2016):

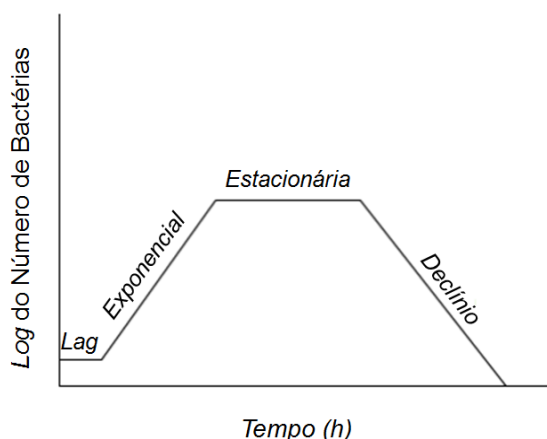
a) Fase Lag, que está relacionada à adaptação da bactéria ao meio em que foi introduzida, aqui a ocorrência de divisão celular não é significativa;

b) Fase Log, também chamada de fase exponencial é o momento em que ocorre uma alta taxa de divisão celular, ocorre um crescimento em progressão geométrica, o tempo de geração do microrganismo vai depender das condições em que está submetido;

c) Fase estacionária, neste momento existe um equilíbrio populacional, a diminuição na quantidade de nutrientes provoca um equilíbrio entre o número de células que se dividem e o número de células que morrem;

d) Fase de Declínio ou Morte, ocorrência na redução da taxa de crescimento, momento em que o número de células que morrem supera o número de células em divisão (MURRAY, *et al.*, 2009; TORTORA, *et al.*, 2000).

Figura 7. Curva de crescimento microbiano e suas fases.



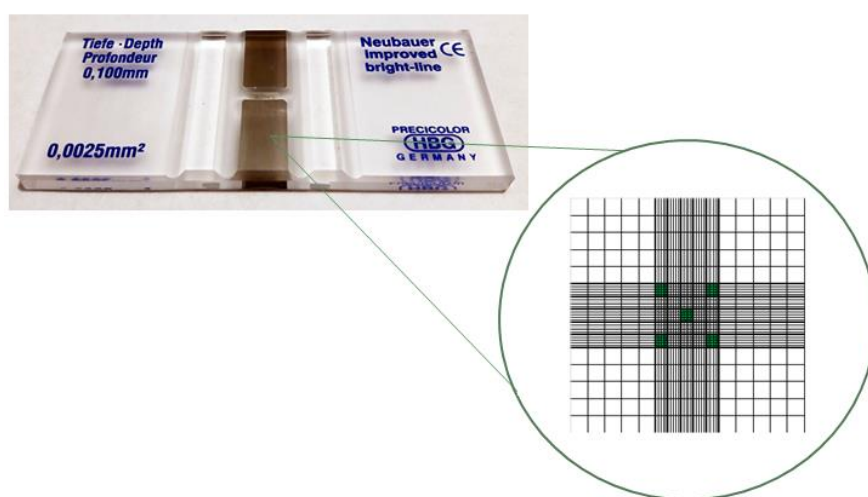
Fonte: Própria autora.

O crescimento de bactérias se dá aqui, através da divisão simples, ou a chamada fissão binária, onde uma célula mãe dará origem a duas células filhas, que darão origem a quatro células filhas e assim por diante, durante a curva do crescimento da bactéria podemos retirar algumas características importantes sobre o micro-organismo estudado, como os valores do Tempo de geração (g), que nos informa o tempo necessário para que aquela população seja duplicada (TORTORA, *et al.*, 2005), e também temos acesso a Velocidade específica de crescimento (μ), esses dados são colhidos na fase exponencial do crescimento, por se tratar de uma etapa em que as bactérias se apresentam com uma divisão celular em intervalos regulares e por se encontrarem mais saudáveis, sendo assim, a Velocidade específica é diretamente proporcional a concentração celular, sendo seu valor nessa fase constante e máximo (MADIGAN, *et al.*, 2016; SCHMIDELL, *et al.*, 2001), mas vale lembrar, que esses valores são influenciados pelas condições impostas ao microrganismo durante seu crescimento.

A obtenção de uma curva de crescimento microbiano é construída através da análise do crescimento populacional das células, esse estudo pode ser feito, por exemplo, através do método de contagem microscópica direta da bactéria, mediante uso de uma câmara de área definida (**Figura 8**), sendo obtidas respostas em Contagem de Células totais/mL (C.C totais/mL), esse método oferece a vantagem de poder ser realizado em tempo real, desta forma uma curva de crescimento é formada entre C.C totais/mL x tempo (GUERRA, 2016; TORTORA, *et al.*, 2005).

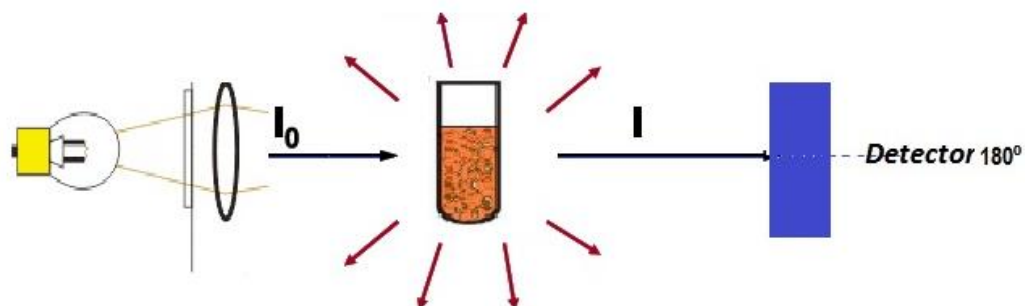
Outra forma de obtenção da curva é por meio da análise turbidimétrica (**Figura 9**), por intermédio de um instrumento que meça a turbidez, a técnica se resume a uma radiação incidente na amostra onde, quanto maior o número de partículas existentes no meio maior a dispersão dessa radiação, portanto, menor a intensidade de radiação transmitida. A radiação transmitida que chega ao detector é a resposta turbidimétrica, que será inversamente proporcional ao número de partículas em suspensão da amostra (TORTORA, *et al.*, 2005), nesse caso obtemos uma gráfico de Absorbância x tempo.

Figura 8. Câmara de Neubauer, utilizada em contagens microbianas.



Fonte: Própria autora.

Figura 9. Esquema resumido de Turbidimetria, onde: I_0 = Intensidade da radiação incidente; e I = Intensidade da radiação transmitida.



Fonte: Adaptado de Lima Júnior; Abreu, 2018.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções e reagentes

Para o cultivo do microrganismo foi utilizado meio SDL, cuja composição consiste em:

- 2% (m/v) de Glicose;
- 0,5% (m/v) de Extrato de levedura em meio aquoso.

Tendo em vista que o microrganismo utilizado, como modelo biológico, não cresce em meio ágar nutritivo (AN), este último foi utilizado como verificação de contaminação, cuja composição consiste em:

- 0,3 % (m/v) de extrato de carne;
- 0,5 % (m/v) de peptona de carne;
- 1,5% (m/v) de ágar; em meio aquoso.

Para os agentes atimitóticos à base de platina foram preparadas as seguintes soluções aquosas (água destilada estéril):

- cisplatina, cujas concentrações foram de 1,67; 3,33 e 6,67 mmol L⁻¹;
- oxaliplatina, cujas concentrações foram de 2,517; 6,292 e 13,384 mmol L⁻¹.

4.2 Equipamentos e acessórios

Visando obter as curvas de crescimento microbiano (contagem de células *versus* tempo) da bactéria utilizada como modelo biológico, utilizou-se espectrofotômetro UV-VIS, com comprimento de onda fixado em 660 nm, da Biospectro modelo SP-220, aliado à contagem celular em câmara de Neubauer, cuja leitura se fez através do microscópio óptico da marca Leica, ambos os equipamentos encontrados no Laboratório de Bioprocessos (LaBio) instalados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

As fotos dos microrganismos foram feitas no microscópio Binocular LED Labomed LX 400, localizado no Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram realizadas as características dos compostos de Platina através da técnica de difratometria de raios-X, com o uso do equipamento Diffract ACT, série 100-Siemens, utilizando a linha de cobre $K\alpha$, com passo de 0,02 e varredura de 10° - 70° .

4.3 Recuperação dos resíduos de platina e síntese dos complexos: Hexacloro e Tetracloroplatinato de Potássio.

Para a obtenção dos agentes antimitóticos (fármacos à base de platina) utilizados no teste biológico, primeiramente foi realizada a recuperação dos resíduos de platina oriundo de pesquisas do Laboratório de Medicamentos, Tecnologias, Energias e Soluções Ambientais – LaMTESA. Essa etapa de recuperação tem como intenção a obtenção dos compostos hexacloroplatinato de potássio - $K_2[Pt(Cl)_6]$, e tetracloroplatinato de potássio - $K_2[Pt(Cl)_4]$, sendo esse último, o ponto de partida para a obtenção dos quimioterápicos desejados.

Os resíduos de platina foram transferidos para um béquer e submetidos a aquecimento, em chapa aquecedora, a uma temperatura de $150^\circ C$, proporcionando a evaporação de toda a água e solventes orgânicos pré-existent. Em seguida, o material sólido obtido é transferido para um cadinho e colocado em mufla, sendo submetido a uma temperatura de $500^\circ C$ durante 5h. O material sólido calcinado foi então transferido para um béquer, cuja conversão à platina metálica se fez através da adição de quantitativo suficiente de dicloridrato de hidrazina ($N_2H_4 \cdot 2HCl$).

A platina metálica obtida foi então lavada com água destilada, cinco vezes até clarificar o sobrenadante, garantindo assim, uma maior remoção dos resíduos solúveis (contaminantes). Após esta etapa de lavagem da platina metálica obtida, ao sistema foi acrescentada uma quantidade suficiente de água régia ($1HNO_3 : 3HCl$) capaz de oxidar e converter todo a Pt^0 a Pt^{4+} . A solução resultante foi submetido à evaporação por aquecimento em chapa aquecedora, propiciando, assim, a remoção de excesso de ácidos. Após atingir quase ponto de secura, adicionou-se cloreto de potássio (KCl) para que ocorra a precipitação do complexo desejado. O sistema foi mantido em geladeira por

24h, para completa precipitação do hexacloroplatinato de potássio. O precipitado é então lavado com etanol e éter gelados, e secado.

Para a obtenção do tetracloroplatinato de potássio procedeu-se a reação de redução controlada da Pt^{+4} para Pt^{+2} . Em um béquer foi solubilizado o $K_2[Pt(Cl)_6]$ e a solução foi submetida a aquecimento, em uma temperatura de 50 – 60 °C. Após 5 min, adicionou-se lentamente a solução do complexo uma solução de $N_2H_4 \cdot 2HCl$, na proporção 1 : 2 (cloridato:complexo). Posteriormente, a reação é mantida em aquecimento até observar a mudança na coloração do meio, saindo de amarela para vermelha. O solvente é então evaporado lentamente à 80 °C, o que provoca o surgimento de cristais na forma de agulha de coloração vermelha (KAUFFMAN; COWAN, 1963). Os cristais obtidos são filtrados a vácuo, lavados com acetona e secados.

Os complexos obtidos foram caracterizados por difratometria de raios-X.

4.4 Síntese da cisplatina – *cis*- $[Pt(Cl)_2(NH_3)_2]$

A síntese da cisplatina foi realizada através de uma adaptação da metodologia proposta por DHARA, 1970. A obtenção da CDDP se dá partindo-se do tetracloroplatinato de potássio. Em um béquer foi feita a solubilização de 150 mg ($3,614 \times 10^{-4}$ mols) de tetracloroplatinato de potássio em aproximadamente 5 mL de água ultrapura mantidos sob agitação a uma temperatura entre 50 – 60 °C. Posteriormente, adicionou-se 240 mg (1,445 mmols) de iodeto de potássio (KI) e o sistema é mantido sob agitação. Após a mudança de coloração, é adicionado 112,29 μL ($7,228 \times 10^{-4}$ mols) de Hidróxido de amônio (NH_4OH) e o sistema é mantido sob agitação por 30 min. No final do tempo o sistema é filtrado e secado sob vácuo.

O complexo obtido é então dissolvido em água, 197 mg ($3,513 \times 10^{-4}$ mols), e adicionado à essa solução 119,4 mg ($7,024 \times 10^{-4}$ mols) de Nitrato de prata ($AgNO_3$). O sistema é mantido em agitação por cerca de 20 min, e então a mistura é filtrada a vácuo e ao sobrenadante são adicionadas 3-5 gotas de uma solução de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} . Após 20 min, adiciona-se à solução 52,4 mg ($7,024 \times 10^{-4}$ mols) de KCl. O sistema é mantido sob aquecimento entre 80 – 90 °C, até a evaporação lenta do solvente e conseqüente formação

de um sólido. O produto resultante foi lavado com etanol e éter etílico, e caracterizado por difratometria de raios-X.

4.5 Síntese da oxaliplatina - *cis*-[Pt(oxp)(dach)]

Para a obtenção da OXP também partiu-se do tetracloroplatinato de potássio. Em um béquer foi feita a solubilização de 150 mg ($3,614 \times 10^{-4}$ mols) de tetracloroplatinato de potássio em aproximadamente 5 mL de água ultrapura mantidos sob agitação a uma temperatura entre 50 – 60 °C. Posteriormente, adicionou-se 240 mg (1,445 mmols) de iodeto de potássio (KI) e o sistema é mantido sob agitação. Após a mudança de coloração, é adicionado 41,3 mg ($3,614 \times 10^{-4}$ mols) de (1R,2R)-(-)-1,2-diaminociclohexano (dach). O sistema foi mantido sob temperatura entre 50 – 60 °C. Após cerca de 1 h de reação, o sobrenadante foi retirado e o sólido resultante foi lavado com água, etanol e éter gelados. O complexo foi secado a vácuo.

Em um béquer foi dissolvido 178 mg ($3,162 \times 10^{-4}$ mols) de *cis*-[Pt(I)₂(dach)] em água ultrapura, sob as mesmas condições de temperatura e sob agitação. Após a completa dissolução foi adicionado 105 mg ($6,324 \times 10^{-4}$ mols) de nitrato de prata, deixando reagir por aproximadamente 2 h. O filtrado obtido é colocado em um béquer para reagir com 48,06 mg ($3,162 \times 10^{-4}$ mols) de oxalato de sódio por cerca de 3h ao abrigo de luz. Após esse tempo, a reação foi congelada e liofilizada. O complexo resultante foi caracterizado por difratometria de raios-X.

4.6 Preparo das soluções de cisplatina e oxaliplatina

As soluções foram preparadas através das pesagens de 2,5; 5,0 e 10 mg de CDDP e de 5,0; 12,5 e 25 mg de OXP, pesados separadamente, cada soluto foi solubilizado em água ultrapura e transferido para um balão volumétrico de 5 mL, sendo posteriormente completado o seu volume total. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar estéreis.

4.7 Procedimento para inocular a *Zymomonas mobilis*

Em uma capela de fluxo laminar, pegou-se com auxílio de uma pipeta, o inóculo da *Z. mobilis* (previamente existente) e aproximou-se da chama de um bico de Busen, para a retirada de 10 % de inóculo e adiciona-se à um tubo de ensaio que contém 90 % de meio de cultura SDL. Posteriormente, colocou-se o tubo em uma incubadora previamente programada a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm de rotação, durante um período de 24 h. Ao término verifica-se a produção de CO₂, indicando o crescimento bacteriano.

Durante esse procedimento realizou-se o controle de qualidade através da adição de meio AN a três placas de Petri, onde em duas adiciona-se 10 µL do inóculo. Após esse procedimento, coloca-se em uma incubadora previamente programada com uma temperatura de 35 °C durante um período de 24 h para verificar a não ocorrência de crescimento bacteriano.

4.8 Curva de crescimento de microrganismo – obtenção do fim da fase exponencial

Depois de feito o inóculo, repetiu-se o procedimento de repicagem por 3 dias consecutivos, e por fim, foi dado início ao teste para conhecer como a bactéria se comporta, como se dá a sua curva de crescimento, o objetivo desse ensaio é para saber o tempo em que essa bactéria termina sua fase exponencial, que será a fase trabalhada posteriormente com adição de antimetabólico.

O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 50 mL, onde foram adicionados 22,5 mL de meio SDL, seguidos de 2,5 mL do inóculo da bactéria, tudo isso feito em capela de fluxo laminar e com materiais estéreis. Após esse procedimento, os erlenmeyers são transportados para a incubadora de agitação orbital, a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm de rotação. Durante o crescimento do microrganismo, foram feitas leituras de absorbância e contagem de células a cada 2 h, através do uso dos equipamentos, espectrofotômetro e microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer, respectivamente, esse teste teve duração de 20h.

4.9 Análise do crescimento do microrganismo através da geração de várias curvas de crescimento

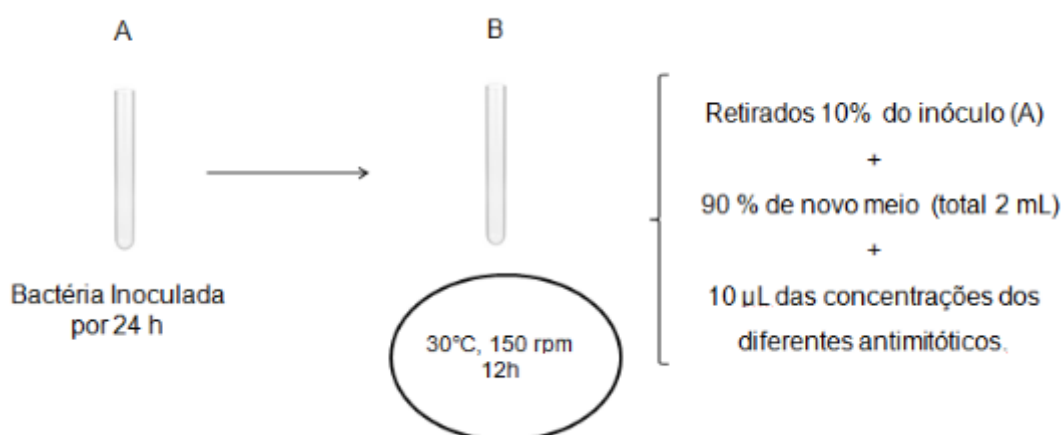
Após verificar o horário do término da fase exponencial da bactéria, foram feitas novas leituras até o tempo total de 12 h, e ao fim, eram retirados 10 % de inóculo, onde eram transferidos para 90 % de um novo meio, e rodado um novo ensaio de crescimento, essa etapa de realimentação foi repetida até completadas 60 h de teste, isso resultou na obtenção de 5 gerações de curva de crescimento exponencial, estabelecendo um padrão de controle.

4.10 Estudo de Concentração do Antimitótico

Essa análise foi realizada com objetivo de obter dos antimitóticos trabalhados, qual seria a melhor concentração estoque a ser trabalhada, através da análise morfológica da bactéria, pelo uso do microscópio óptico. O procedimento para inocular a bactéria é o mesmo realizado no tópico 4.7, a diferença é a adição posterior de antimitótico.

Adicionou-se em cada inóculo uma concentração diferente de cada fármaco, sendo 1,67; 3,33 e 6,67 mmol L⁻¹ para cisplatina; e 2,517; 6,292 e 13,384 mmol L⁻¹ para oxaliplatina, seguindo o esquema visto na **Figura 10**.

Figura 10. Esquema de teste realizado para conhecimento de melhor concentração estoque de antimitótico.

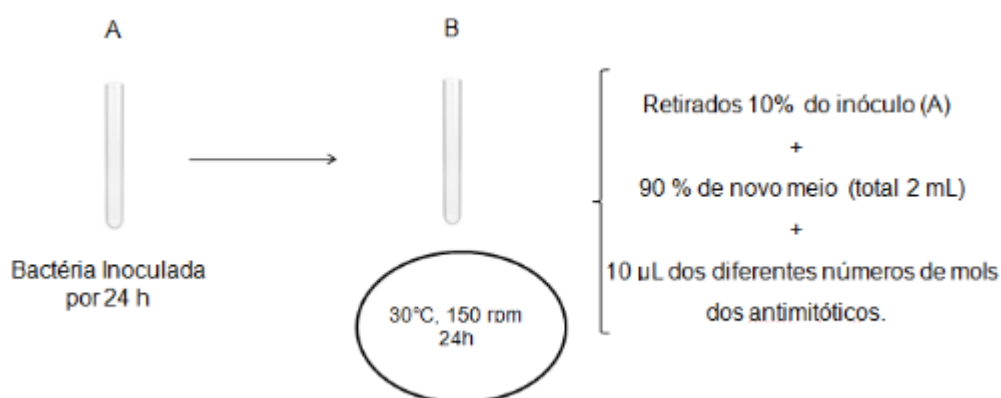


4.11 Estudo do número de mol de antimitótico

Esse estudo consistiu da mesma metodologia do estudo da concentração de antimitótico, porém, fixou-se a concentração em $3,33 \text{ mmol L}^{-1}$ para a CDDP e $6,292 \text{ mmol L}^{-1}$ para a OXP;

Foram inseridos na suspensão das células diferentes números de mol das concentrações pré-existent dos antimitóticos, sendo usados $0,120$; $0,250$; $0,5$; $0,7$; $1,0$; $1,5$; $1,8$; $2,081$; $4,163$ e $8,325 \times 10^{-7} \text{ mol}$ de CDDP e $0,126$; $0,252$; $0,5$; $1,0$; $1,3$; $2,0$; $2,5$; $3,146$; $4,405$; $8,310$ e $16,250 \times 10^{-7} \text{ mol}$ de OXP (**Figura 11**). Ao final foi feita a observação morfológica dos microrganismos no microscópio óptico.

Figura 11. Esquema de teste realizado para conhecimento das melhores quantidades de números de mol de antimitótico.



4.12 Testes utilizando *Z. mobilis* e antimitóticos

Para o estudo com CDDP e OXP, também foi feito um teste prévio com a mesma metodologia descrita do microrganismo livre de antimitótico, para observar se a bactéria mudaria seu tempo total para aderir à fase estacionária, a diferença foi à adição do antimitótico ao sistema, representado aqui pelo teste feito separadamente com todos os mols dos dois fármacos que foram abordados nesse trabalho, observados através da absorbância produzida pela análise feita no espectrofotômetro de absorção eletrônica.

Para teste com antimetabólito, o procedimento também foi o mesmo utilizado para o crescimento microbiano sem droga, a diferença é que no início do teste e no momento da remoção dos 10 % do inóculo para realimentação do meio, eram adicionados também aos erlenmeyers os diferentes números de mols de fármacos, sendo utilizados 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,8; 2,081; 4,163 x 10⁻⁷ mol de cisplatina e 0,5; 1,0; 1,3; 2,0; 2,5; 3,146; 4,405 x 10⁻⁷ mol de oxaliplatina retirados das concentrações em estoque de 3,33 e 6,292 mmol L⁻¹ respectivamente.

Os testes foram rodados em tempos totais que variaram de 36 – 60 h, sendo realizada a contagem celular, a análise da mudança na morfologia das bactérias e o aparecimento de resistência à droga.

4.13 Método de coloração de Gram

A coloração de Gram foi feita com intuito de obtenção de imagens da bactéria. Inicialmente, foi feita esterilização das lâminas através da sua aproximação da chama em um bico de Bunsen, seguida da realização de esfregaço, após isso, a lâmina é secada promovendo a fixação da bactéria.

Feito esse procedimento partiu-se para a adição dos reagentes, primeiro com cristal violeta que fica por 1 minuto na lâmina, sendo posteriormente seu excesso descartado. Seguimos com a adição de Lugol que ficou por um minuto e meio, onde o excesso foi desprezado e lavado com água destilada, após, acrescentamos álcool para efetuar descoloração do material. Por último, adicionou-se a Fucsina por 30 segundos, e por fim, lavou-se novamente com água destilada e secamos na chama.

4.14 Método para medida do comprimento bacteriano

Para essas medidas foram efetuados registros das imagens das bactérias já coradas através do uso de um microscópio óptico acoplado com uma câmera fotográfica, em seguida, eram realizadas medições das bactérias uma por uma através do programa ImageJ, ao final a média dos comprimentos foi realizada.

4.15 Estudo do valor da velocidade específica de crescimento (μ)

O valor da velocidade específica de crescimento para cada evento foi calculado através de uma curva analítica produzida entre o $\ln N$ x Tempo (h) de cada evento, através da obtenção de uma regressão linear obedecendo a equação da reta $y = a + b \times X$, sendo $y = \ln N$, o coeficiente linear $a = N_i$, $x =$ tempo e o coeficiente angular $b = \mu$, resultando na Equação 1, adaptada a partir da metodologia de SCHMIDELL, *et al.*, 2001.

$$\mu = \frac{\ln N/N_0}{\text{Tempo}} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

N = número de células em um determinado tempo;

N_i = número de células inicial.

Os valores das velocidades específicas de crescimento das células foram calculados para cada evento do ensaio, ou seja, para cada curva de crescimento produzida, tanto das células não filamentosas como das filamentosas.

4.16 Estudo do valor da Taxa Evolutiva (W)

A taxa Evolutiva foi desenvolvida através de um modelo matemático produzido durante este trabalho, a sua obtenção depende dos valores das velocidades específicas de crescimento, dos comprimentos das bactérias filamentosas e não filamentosas, do tempo de resistência obtido durante o ensaio e do número de mol de fármaco utilizado.

4.17 Estudo do Tempo de Geração (g)

Partindo dos dados colhidos na análise da curva de crescimento microbiano, referente aos valores obtidos da velocidade específica de crescimento, foi possível calcular o parâmetro cinético que corresponde ao

Tempo de Geração de cada evento encontrado, calculado através da Equação 2, (SCHMIDELL, *et al.*, 2001).

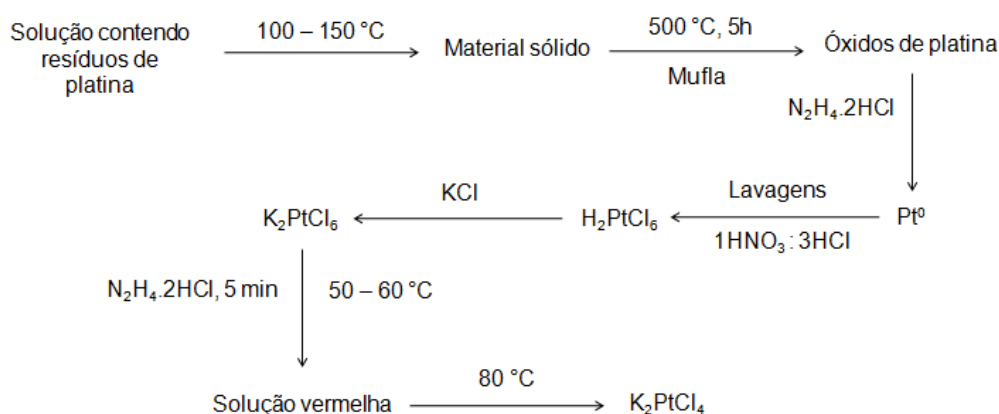
$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Equação 2})$$

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos complexos: Hexacloroplatinato e Tetracloroplatinato de Potássio.

Como descrito anteriormente, ao partir dos resíduos platínicos obtém os óxidos de platina, os quais reagem com o $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 2\text{HCl}$ para promover toda a redução de platina presente no meio para Pt^0 . Esse processo facilita o descarte dos demais resíduos existentes (**Figura 12**). Em seguida, a Pt^0 reage com água régia, que é um agente oxidante e permitirá que toda a platina metálica vá para o estado de oxidação +4. A Pt^{+4} possui número de coordenação 6, com capacidade de se ligar na sua primeira esfera de coordenação a seis ligantes, nesse sistema liga-se a íons cloretos formando o ácido platinico (H_2PtCl_6).

Figura 12. Esquema da recuperação dos resíduos de platina.

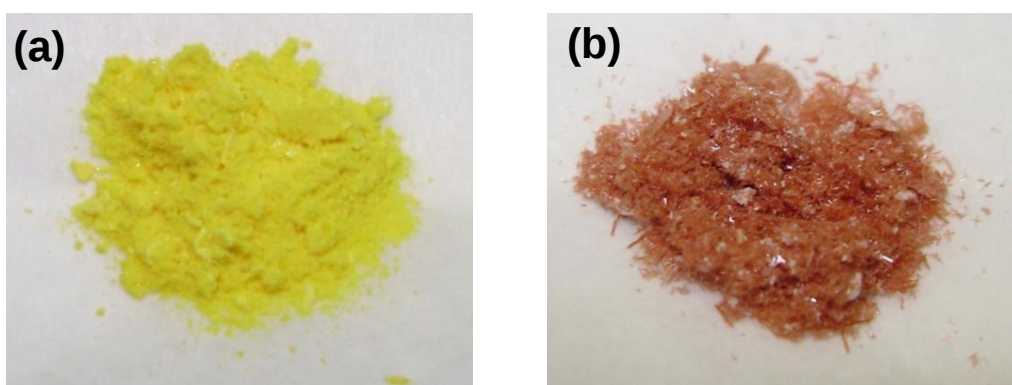


Fonte: Própria autora.

Para a ocorrência do Hexacloroplatinato de potássio adiciona-se ao complexo o cátion K^+ que vai permutar com os íons H^+ , provocando a precipitação do complexo $\text{K}_2[\text{Pt}(\text{Cl})_6]$ na forma de cristais amarelos (**Figura**

13.a). Para a produção do $K_2[Pt(Cl)_4]$ utiliza-se da reação de adição controlada do agente redutor dicloridrato de hidrazina com o hexacloroplatinato de potássio, fazendo com que ocorra a mudança no nox da platina de 4+ para +2, formando o complexo tetracloroplatinato de potássio, característico por se apresentar na forma de cristais agulha e de cor vermelha. A reação total teve um rendimento de 97 % (**Figura 13.b**).

Figura 13. Cristais de hexacloroplatinato de potássio (a) e tetracloroplatinato de potássio (b).



O hexacloroplatinato e o tetracloroplatinato de potássio foram caracterizados por difratometria de Raios-X (DRX), cujos difratogramas são apresentados nas **Figuras 14** e **15**, respectivamente.

Figura 14. Difratograma de Raios-X dos dados experimentais (hexacloroplatinato de potássio sintetizado) e do banco de dados sobrepostos.

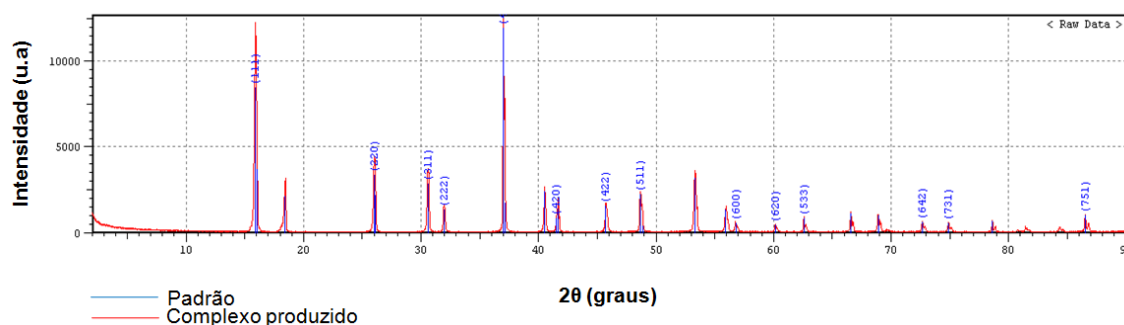
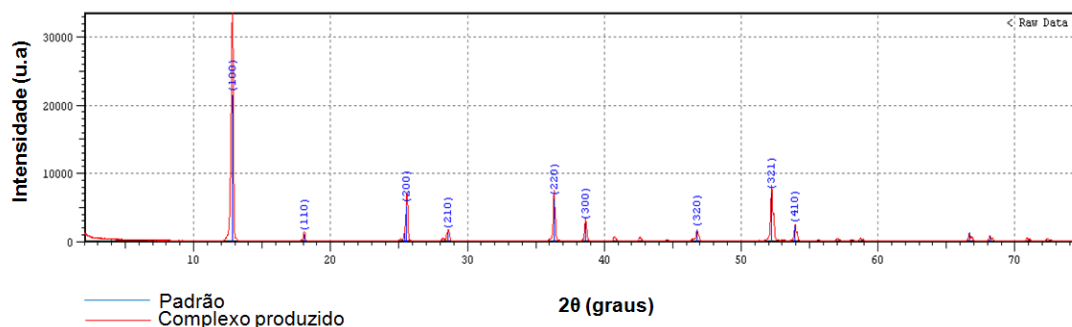


Figura 15. Difratoograma de Raios-X dos dados experimentais (tetracloroplatinato de potássio sintetizado) e do banco de dados sobrepostos.



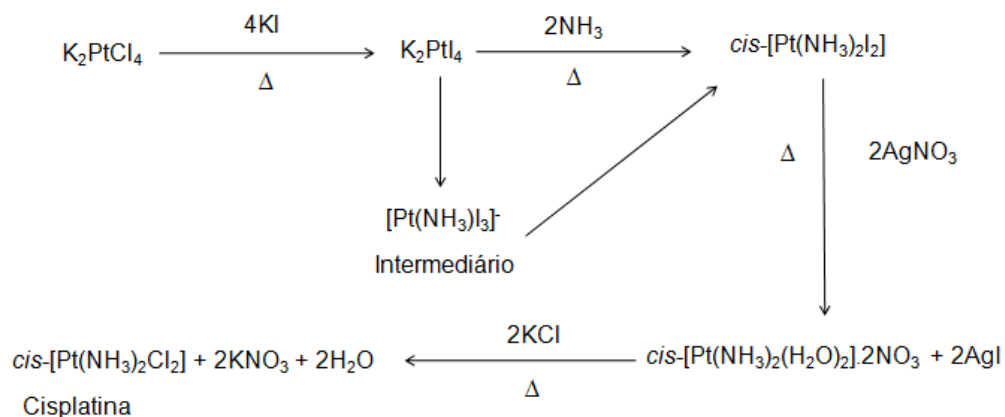
Os difratogramas do $K_2[Pt(Cl)_6]$ e $K_2[Pt(Cl)_4]$ sintetizados estão sobrepostos com o padrão de hexacloroplatinato e tetracloroplatinato de potássio do banco de dados do equipamento JCPDS (do inglês: *Joint Committee on Powder Diffraction Data*). A partir dos dados é possível verificar uma excelente concordância, com mais de 98 %, entre os dados obtidos e os dados do padrão indicando assim a formação dos complexos desejados.

5.2 Síntese Cisplatina - *cis*- $[Pt(Cl)_2(NH_3)_2]$

A cisplatina foi obtida a partir do $K_2[Pt(Cl)_4]$, que por ser um complexo quadrado plano tem como característica a substituição de seus ligantes através do chamado **efeito trans** (caracterizado pela presença de ligantes espectadores, que em complexos quadráticos planos, se encontram em uma posição trans ao grupo de saída, influenciando na velocidade dessa substituição). Ao reagir esse complexo com KI, ocorre que o efeito trans diretor do Iodeto levando a substituição dos cloretos pelos iodetos. Essa troca de ligantes é facilitadora para a próxima etapa que é a da entrada de NH_3 trans ao iodeto, provocando a substituição de dois iodetos por duas amônias, deixando o complexo na posição *cis*. O próximo passo é utilizar do método argentométrico para precipitar os iodetos na forma de iodeto de prata, fazendo com que seja adicionado ao complexo, duas moléculas de água, já que o meio é aquoso, ficando essas na posição *trans* as amônias, que nesse caso são *trans* diretores mais fortes. Seguiu-se adicionando KCl para que ocorra a troca das águas pelo cloreto, também seguindo as regras do efeito trans, essa ultima

substituição nos dá o composto esperado $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2]$, característico pela formação de cristais de coloração amarela, cujo rendimento foi 92 % (**Figura 16**).

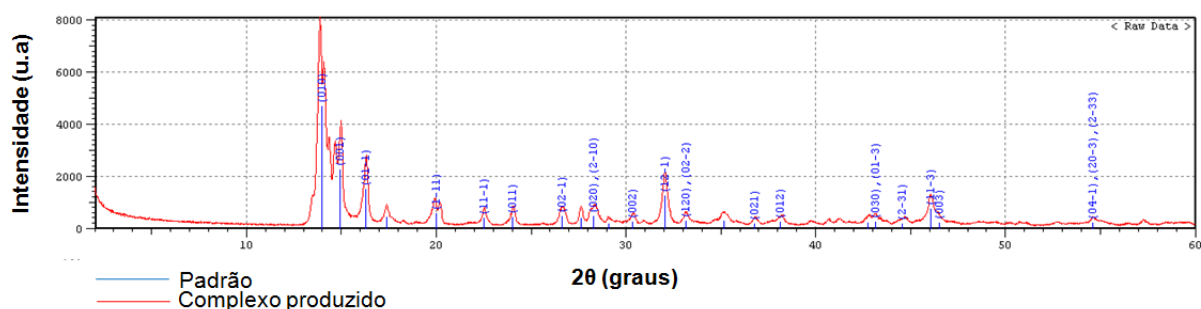
Figura 16. Esquema simplificado da obtenção da CDDP.



Fonte: Própria autora.

Na **Figura 17**, é apresentado o difratograma de raios-X da cisplatina sintetizada sobreposta com o padrão do banco de dados do equipamento, aqui também é possível verificar concordância entre os dados obtidos e os dados do padrão comprovando a formação do complexo desejado.

Figura 17. Difratograma de raios-X da CDDP

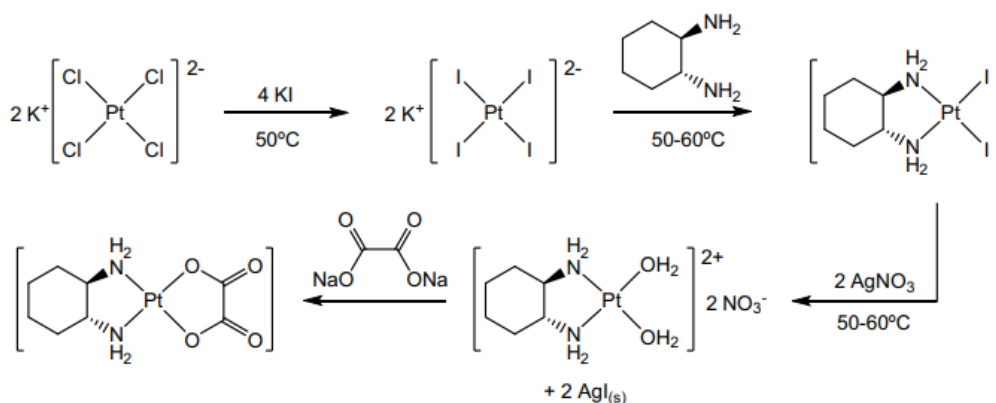


5.3 Síntese da oxaliplatina - $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{ox})(\text{dach})]$

Para obter a oxaliplatina seguimos o mesmo procedimento partindo do tetracloroplatinato de potássio até a formação do $\text{K}_2[\text{Pt}(\text{I})_4]$, nesse momento esse composto reage com o ligante bidentado 1,2-diaminociclohexano que vai

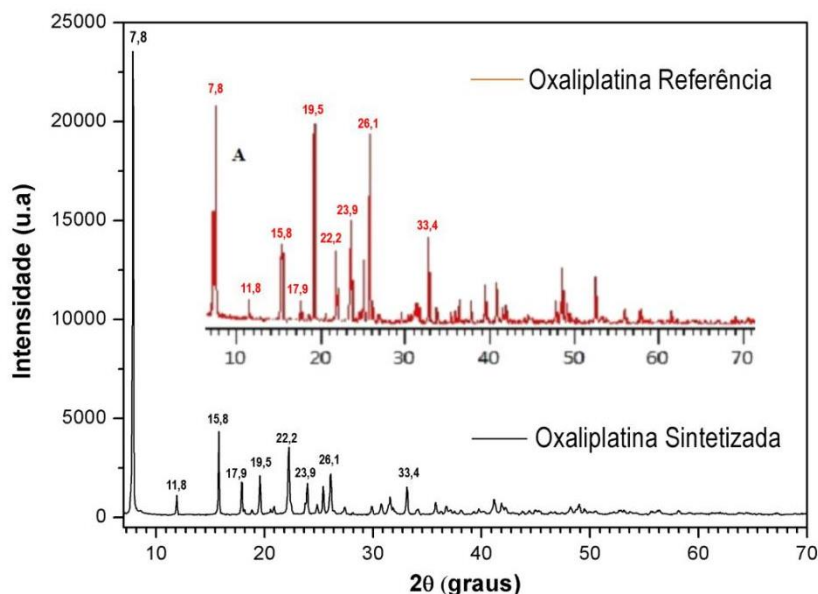
se coordenar ao centro metálico, provocando a saída de dois iodetos, formando a espécie *cis*-[Pt(I)₂(dach)]. Posteriormente é provocada a precipitação dos outros iodetos ligados ao metal pelo método argentométrico, originando no composto diaquo *cis*-[Pt(OH₂)₂(dach)], esse ultimo vai reagir com o ligante bidentado oxalato de sódio promovendo a retirada da água e a adição do ligante oxalato ao metal, resultando na formação de um sólido branco característico da obtenção de oxaliplatina, o qual obteve um rendimento de 75% (**Figura 18**).

Figura 18. Esquema reacional de formação da Oxaliplatina



Para também confirmar a obtenção do complexo foi feita a difratometria de Raios-X para a oxaliplatina (**Figura 19**) e comparada com o encontrado na literatura, onde se pode verificar a concordância existente dos picos cristalinos agudos existentes entre 9 – 50 °, indicando a obtenção do complexo.

Figura 19. Difratometria de Raios-X da Oxaliplatina, referências retiradas de ULLAH, *et al.*, 2019

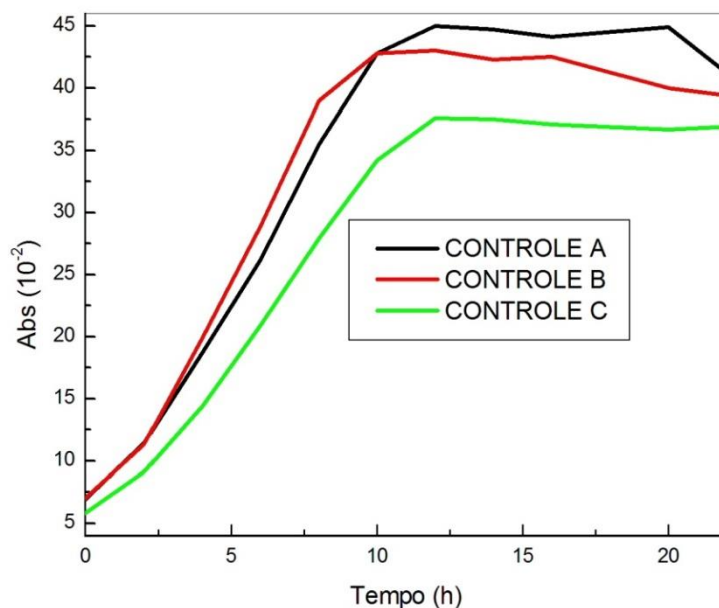


5.4 Curva de crescimento da *Z. mobilis*

O estudo do crescimento microbiano da bactéria *Z. mobilis* foi realizado na presença de meio de cultura SDL. Foi utilizada a análise turbidimétrica, durante a reprodução do micro-organismo, onde se observou o aumento da quantidade de partículas dispersas no meio e consequentemente a sua turbidez, esta por sua vez, está diretamente relacionada à radiação incidente na amostra, como resultado provoca diminuição da radiação transmitida. A análise foi feita em um comprimento de onda fixado em 660 nm, a fim de diminuir a quantidade de luz dispersa. Os resultados foram computados através da absorbância obtida em decorrência do tempo do evento (leituras feitas a cada 2 h), obtendo assim uma curva de crescimento microbiano.

Foi observada a curva a partir do momento ocorre o fim da fase exponencial e que se inicia a fase estacionária do microrganismo. Esse estudo garantiu que as remoções de meio nas análises posteriores estariam sendo feitas no momento em que toda a etapa de crescimento já estaria concluída, dado visto na **Figura 20**, com teste em triplicata. Partindo desse estudo, ficou definido que a retirada de meio para os testes seguintes seriam em exatas 12 h de análise, já que neste tempo notou-se que todo evento de fase exponencial foi concluído.

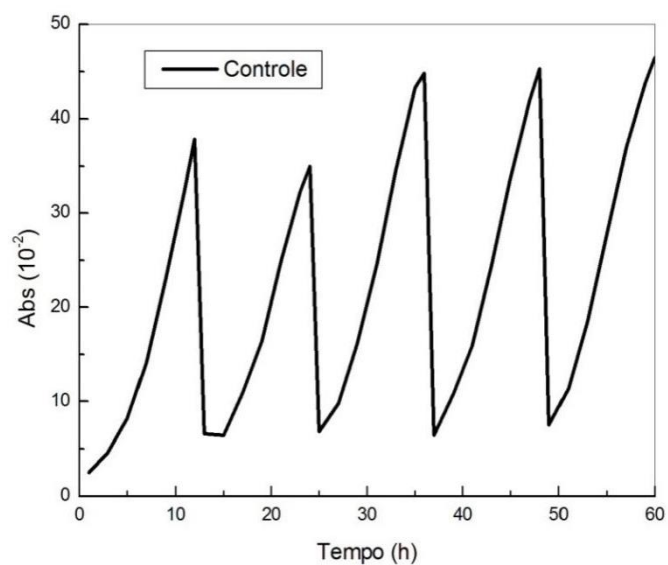
Figura 20. Curva de crescimento, momento em que microrganismo atinge fase estacionária.



5.5 Análise de Comportamento Microbiano sem Adição de Antimicrobiano

Após estudo de tempo de retirada de meio, foram feitos ensaios com a bactéria contendo apenas meio SDL, efetuou-se uma análise de 60 h corridas, onde, dentro desse período realizou-se a retirada de inóculo e troca de meio, foram efetuadas leituras da primeira hora de todos os eventos seguidas de leituras a cada 2 h de teste, o resultado do teste turbidimétrico mostra a estabilidade da bactéria, com curvas reproduzíveis (**Figura 21**).

Figura 21. Controle, teste de crescimento microbiano sem adição de antimicrobiano.



Outro procedimento foi a contagens das células na câmara de Neubauer durante as análises, observando-se assim, um crescimento microbiano contínuo ao longo do tempo. Também foi avaliado se ocorreria presença de filamentos nesse estudo, o que não foi observado, como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Contagem microbiana e tempo do evento para controle.

Tempo do evento(h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	3,5	0	3,5
3	7,5	0	7,5
5	34,5	0	34,5
7	43,5	0	43,5
9	55,5	0	55,5
11	89,5	0	89,5
12	127,0	0	127,0
13	32,5	0	32,5
15	30,0	0	30,0
17	40,0	0	40,0
19	51,0	0	51,0
21	67,0	0	67,0
23	85,5	0	85,5
24	118,0	0	118,0
25	37,5	0	37,5
27	40,4	0	40,4
29	79,5	0	79,5
31	98,5	0	98,5
33	105,0	0	105,0
35	158,5	0	158,5

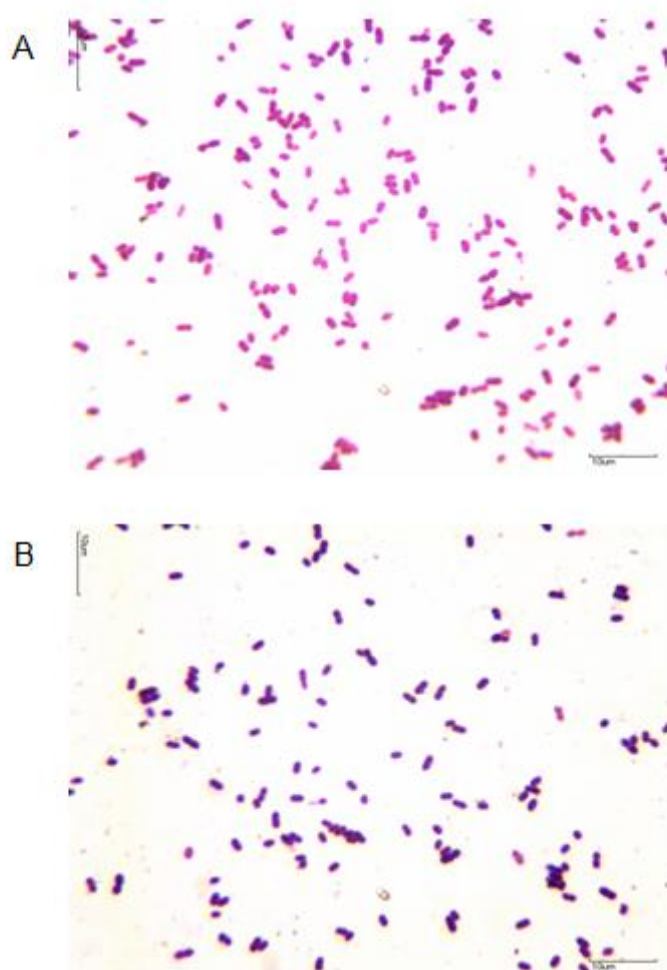
36	167,5	0	167,5
37	10,40	0	10,40
39	39,5	0	39,5
41	69,0	0	69,0
43	87,5	0	87,5
45	105,0	0	105,0
47	160,0	0	160,0
48	173,4	0	173,4
49	14,5	0	14,5
51	47,5	0	47,5
53	75,0	0	75,0
55	95,0	0	95,0
57	115,0	0	115,0
59	137,5	0	137,5
60	205,0	0	205,0

Durante os eventos, os microrganismos também foram fotografados a cada 12 h de teste (em sua fase estacionária), em microscópio óptico, em objetiva de (100x) submetidos à coloração de Gram (**Figura 22**). Partindo dessas imagens, foi possível fazer uma média do tamanho das bactérias nos diferentes ensaios realizados, assim é possível saber o tamanho da *Z. mobilis* trabalhada (na sua forma como controle, sem adição de antimicrobiano), visto na **Tabela 2**.

Tabela 2. Média de comprimento microbiano na fase estacionária sem adição de agente antimicrobiano.

Tempo (h)	Comprimento (μm)
12	2,493
24	2,779
36	2,188
48	2,196
60	2,679
Média (12-60)	2,467

Figura 22. Controle: morfologia das bactérias *Z. mobilis* sem agente antimicrobiano, imagens com: A) 12h, B) 36h C) 60h de evento.





Com os dados obtidos acerca das médias encontradas, chegou-se às informações do tamanho da *Z. mobilis* para esse controle, que possui uma característica de ter uma média total de 2,467 μm de comprimento, a média e imagens das bactérias do segundo controle que foi utilizado nos testes está disposto no apêndice do trabalho (APÊNDICE A), e possuem a característica de uma média de 2,057 μm de comprimento.

5.6 Ensaio para Estabelecer a Concentração estoque de Antimitótico Ideal

O microrganismo ficou exposto aos fármacos platínicos por 12 h, ao fim desse período observa-se as diferenças morfológicas atribuídas às bactérias, sendo a melhor resposta visualizada na concentração de 3,333 mmol L^{-1} de CDDP, e para OXP 6,292 mmol L^{-1} , em razão da presença de filamentos e de uma grande população de bactérias, como visto nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3. Teste para definir concentração de CDDP.

Concentração (mmol L^{-1})	Evento observado nas bactérias
1,67	Poucos filamentos
3,33	Muitos filamentos.
6,67	Com filamentos, redução do volume de células.

Tabela 4. Teste para definir concentração de OXP.

Concentração (mmol L ⁻¹)	Evento observado nas bactérias
2,517	Poucos filamentos
6,292	Muitos filamentos.
13,384	Com filamentos, redução do volume de células.

5.7 Ensaio para Estabelecer o número de mol de Antimitótico

Partindo-se das concentrações de estoque 3,33 mmol L⁻¹ para CDDP e 6,2925 mmol L⁻¹ para a OXP, foram realizados os testes em que as bactérias entraram em contato com diferentes números de mols desses fármacos por 24 h, ao final, notou-se que as melhores respostas foram adquiridas nos valores de 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,8; 2,081 e 4,163 x 10⁻⁷ mols de CDDP, e, 0,5; 1,0; 1,3; 2,0; 2,5; 3,146 e 4,405 x 10⁻⁷ mol de OXP, mostrados nas **Tabelas 5 e 6**, por apresentarem a presença de filamentos dentro do tempo de estudo e por possuírem uma mobilidade semelhante às verificadas nos microrganismos sem antimitótico e apresentarem grande população.

Tabela 5. Dados obtidos nos testes para verificar o número de mols de cisplatina para usar em análise microbiana.

Mol (10^{-7})	Evento observado nas bactérias
0,120	Sem filamentos
0,250	Sem filamentos.
0,500	Aparecimento de alguns filamentos.
0,700	Semelhante a 0,5.
1,000	Quantidade de filamentos maiores que 0,5 e 0,7.
1,500	Quantidade de filamentos maior que 1,0.
1,800	Semelhante a 1,5.
2,081	Muitos filamentos, maiores que os anteriores.
4,163	Muitos filamentos e maiores que 2,081.
8,325	Apresenta filamentos, com população reduzida, pouca mobilidade.
16,665	Células com pouca mobilidade, redução de células, morte.

Tabela 6. Dados obtidos nos testes para verificar o número de mols de oxaliplatina para usar em análise microbiana.

Mol (10^{-7})	Evento observado nas bactérias
0,126	Sem filamentos
0,252	Sem filamentos.
0,500	Aparecimento de filamentos.
1,000	Poucos filamentos.
1,300	Filamentos em maiores quantidades que 1,0.
2,000	Filamentos aparentemente maiores que 1,0 e 1,3.
2,500	Semelhante a 2,0.
3,146	Filamentos em maior quantidade e maiores que os anteriores.
4,405	Apresenta filamentos grandes, população ainda significativa.
8,310	Células com pouca mobilidade, redução de células, morte.
16,250	Poucas células, morte.

5.8 Análise de Comportamento Microbiano com Adição de Antimitótico

Adquirida as características da bactéria e efetuado o estudo dos números de mols de antimitótico, primeiramente foram feitos os testes que consistiram na adição de CDDP e OXP ao meio de cultivo para a verificação através da análise turbidimétrica do momento em que o sistema entraria em fase estacionária, verificando o fim da fase exponencial. Esse teste, assim como visto no controle, garantiu que as remoções de meio nas análises posteriores estariam sendo feitas no momento em que toda a etapa de crescimento já estaria concluída.

As **Figuras 23 e 24** mostram as respostas encontradas para os diferentes números de mols introduzidos no sistema, verifica-se que o tempo de retirada seria em exatas 12 h de análise, assim como visto para o controle. Verificamos o aumento da absorbância para os dois casos, obtidos quando se tem uma maior quantidade de antimitótico no sistema, esse aumento de absorbância se dá pelo aumento provocado no tamanho das bactérias,

atribuído a ação do antimitótico de impedir a divisão celular, deixando as bactérias filamentosas. Portanto, o aumento aqui visualizado não está relacionado ao aumento populacional, mas sim ao aumento de tamanho do micro-organismo.

Figura 23. Dados da análise turbidimétrica com adição de cisplatina, momento em que a fase estacionária é atingida.

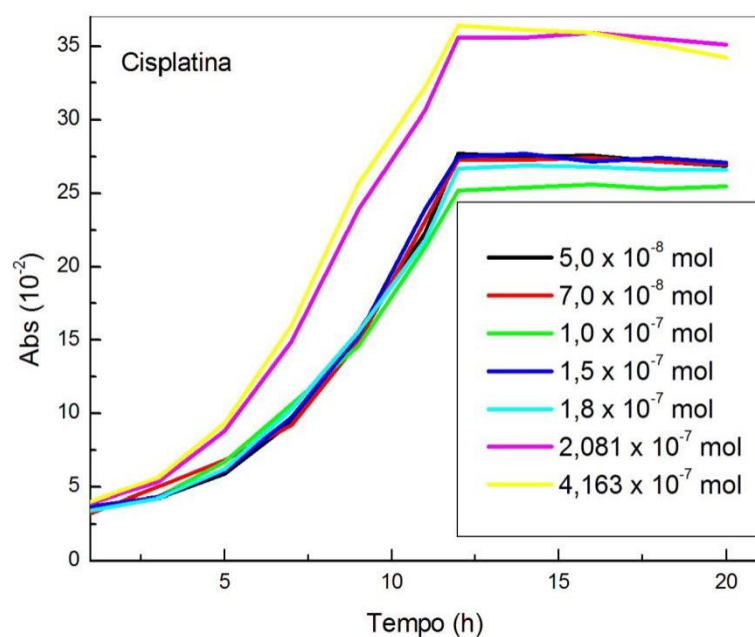
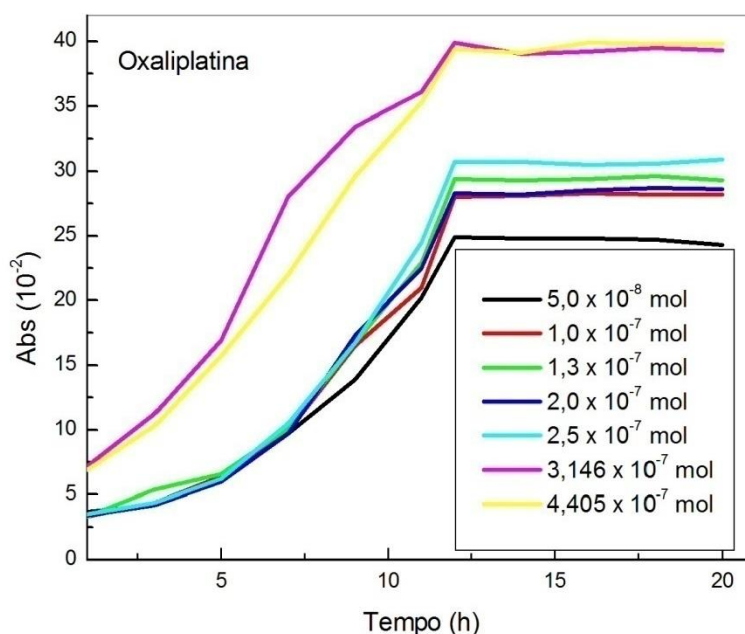


Figura 24. Dados da análise turbidimétrica com adição de oxaliplatina, momento em que a fase estacionária é atingida.



Após a análise turbidimétrica foram realizados ensaios corridos, agora com adição de antimetabólito, os testes foram realizados utilizando-se da mesma metodologia feita para o controle, com duração de 36, 48 e 60 h estabelecidos no decorrer dos testes. Os tempos foram modificados por conta das distintas respostas do micro-organismo frente às diversas quantidades de fármacos introduzidas no sistema e consequentemente obtendo-se respostas heterogêneas de resistência para cada teste. No apêndice desse trabalho são apresentadas as tabelas com as contagens de um tempo maior para cada teste. Foram rodados testes que variaram de 48 – 72 h, apesar de já encontrados os objetivos de interesse do estudo, que é a resistência adquirida, os testes tiveram continuidades com o intuito de comprovar que não ocorreria uma inversão de população novamente, validando o método.

Foram realizados os mesmos procedimentos de leitura, de contagem e ocorrendo em sua fase estacionária remoção do inóculo e adição de novo meio de cultura SDL juntamente com o fármaco.

Os ensaios também seguiram a mesma metodologia feita para o controle, que consistiu na obtenção das imagens da *Z. mobilis* a cada 12 h de teste, adquirindo a média do tamanho das bactérias, podendo assim, comparar seu tamanho com os encontrados no controle, comprovando através do

comprimento se o micro-organismo está ou não sofrendo o impedimento mitótico.

5.9 Análise de Comportamento Microbiano para teste utilizando o Antimitótico CDDP.

Analisando o comportamento bacteriano frente ao uso de cisplatina, os resultados revelaram uma tendência de quanto maior o número de mols de antimitótico introduzido no sistema, mais rápida a inversão de população, onde as células filamentosas estão em maior número. Esse fato se dá devido ao impedimento da divisão celular, momento que indica em qual faixa está ocorrendo uma alta eficiência do medicamento, provocando interrupção da mitose no micro-organismo, bem como, maior o tempo de ação do fármaco.

Verifica-se que o tempo para adquirir resistência teve uma tendência de ser maior quanto maior for a quantidade de fármaco introduzida. Foram encontrados os tempos de 31, 33, 33, 36, 37, 39 e 51h para o uso de 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,8; 2,081 e $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP, respectivamente. Esses dados podem ser verificados nas tabelas que se encontram no apêndice do trabalho (APÊNDICE B).

As **Figuras 25 – 31** expõem os momentos de inversões das populações e os momentos em que as resistências são adquiridas com uso de cisplatina.

Figura 25. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $5,0 \times 10^{-8}$ mol de antimitótico.

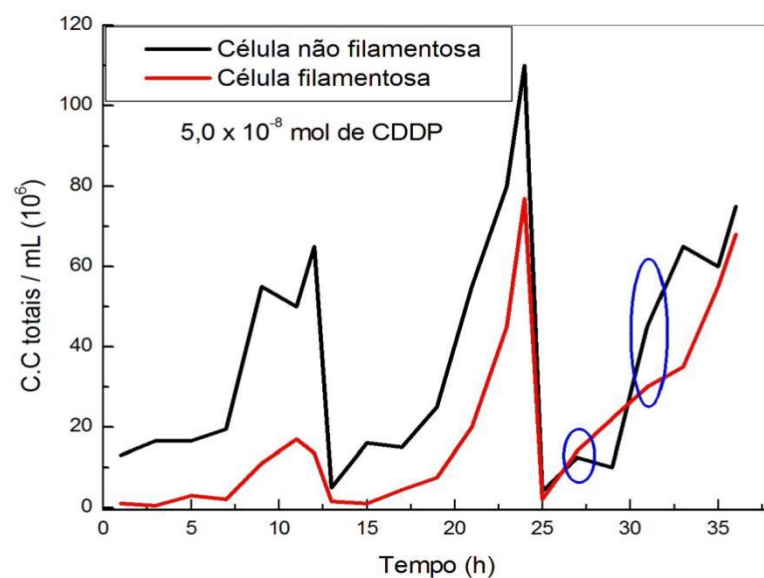


Figura 26. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $7,0 \times 10^{-8}$ mol de antimitótico.

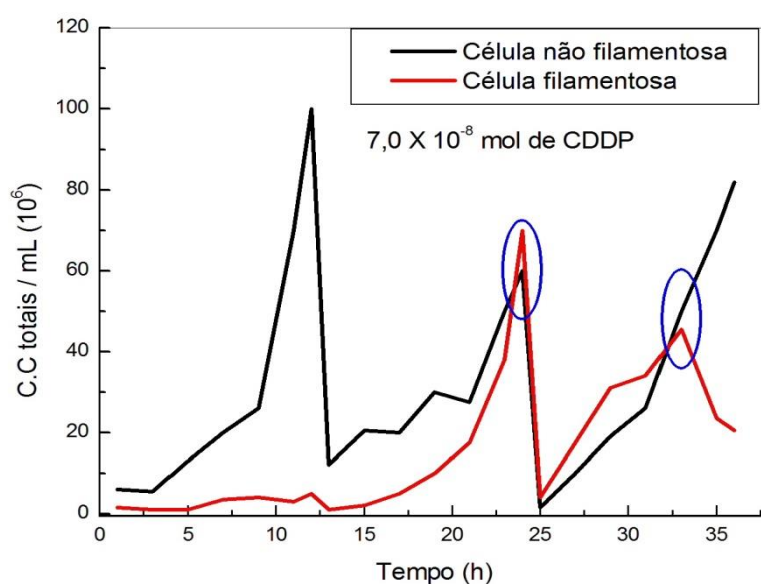


Figura 27. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,0 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

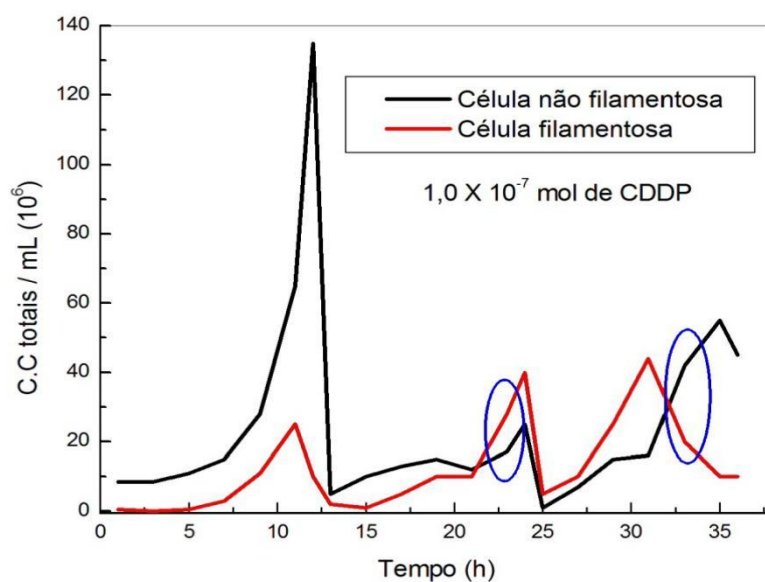


Figura 28. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,5 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

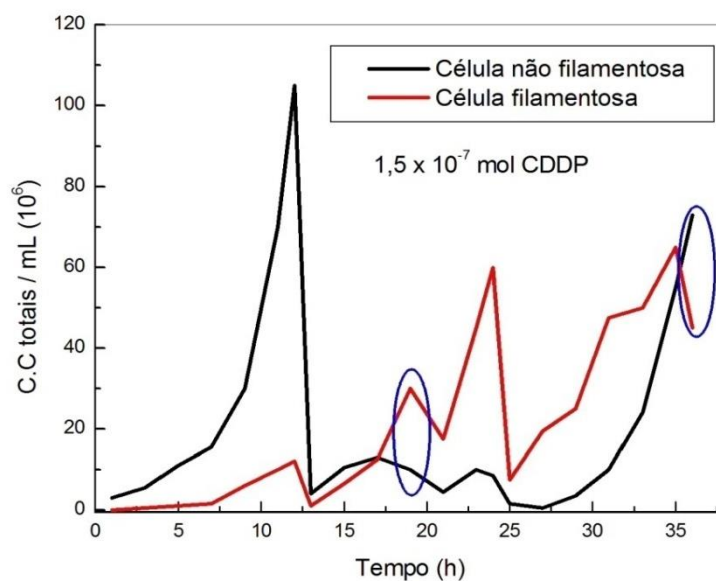


Figura 29. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,8 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

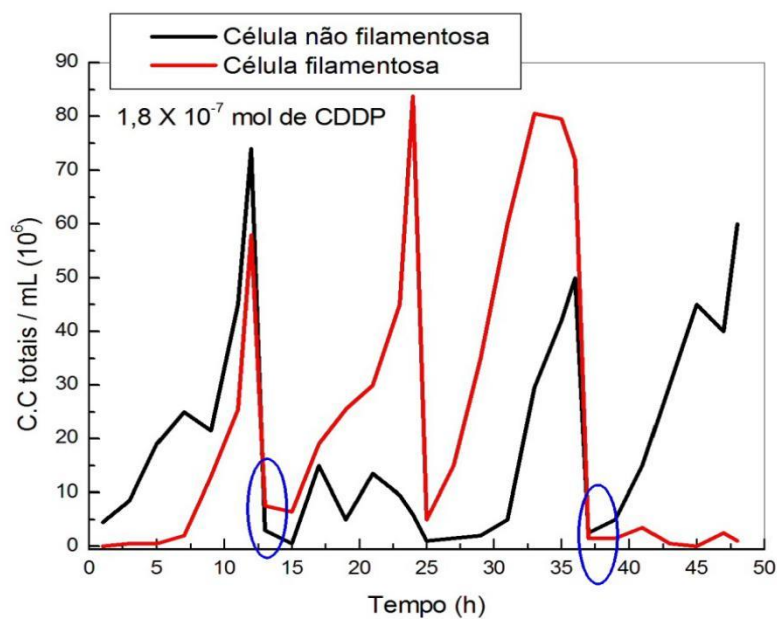


Figura 30. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $2,081 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

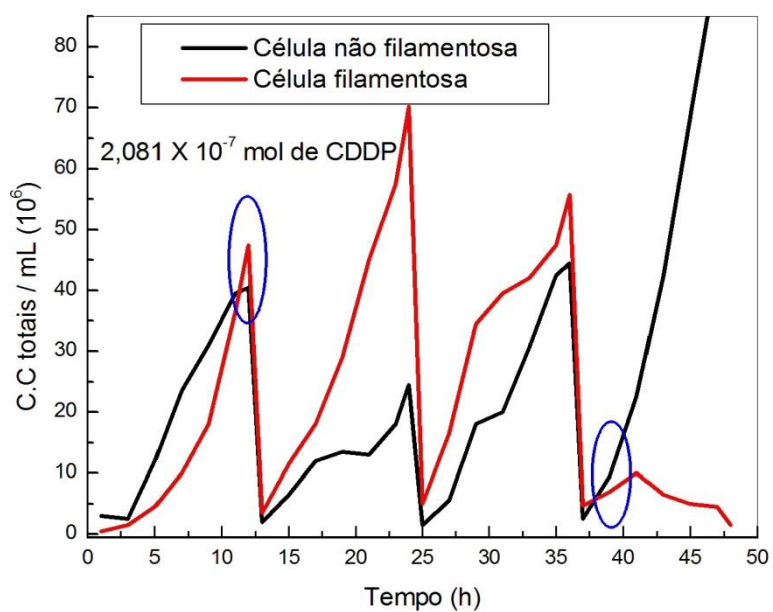
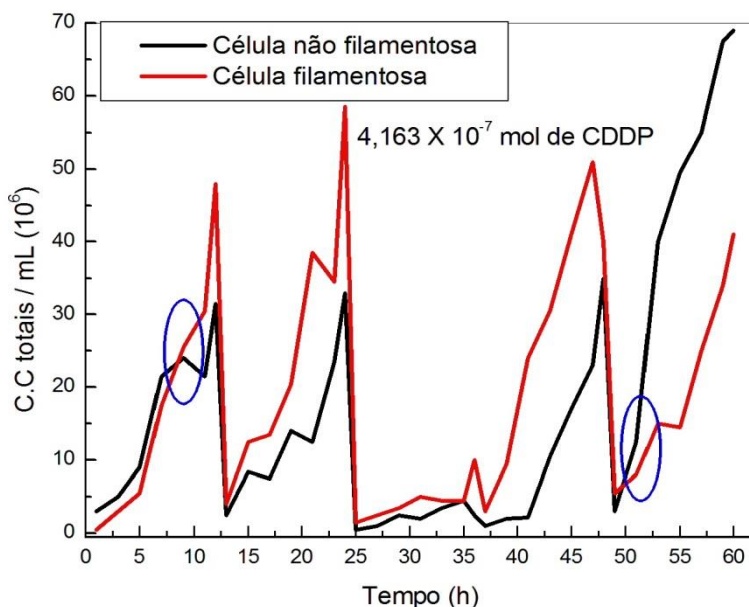


Figura 31. Gráfico dos dados referentes a morfologia celular do modelo biológico, com uso de $4,163 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.



Outras informações que o sistema nos fornece são observadas nas **Figuras 32, 33 e 34**, quando se compara o número de células totais existente no controle com os das bactérias na presença do antimitótico, é possível verificar que ocorre um decaimento populacional total da bactéria de acordo com o aumento do número de mols do fármaco introduzido na análise, ou seja, quanto maior a quantidade de antimitótico, menor o número de células e maior o número de morte celular. A tabela com os valores das contagens relacionadas ao controle que foram usados como padrão nos ensaios contendo 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 e 1,8 mol de CDDP estão dispostos no apêndice (APÊNDICE D), já os referentes a 2,081 e 4,163 mol estão listados na **Tabela 1**.

Figura 32. Dados referentes à contagem de células totais por tempo com 0,5; 0,7 e $1,0 \times 10^{-7}$ mol de cisplatina.

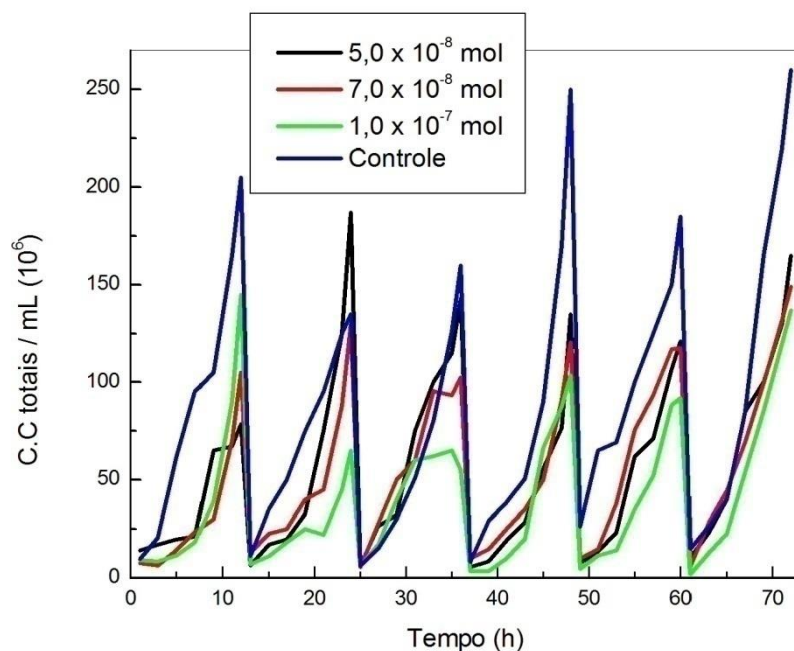


Figura 33. Dados referentes à contagem de células totais por tempo com $1,5$ e $1,8 \times 10^{-7}$ mol de cisplatina.

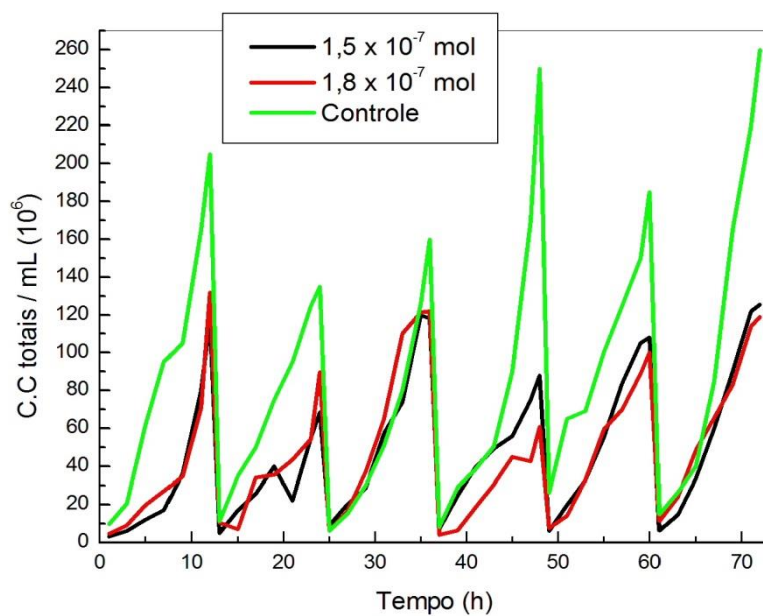
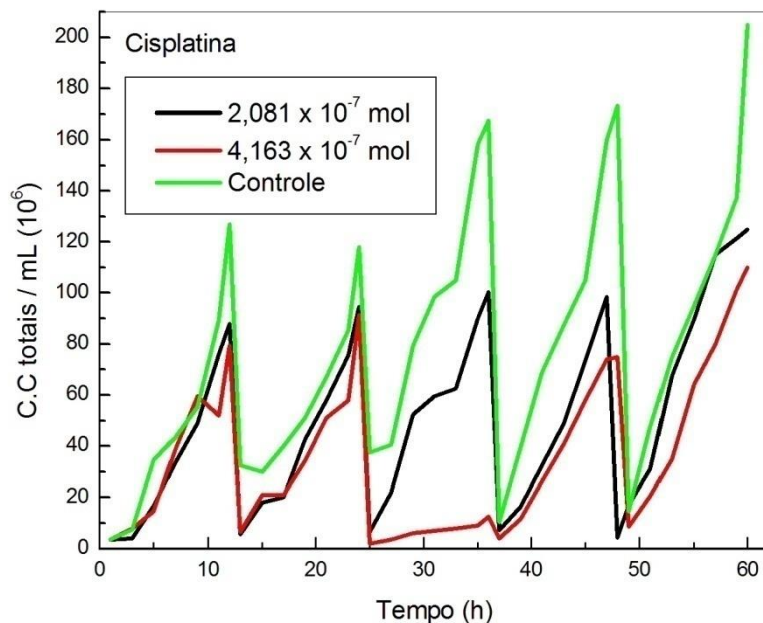


Figura 34. Dados referentes à Contagem de células totais por tempo com $2,081$ e $4,163 \times 10^{-7}$ mol de cisplatina.



5.10 Análise de Comportamento Microbiano para teste utilizando o Antimitótico Oxaliplatina.

Os estudos feitos acerca do comportamento bacteriano submetido ao uso de oxaliplatina, também mostram uma tendência de que quanto maior o número de mols, mais rápida a inversão de população, mostrando uma maior eficácia no impedimento da divisão celular.

Ao examinar o tempo de resistência é possível verificar quando a quantidade de OXP utilizada é baixa, como em $5,0 \times 10^{-8}$ mol, não é possível encontrar mesmo comportamento com a CDDP, que seria um tempo de resistência inferior nos casos com maior quantidade de antimitótico, a resposta aqui obtida de resistência foi em um tempo de 55h, isso mostra que baixas concentrações desencadeiam a resistência de forma lenta. O sistema exibe também, que o tempo para que o número de células filamentosas ultrapassasse o número das não filamentosas foi bastante tardio, com 36 h.

Analisando os testes com o uso das demais quantidades de oxaliplatina, identifica-se que o tempo para que seja visualizada a resistência não segue um padrão como o visto na CDDP, com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico a resistência é vista em 37 h, já em $1,3$; $2,0$; $2,5$ e $3,146 \times 10^{-7}$ mols a resistência teve o mesmo horário, de 33h. Ao empregar $4,405 \times 10^{-7}$ mols verifica-se um aumento do tempo de resistência em relação aos anteriores, que se encontra em 36 h.

No apêndice encontram-se as tabelas que apresentam os resultados obtidos nestes experimentos (APÊNDICE B), e as **Figuras 35 – 41** exibem os momentos de inversões das populações e os instantes em que foram adquiridas as resistências para os testes com o uso de oxaliplatina.

Figura 35. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $5,0 \times 10^{-8}$ mol de antimitótico.

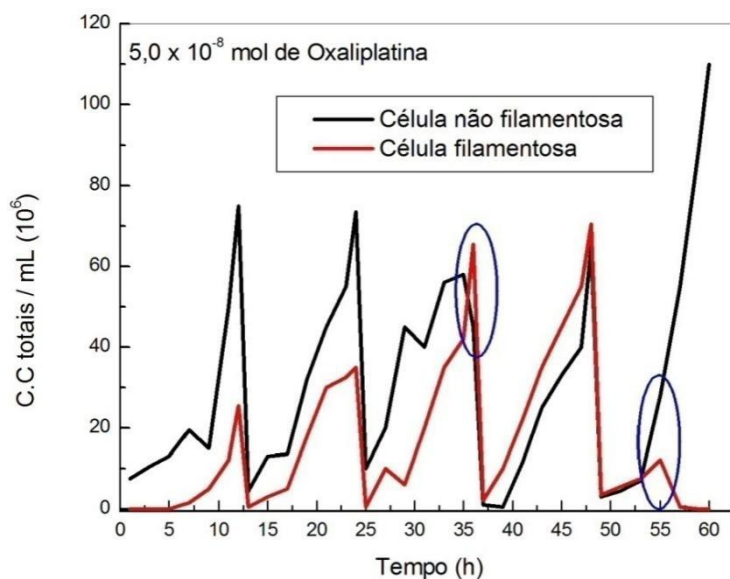


Figura 36. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,0 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

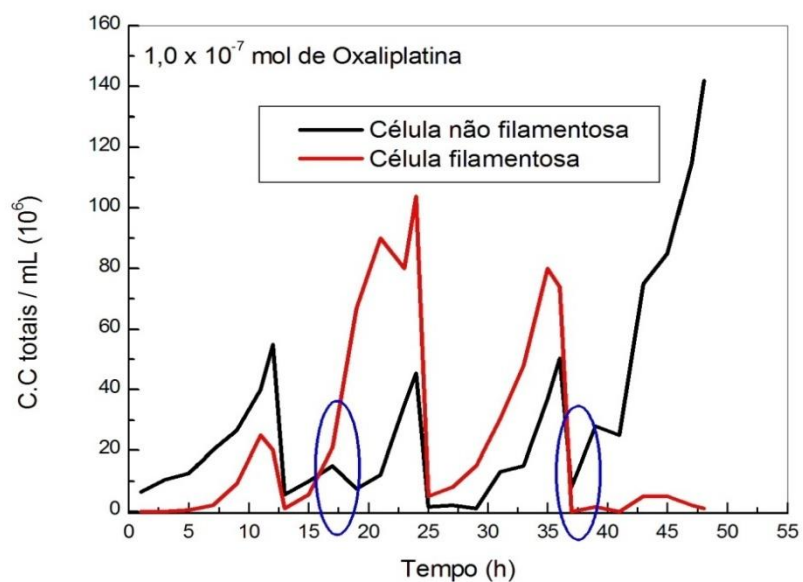


Figura 37. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $1,3 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

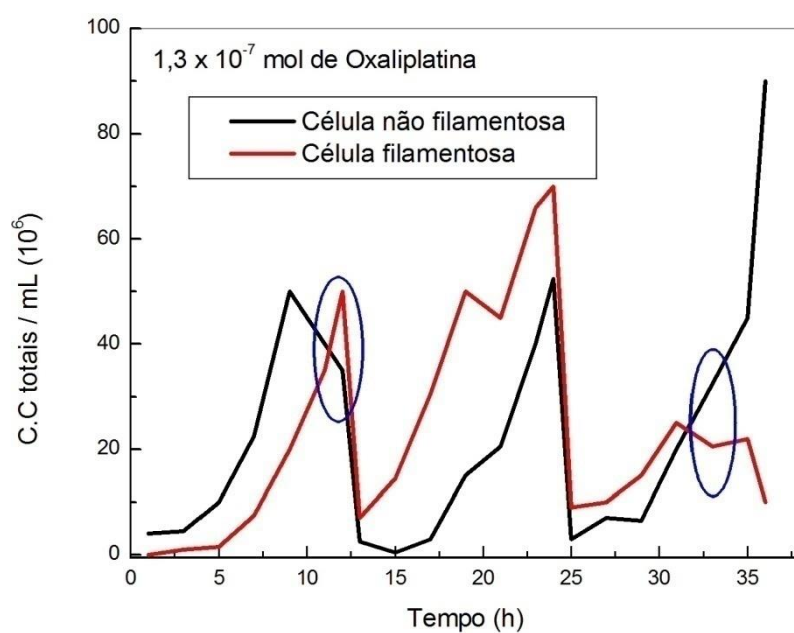


Figura 38. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $2,0 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

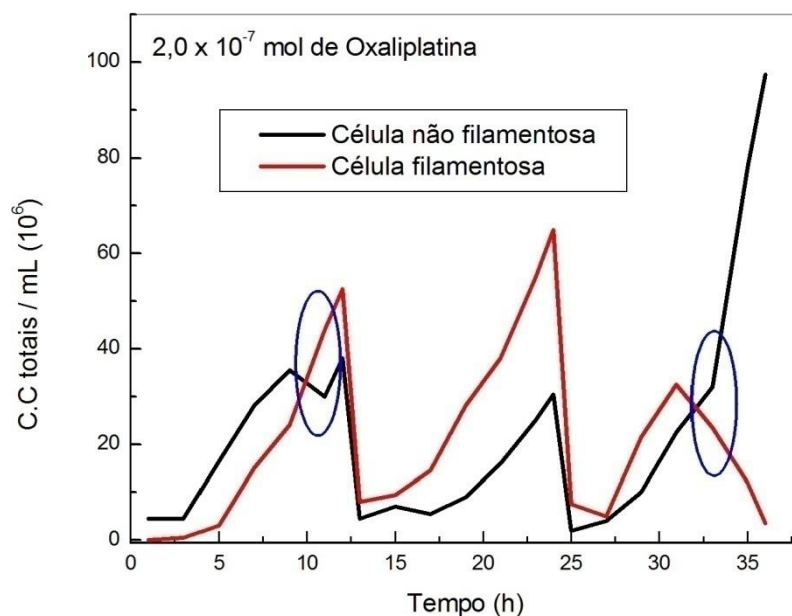


Figura 39. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $2,5 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

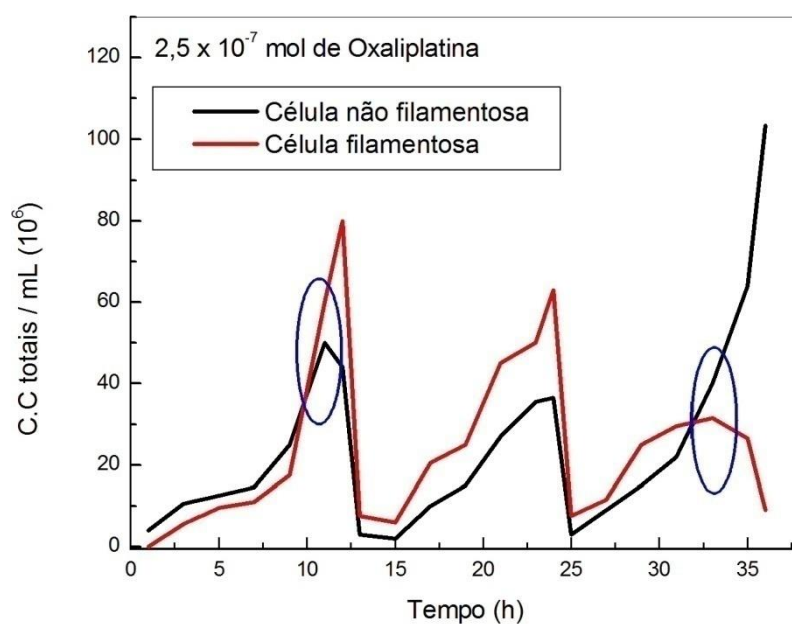


Figura 40. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $3,146 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.

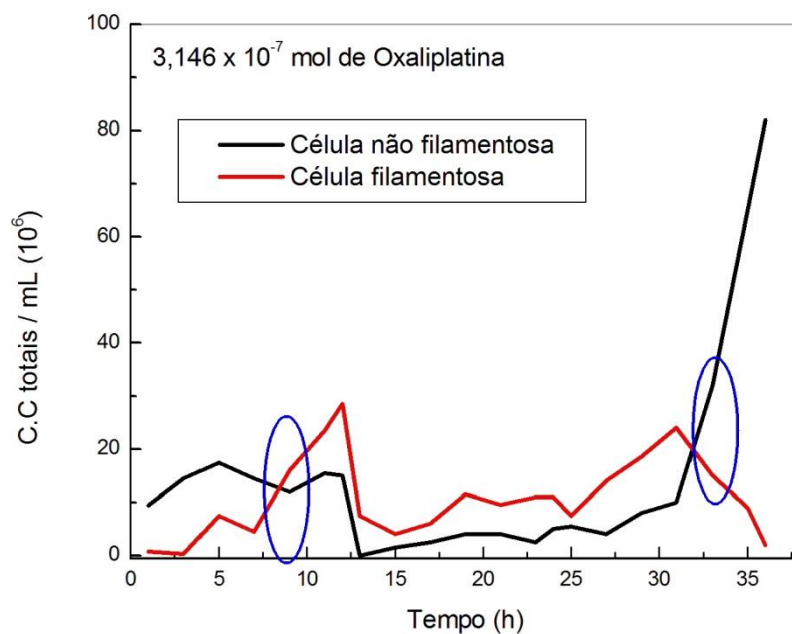
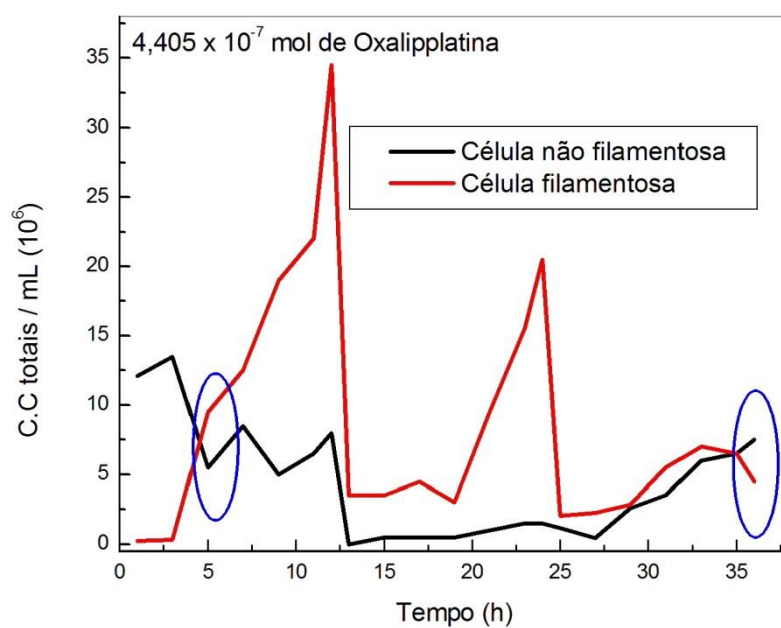


Figura 41. Gráfico dos dados referentes à morfologia celular do modelo biológico, com uso de $4,405 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico.



Como visto nos ensaios com CDDP, observa-se um decaimento populacional total da bactéria de acordo com o aumento do número de mols do fármaco introduzido na análise, resultando em apoptose celular. Esses dados podem ser observados nas **Figuras 42, 43 e 44**. Os valores referentes aos dados do controle utilizado se encontram no apêndice (APÊNDICE D).

Outras observações, encontrada no apêndice do trabalho, é que os testes tiveram continuidade mesmo após ter sido visualizado o surgimento do fenômeno de resistência, ou seja, foi dada a continuidade das contagens de células filamentosas e não-filamentosas, com o intuito de verificar a comprovação do término da análise, não sendo evidenciado o surgimento de inversão populacional novamente, portanto após a resistência adquirida, a população não filamentosa, permanece em maior número, provando a estabilidade do sistema (APÊNDICE C).

Figura 42. Contagem de células totais por tempo com 0,5; 1,0 e 1,3 x 10⁻⁷ mol de Oxaliplatina.

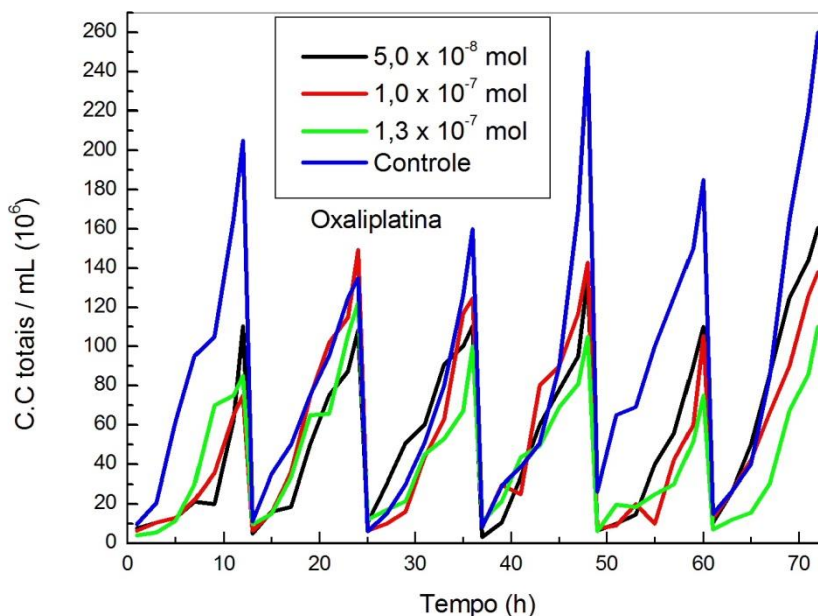


Figura 43. Contagem de células totais por tempo com $2,0$ e $2,5 \times 10^{-7}$ mol de oxaliplatina.

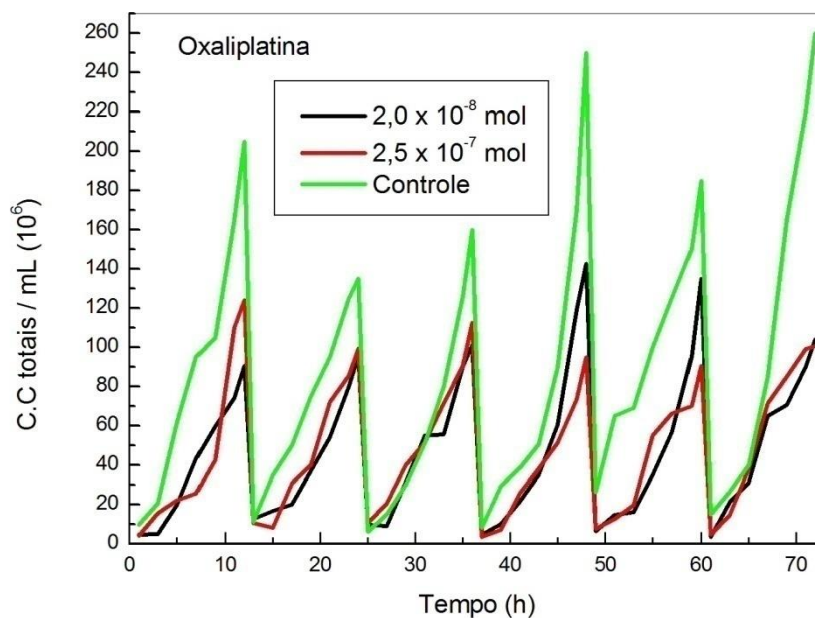
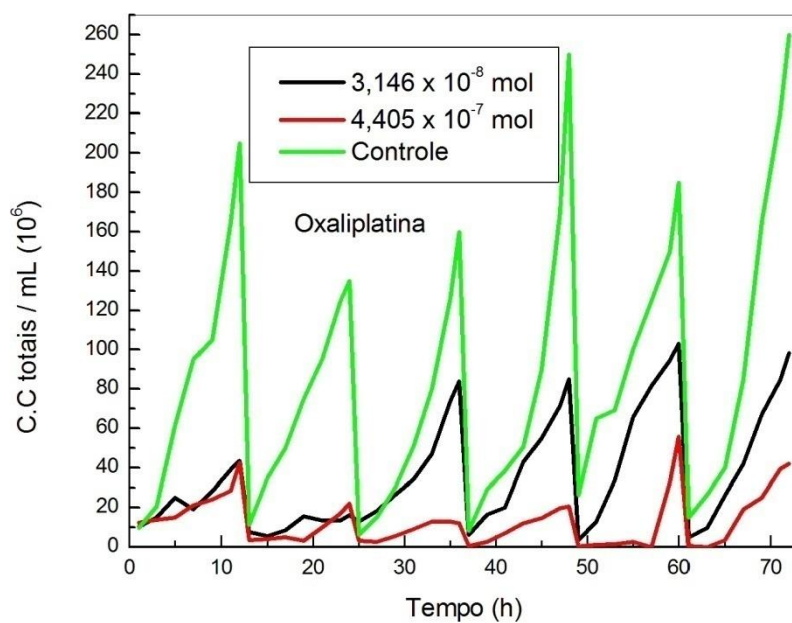


Figura 44. Contagem de células totais por tempo com $3,146$ e $4,405 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.



5.11 Estudo do comprimento das bactérias

Durante o ensaio foram feitas imagens das bactérias, como já mencionado, no intuito de obter as médias dos microrganismos na sua fase estacionária, sendo realizadas medidas ao fim de cada evento. Com esses dados também foi possível verificar a ocorrência da mitose após a bactéria adquirir resistência, quando a mesma passa a se dividir novamente.

As **Tabelas 7 – 20** trazem as médias das bactérias sob ação do medicamento e dos controles que foram usados como referência para os testes, desta forma é possível identificar/comprovar a ocorrência a ação do fármaco, como também, ver o momento em que ocorre o decaimento no tamanho das células comprovando a ocorrência da resistência.

Observa-se que no uso de cisplatina e oxaliplatina, após a resistência adquirida temos uma queda no tamanho dos filamentos, comprovando a retomada da mitose dentro do sistema biológico. Nas **Figuras 45 e 46** temos mais uma comprovação, através de imagens que mostram as mudanças provocadas na morfologia da *Z. mobilis* com a adição do antimitótico, outras imagens que foram obtidas estão dispostas no apêndice desse trabalho (APÊNDICE E e F).

Tabela 7. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com 5×10^{-8} mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,0	2,0
24	2,054	2,018
36	2,236	2,074
48	2,079	2,057

Tabela 8. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com 7×10^{-8} mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,048	2,0
24	2,076	2,018
36	2,181	2,074
48	2,061	2,057

Tabela 9. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,113	2,0
24	2,172	2,018
36	2,265	2,074
48	2,102	2,057

Tabela 10. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,269	2,0
24	2,390	2,018
36	2,342	2,074
48	2,216	2,057

Tabela 11. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,180	2,0
24	2,271	2,018
36	2,632	2,074
48	2,390	2,057

Tabela 12. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	3,072	2,493
24	3,105	2,779
36	4,010	2,188
48	2,428	2,196

Tabela 13. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	3,146	2,493
24	3,810	2,779
36	4,761	2,188
48	6,301	2,196
60	4,411	2,679

Tabela 14. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,021	2,0
24	2,250	2,018
36	2,397	2,074
48	2,295	2,057
60	2,060	2,106

Tabela 15. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,0	2,0
24	2,061	2,018
36	2,483	2,074
48	2,336	2,057

Tabela 16. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,134	2,0
24	2,373	2,018
36	2,219	2,074
48	2,352	2,057
60	2,120	2,106

Tabela 17. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,508	2,0
24	2,452	2,018
36	2,184	2,074
48	2,165	2,057

Tabela 18. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	2,483	2,0
24	2,472	2,018
36	2,374	2,074

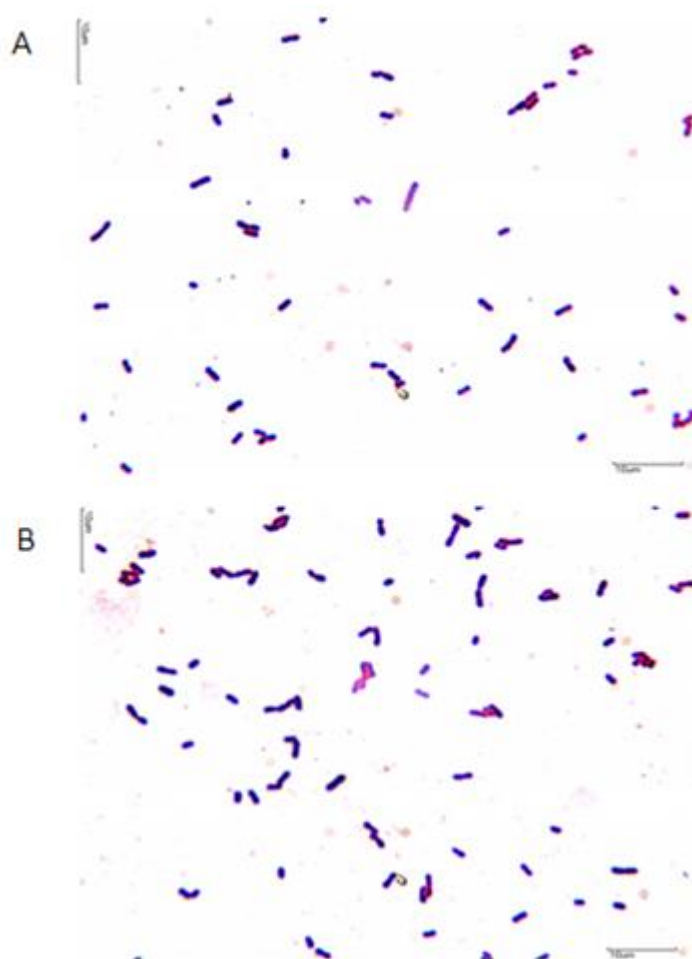
Tabela 19. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $3,146 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimitótico	Comprimento (μm) do controle
12	6,770	2,0
24	8,073	2,018
36	3,634	2,074

Tabela 20. Média de comprimento microbiano na fase estacionária para teste com $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo (h)	Comprimento (μm) com antimetabólico	Comprimento (μm) do controle
12	7,114	2,0
24	9,413	2,018
36	5,594	2,074

Figura 45. Efeito causado na morfologia das bactérias *Z. mobilis* com o uso de CDDP: A) $5,0 \times 10^{-8}$ mol, 36h; B) $7,0 \times 10^{-8}$ mol, 36h; C) $1,0 \times 10^{-7}$ mol, 36h; D) $1,5 \times 10^{-7}$, 24h; E) $1,8 \times 10^{-7}$ mol, 36h; F) $2,081 \times 10^{-7}$ mol, 36h e G) $4,163 \times 10^{-7}$ mol, 48h.



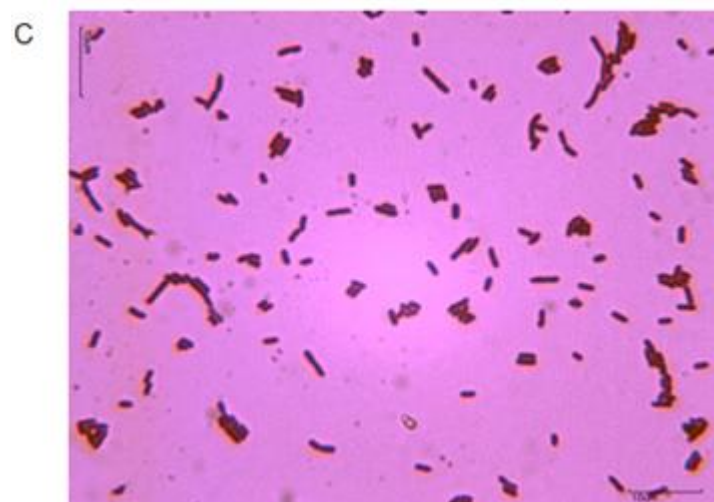
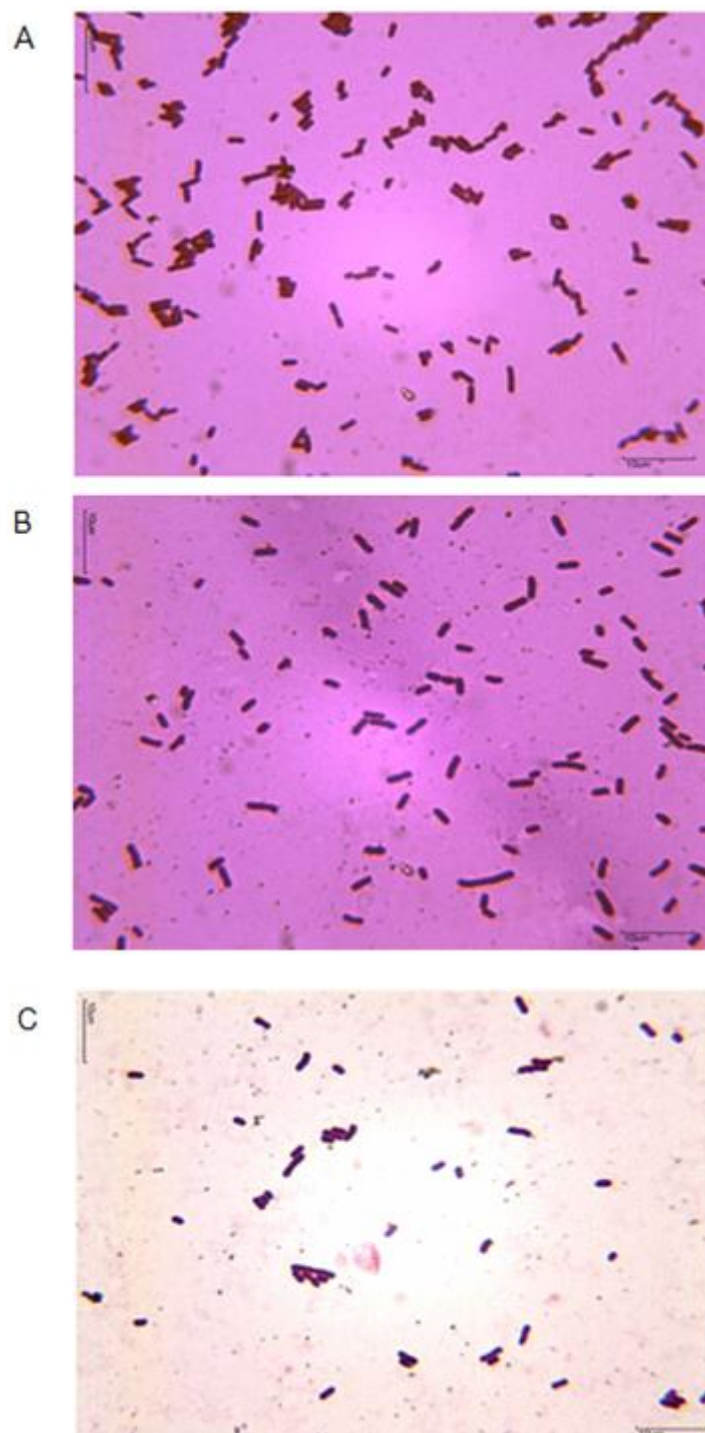
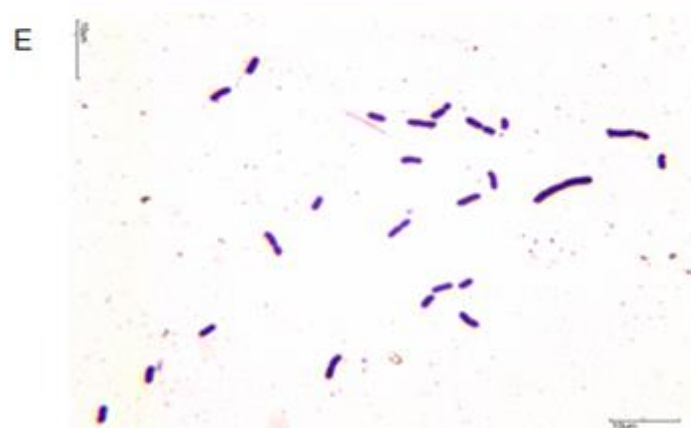




Figura 46. Efeito causado na morfologia das bactérias *Z. mobilis* com o uso de OXP: A) $5,0 \times 10^{-8}$ mol, 36h; B) $1,0 \times 10^{-7}$ mol, 36h; C) $1,3 \times 10^{-7}$ mol, 24h; D) $2,0 \times 10^{-7}$, 12h; E) $2,5 \times 10^{-7}$ mol, 12h; F) $3,146 \times 10^{-7}$ mol, 24h e G) $4,405 \times 10^{-7}$ mol, 24h.







5.12 Estudo do valor da velocidade específica de crescimento (μ)

A obtenção da μ foi realizada a partir dos dados obtidos pela curva de crescimento produzida pela *Z. mobilis*, através da regressão linear gerada pelo gráfico dos dados do logaritmo neperiano do número de células encontradas versus o tempo decorrido de cada evento, foram calculados os valores da velocidade específica de crescimento das bactéria filamentosas e não filamentosas de cada evento, esses valores estão dispostos na **Tabela 21 – 34**, de acordo com cada quantidade utilizada dos dois fármacos.

Tabela 21. Valores de μ para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,1551	0,3073
13-24h	0,2600	0,3931
25-36h	0,2629	0,2620

Tabela 22. Valores de μ para $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2663	0,1349
13-24h	0,1297	0,3740
25-36h	0,3211	0,1170

Tabela 23. Valores de μ para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2459	0,3702
13-24h	0,1084	0,3073
25-36h	0,2223	0,0402

Tabela 24. Valores de μ para $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,3148	0,3739
13-24h	0,0213	0,3127
25-36h	0,4341	0,1643

Tabela 25. Valores de μ para $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2221	0,5737
13-24h	0,1543	0,2162
25-36h	0,4409	0,2343
37-48h	0,2814	-0,0183

Tabela 26. Valores de μ para $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2726	0,4125
13-24h	0,1824	0,2494
25-36h	0,2825	0,1824
37-48h	0,3264	-0,0868

Tabela 27. Valores de μ para $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2080	0,3775
13-24h	0,1937	0,2097
25-36h	0,1595	0,1318
37-48h	0,3326	0,2249
49-60h	0,2513	0,1780

Tabela 28. Valores de μ para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,0818	0,5472
13-24h	0,1026	0,3692
25-36h	0,0579	0,3658
37-48h	0,1645	0,2823
49-60h	0,1551	-0,1556

Tabela 29. Valores de μ para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,1846	0,5638
13-24h	0,1594	0,2977
25-36h	0,3594	0,2637
37-48h	0,2406	-0,0327

Tabela 30. Valores de μ para $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2399	0,4640
13-24h	0,3831	0,1969
25-36h	0,1562	0,0476

Tabela 31. Valores de μ para $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2093	0,4960
13-24h	0,1754	0,2034
25-36h	0,3549	0,0029

Tabela 32. Valores de μ para $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,2089	0,2950
13-24h	0,2712	0,2162
25-36h	0,2925	0,0551

Tabela 33. Valores de μ para $3,146 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	0,0222	0,3872
13-24h	0,0906	0,0690
25-36h	0,2828	-0,0840

Tabela 34. Valores de μ para $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	μ (h^{-1}) célula não filamentosa	μ (h^{-1}) célula filamentosa
1-12h	-0,0556	0,4588
13-24h	0,1457	0,1676
25-36h	0,2252	0,1054

Como esperado, verifica-se que a velocidade específica de crescimento das bactérias filamentosas tendem a cair após a ocorrência do fenômeno de resistência, nas **Figuras 47 e 48**, pode-se verificar esse fenômeno com maior clareza.

Figura 47. Gráficos referentes à velocidade específica de crescimento nos diferentes eventos, para teste com o uso do antimitótico CDDP. A) $5,0 \times 10^{-8}$ mol, B) $7,0 \times 10^{-8}$ mol, C) $1,0 \times 10^{-7}$ mol, D) $1,5 \times 10^{-7}$ mol, E) $1,8 \times 10^{-7}$ mol, F) $2,081 \times 10^{-7}$ mol, G) $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

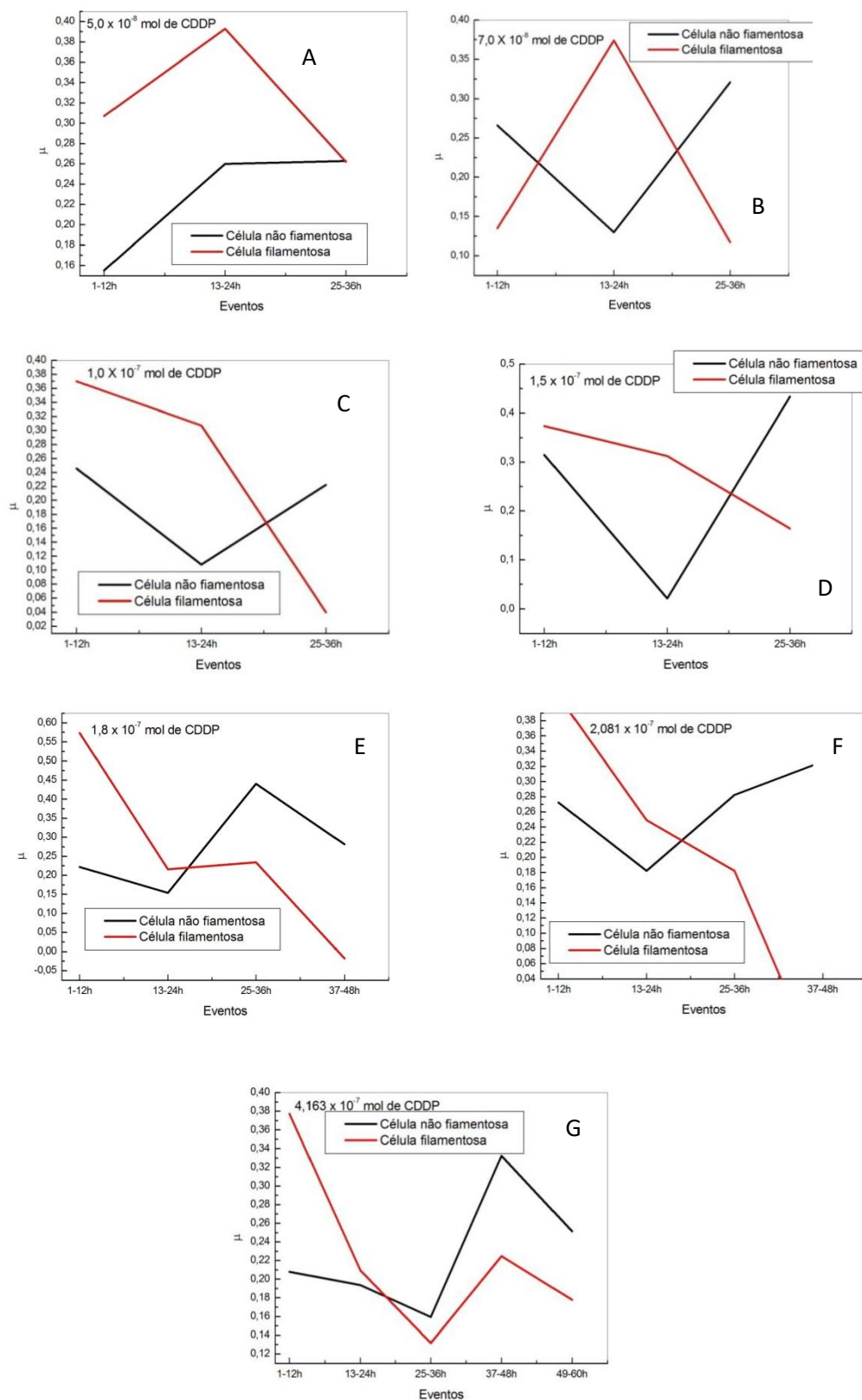
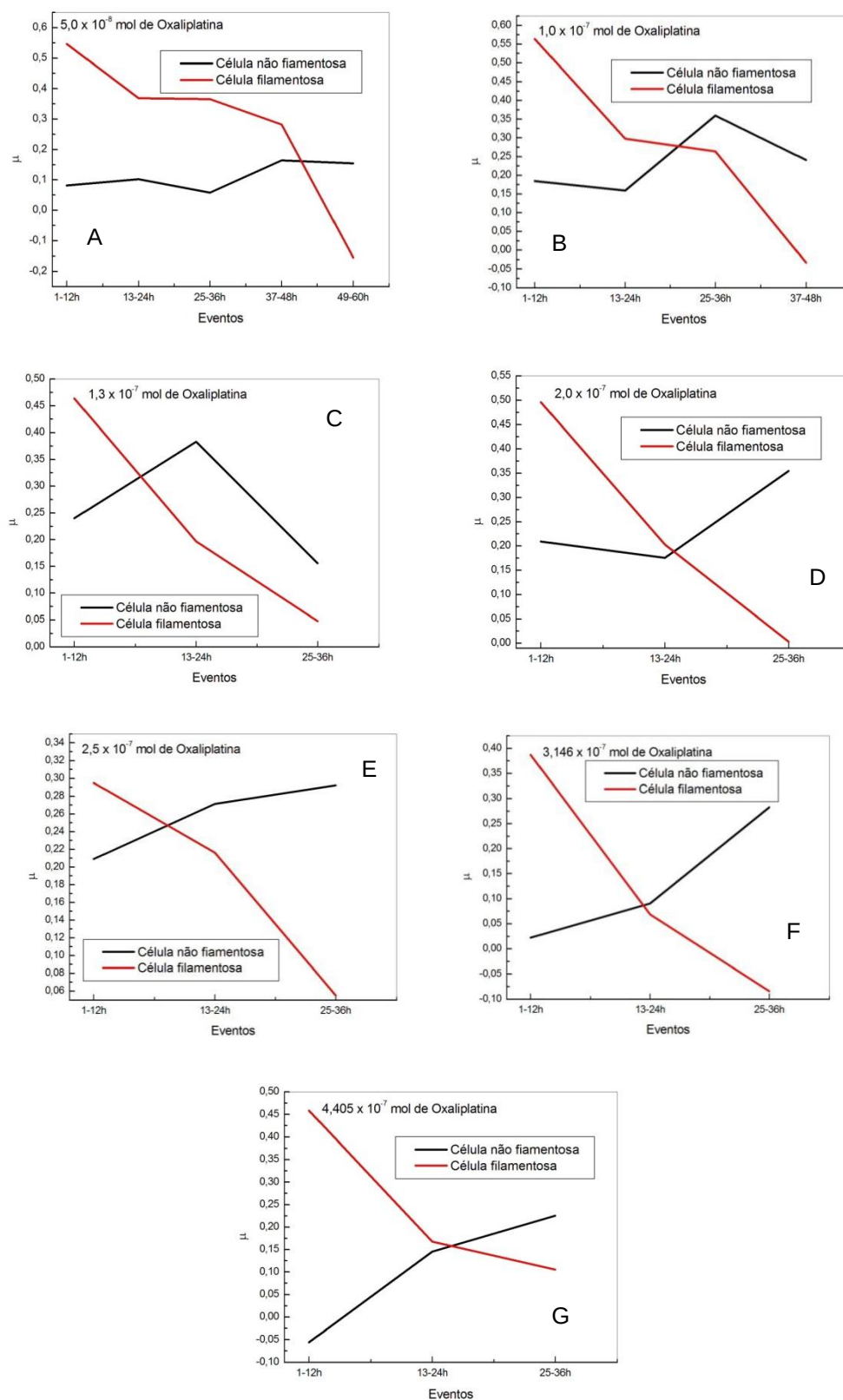


Figura 48. Gráfico referente à velocidade específica de crescimento nos diferentes eventos, para teste com o uso do antimitótico Oxaliplatina. A) $5,0 \times 10^{-8}$ mol, B) $1,0 \times 10^{-7}$ mol, C) $1,3 \times 10^{-7}$ mol, D) $2,0 \times 10^{-7}$ mol, E) $2,5 \times 10^{-7}$ mol, F) $3,146 \times 10^{-7}$ mol, G) $4,405 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.



5.13 Estudo do valor da Taxa Evolutiva (w)

O método de estudo chamado Taxa Evolutiva (w) foi desenvolvido para que em uma análise com medicamentos de função antimetabólica, possa ser reconhecida qual a melhor faixa de concentração do fármaco a ser empregada em um sistema biológico, promovendo um intervalo de segurança. Esse modelo matemático tem como principal finalidade identificar em uma análise com diferentes fármacos qual desencadeará resistência celular mais rapidamente no sistema biológico.

Essa taxa é dependente dos valores das médias totais do tamanho das células, tanto as filamentosas, ou seja, que tiveram seu impedimento de divisão celular bloqueado pela ação de antimetabólico, como das não filamentosas, que não estão sob ação do fármaco. A taxa também depende dos valores referentes ao tempo em que a resistência adquirida foi evidenciada, obtido a partir do momento em que as bactérias não filamentosas começam a ficar em maior quantidade que as filamentosas, evidenciando que as células voltaram a se dividir, quando o medicamento já não está surtindo o efeito esperado.

Esse método também depende do somatório dos valores encontrados no sistema referente à velocidade específica de crescimento, de todos os eventos que foram necessários para sua realização, e do número de mol de antimetabólico que foi introduzido no sistema. O fator presencial " α " pode ser 0 ou 1, onde zero representa que o sistema biológico não está na presença de antimetabólico; e 1 que representa efeito da ação do antimetabólico sob o sistema biológico. Com esses dados tem-se a Equação 2.

$$w = \frac{\left| \ln \left(\frac{x_1}{x_2} \right) \right|}{t} \cdot \left(\frac{\sum_{i=1}^{i=(p,i)} \mu_{nf}}{\sum_{i=1}^{i=(p,i)} \mu_f} \right)^{\alpha} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

α = fator presencial $\therefore \{\alpha = 1$ (Existe a presença de antimetabólito em contato com modelo biológico adotado); $\alpha = 0$ (Não existe a presença de antimetabólito em contato com modelo biológico adotado)}.

w = taxa evolutiva;

x_1 = característica fenotípica inicial média entre todos os valores médios de cada evento de crescimento {comprimento médio entre as médias de cada evento de crescimento das células, todos sem a presença de antimetabólito $\Leftrightarrow$ células não filamentosas};

x_2 = característica fenotípica diferencial média entre todos os valores médios de cada evento de crescimento {comprimento médio entre as médias de cada evento de crescimento das células, todos com a presença de antimetabólito $\Leftrightarrow$ células filamentosas};

t = tempo de inversão de população {células filamentosas convertendo-se às células não-filamentosas mesmo com a presença de antimetabólito};

μ = velocidade específica de crescimento, calculado a partir de um modelo

bacteriano de crescimento exponencial $N = N_0 \cdot e^{(\mu \cdot \Delta t)}$, onde: $\mu = \frac{\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{(t - t_0)}$, $\{\Delta t = (t$

- $t_0)$; N = número de células ao tempo t , N_0 = número de células ao tempo t_0 };

μ_{nf} = taxa específica de crescimento celular bacteriano (células não-filamentosas);

μ_f = taxa específica de crescimento celular bacteriano (células filamentosas);

n = número de mols de composto antimetabólico adicionado em cada etapa de crescimento do modelo bacteriano utilizado;

As **Tabelas 35 e 36** mostram os valores de w em triplicata encontrados para os diferentes números de mols utilizados nos dois fármacos, também

constam nessas tabelas o horário do tempo de inversão populacional para cada Taxa Evolutiva e o valor do desvio padrão encontrado para w . Observamos que os valores dos desvios padrões encontrados para w (representado em triplicata) foi pequeno, isso mostra que os valores de w encontrados variaram pouco, os testes apresentaram valores próximos, isso mostra a reprodutibilidade desse artifício matemático, quando empregado em uma mesma cepa bacteriológica.

Pode-se observar através das **Figuras 48 e 49**, que dentro da faixa crescente, quanto maior o número de mol utilizado maior a taxa evolutiva dos sistemas, observa-se que na CDDP a maior taxa evolutiva é de $4,712 \times 10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$, com o uso de $2,081 \times 10^{-7}$ mol, isso evidencia a melhor resposta em comparação com os demais ensaios, definindo que o sistema é mais eficaz, proporcionando um alto efeito de impedimento de divisão celular, sendo o melhor resultado encontrado por hora x mol empregado.

Quando empregados $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP, a taxa evolutiva mostra um decaimento para $2,806 \times 10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$, mostrando que a evolução do sistema é perdida quando é aumentada a concentração. Isso revela que apesar de verificar nos ensaios anteriores que a resistência adquirida para essa quantidade de antimetabólito foi maior que em $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP, o modelo matemático gera a confiança de um melhor resultado, já que, além do método de estudo através da contagem microbiana que foi usado anteriormente (obtendo o tempo de resistência), considera-se também a velocidade específica de crescimento, a média dos tamanhos das bactérias e o número de mol que foi utilizado nos ensaios.

Esse tipo de análise proporciona uma segurança ao estudo empregado no sistema biológico deste trabalho, já que cada ensaio gera nas bactérias uma reação diferente de comportamento frente à divisão celular, e essa é a melhor maneira de identificar qual concentração provoca um tempo de resistência mais tardio.

Tabela 35. Valores referentes à Taxa Evolutiva com CDDP, tempo de inversão populacional e desvio padrão.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)	Desvio padrão
0,5	1,537	31	0,07414
0,7	1,698	33	0,04133
1,0	1,771	33	0,06616
1,5	2,257	36	0,21484
1,8	2,533	37	0,12716
2,081	4,712	39	0,31011
4,163	2,806	51	0,09322

Tabela 36. Valores referentes à Taxa Evolutiva com OXP, tempo de inversão populacional e desvio padrão.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)	Desvio padrão
0,5	1,124	55	0,07076
1,0	2,038	37	0,07031
1,3	2,44	33	0,08391
2,0	2,655	33	0,15364
2,5	3,22	33	0,16901
3,146	11,647	33	0,37664
4,405	4,04	36	0,86457

Para a oxaliplatina pode-se observar um pico máximo de taxa evolutiva com o uso de $3,146 \times 10^{-7}$ mol de antimitótico, resultando em uma taxa evolutiva de

$11,647 \times 10^4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, sendo aqui a melhor resposta de tempo de resistência, como apresentado na CDDP. Também se observa o decaimento dessa taxa evolutiva para $4,404 \times 10^4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, quando se usa $4,405 \times 10^{-7}$ mol de medicamento.

Ao comparar a CDDP e a OXP verifica-se que entre os dois fármacos a oxaliplatina é a que revela uma maior faixa de trabalho, segurança no uso de faixas de concentrações, com uma taxa evolutiva máxima maior que a constatada para a CDDP. Esses resultados mostram que o sistema biológico adquire resistência mais rapidamente com o uso da cisplatina.

As tendências encontradas nos valores de W para o uso dos dois antimitóticos são vistas no apêndice deste trabalho nos três testes que foram realizados, mostrando a replicabilidade do sistema (APÊNDICE G),

Figura 49. Gráfico referente a Taxa Evolutiva com CDDP.

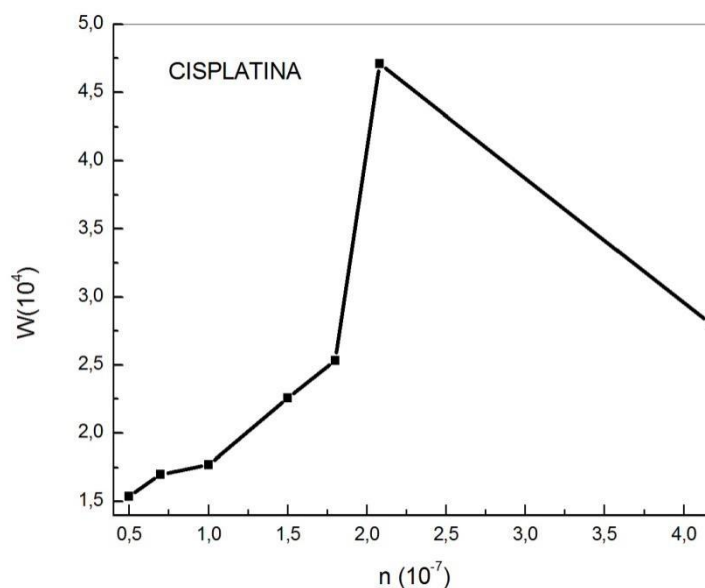
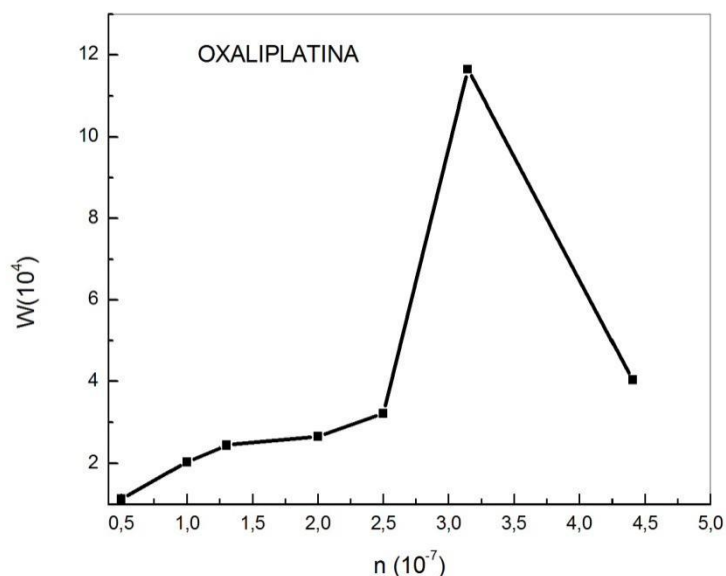


Figura 50. Gráfico referente a Taxa Evolutiva com OXP.



5.14 Estudo do Tempo de Geração (g).

Em todos os testes, tanto o controle como os que foram realizados com adição de antimitótico, obtiveram-se também os valores do tempo de geração (g), que é o tempo necessário para a bactéria (modelo biológico) duplicar o seu número de células. Partindo-se da informação que uma bactéria possui divisão binária e das informações conhecidas de suas velocidades específicas de crescimento, calculou-se o valor de (g) para todos os eventos adquiridos.

Nas **Tabelas 37 – 50** são mostrados os tempos de geração para cada concentração de fármaco utilizado. Através dos dados das tabelas é possível verificar que ao início de cada teste, quando temos uma ação de antimitótico eficiente, o tempo necessário para duplicação da população tende a aumentar para as bactérias não filamentosas, já que a maioria está sob efeito do fármaco, que impede o seu processo de divisão celular. Neste caso, a análise é de acordo com a velocidade específica de crescimento, se analisar a célula filamentosa observa-se que essa vai ter um tempo de geração menor, isso porque, temos no sistema uma maior quantidade de células ficando filamentosas caracterizando o seu surgimento em maior quantidade em um menor tempo. Dessa forma, os efeitos causados pelo medicamento em eventos

posteriores ao tempo de resistência adquirido mostram que as células filamentosas vão obtendo um tempo de geração crescente, já que o processo de divisão volta a surti efeito no sistema, em alguns casos os valores encontrados são negativos, mostrando que naquele evento a duplicação se torna inexistente com o passar do tempo.

Tabela 37. Valores de g para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	4,468	2,255
13-24h	2,665	1,763
25-36h	2,636	2,645

Tabela 38. Valores de g para $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	2,602	5,137
13-24h	5,343	1,853
25-36h	2,158	5,923

Tabela 39. Valores de g para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	2,818	1,872
13-24h	6,393	2,255
25-36h	3,117	17,239

Tabela 40. Valores de g para $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	2,201	1,853
13-24h	32,535	2,216
25-36h	1,596	4,218

Tabela 41. Valores de g para $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	3,120	1,208
13-24h	4,491	3,205
25-36h	1,572	2,958
37-48h	2,463	-37,869

Tabela 42. Valores de g para $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	2,542	1,68
13-24h	3,799	2,779
25-36h	2,453	3,799
37-48h	2,123	7,98

Tabela 43. Valores de g para $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	3,332	1,836
13-24h	3,578	3,305
25-36h	4,345	5,258
37-48h	2,083	3,081
49-60h	2,758	3,893

Tabela 44. Valores de g para $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	8,472	1,266
13-24h	6,754	1,877
25-36h	11,969	1,894
37-48h	4,213	2,455
49-60h	4,468	-4,454

Tabela 45. Valores de g para $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	3,754	1,229
13-24h	4,347	2,328
25-36h	1,928	2,628
37-48h	2,880	-21,193

Tabela 46. Valores de g para $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	2,889	1,493
13-24h	1,809	3,519
25-36h	4,437	14,559

Tabela 47. Valores de g para $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	3,311	1,397
13-24h	3,951	3,407
25-36h	1,953	238,965

Tabela 48. Valores de g para $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	3,317	2,349
13-24h	2,555	3,205
25-36h	2,369	12,577

Tabela 49. Valores de g para $3,146 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	31,216	1,790
13-24h	7,649	10,043
25-36h	2,450	-8,214

Tabela 50. Valores de g para $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	g (h) célula não filamentosa	g (h) célula filamentosa
1-12h	-12,464	1,510
13-24h	4,756	4,135
25-36h	3,077	6,575

6. CONCLUSÃO

Através do tratamento de resíduos de Platina foi possível obter os complexos hexacloroplatinato e tetracloroplatinato de potássio, assim como, a cisplatina e oxaliplatina, comprovados através dos difratogramas de Raios-X.

Dentre os estudos realizados acerca da bactéria *Z. mobilis*, foi possível observar as médias do microrganismo trabalhado (o controle), durante todos os eventos, na presença de meio SDL, esses dados promoveram um estudo comparativo entre o controle e as bactérias submetidas aos antimetabólitos.

Através de estudos morfológicos da *Z. mobilis*, visualizando o surgimento de filamentos, chegamos as melhores concentrações estoques da CDDP e OXP e através dessas, também por análise morfológica, foram obtidos os melhores valores de número de mol a serem utilizados no testes corridos para a obtenção da resistência celular.

Nos ensaios com as bactérias foi possível visualizar o surgimento de uma população filamentosa, comprovando a interferência provocada pelo fármaco, resultando no impedimento de divisão celular dessas bactérias. Também se observa que quanto maior o número de mol utilizado, mais rápida a ação do medicamento e menor o número de células totais, ou seja, maior o efeito de morte celular.

Por intermédio do estudo de contagem celular, foi possível verificar através de uma análise de baixo custo a ocorrência do fenômeno de resistência celular, o momento em que as células começam a se dividir novamente e o fármaco não exerce mais influência sobre o meio, foi visto que o uso da cisplatina resulta em uma tendência de quanto maior a quantidade de antimetabólito introduzido no sistema, mais tardio o surgimento da resistência celular. Já com a oxaliplatina não foi verificada nenhuma tendência.

A velocidade específica de crescimento das bactérias foi calculada, sendo verificada a ocorrência de decaimento dos valores após as bactérias atingirem resistência celular, sendo mais uma comprovação do término da ação do fármaco. Os valores do tempo de geração das bactérias filamentosas são crescentes após a resistência adquirida, alguns chegam a ter valores de tempo negativos, mostrando que não existe uma duplicação de população significativa.

A taxa evolutiva foi um modelo matemático desenvolvido neste trabalho, que provou ser uma ótima metodologia a ser empregada em estudos que envolvem o uso de antimitóticos. As melhores respostas foram de $4,712 \times 10^4 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ para a CDDP e $11,647 \times 10^4 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ de OXP, mostrou obter uma variável de valores pequena, vista nos dados encontrados para os desvios padrões. Esse artifício proporcionou o entendimento da melhor faixa de concentração de trabalho, onde não exista uma mortalidade celular alta, bem como, tenha um tempo de resistência mais tardio, provocando assim, uma melhor resposta ao tratamento.

Esse estudo mostrou que a melhor faixa de trabalho encontrada foi com o uso da OXP, por ter uma taxa evolutiva maior que a CDDP, adquirindo uma resistência posterior.

A metodologia desenvolvida foi capaz de exibir a resistência causada nas células da bactéria *Z. mobilis* através da sua avaliação cronológica, mostrando ser possível a sua aplicação para o diagnóstico do surgimento do fenômeno MDR frente a diversos quimioterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D., HAMBLEY, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 5, p. 728-734, 2006.

ALVES, A. E.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Metais do grupo da platina: História, propriedades e aplicações. **Química** **119**, 2010.

AMBUDKAR, S. V.; SARFATY, C. K.; SAUNA, Z. E. GOTTESMAN, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, p. 7468–7485, 2003.

BAGULEY, B. C.; MARSHALL, E. S. The use of human tumour cell lines in the discovery of new cancer chemotherapeutic drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n.2, p. 153-161, 2008.

BOLHUIS, H.; VAN VEEN, H. W.; POOLMAN, B. A. J. M.; DRIESSEN, W. N. K. Mechanisms of multidrug transporters. **FEMS Microbiol Rev**, n. 21, p. 55-84, 1997.

BOULIKAS, T.; PANTOS, P.; BELLIS, E.; CHRISTOFIS, P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy**, v. 5, p. 537–83, 2007.

CHUNG-PU, W; HSIEH, C,H; WU, Y,S. The Emergence of Drug Transporter Mediated Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy. **Mol. Pharmaceutics**, v.8, p. 1996–2011, 2011.

COLE, S.P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.; DEELEY,

R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v.258, p. 1650-1654, 1992.

COLE, S. P. C. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. **The journal of biological chemistry** . V. 289, N. 45, p. 30880 –30888, 2014.

COLEY, H. M. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. **EJC SUPPLEMENTS** 7, N. 1, P. 3-7, 2009.

CUNNINGHAM, D.; STARLING, N.; RAO, S.; IVESON, T.; NICOLSON, M.; COXON, F.; MIDDLETON, G.; DANIEL, F.; OATES, J.; NORMAN, A. R. Capecitabine and Oxaliplatin for Advanced Esophagogastric Cancer. **The new england journal of medicine**, v. 358, p. 36–46, 2008.

CRUL, M.; VAN WAARDENBURG, R. C. A. M.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. DNA-based drug interactions of cisplatin. **CANCER TREATMENT REVIEWS**, v. 28, n. 6, p. 291–303, 2002.

DHARA, S. C. INDIAN J. **CHEM.** 1970, 8, 193–134.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n 03, p. 134-138, 2018.

DI FRANCESCO, A. M.; RUGGIERO, A.; RICCARDI, R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. **Cell. Mol. Life Sci.** v.59, p.1914–1927, 2002.

FALCÃO DE MORAIS, J. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, n. 1/2, p. 169-182, 1982.

FRAUMENI, J. F. Jr. Cancer Precursors: Epidemiology, Detection, and Prevention; Ed. Springer, 2001.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C. PÉREZ, J. M. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. **Chemical Reviews**, V. 103, N. 3, 2003.

GOODMAN, A. E.; ROGERS, P. L.; SKOTNICKI, M. L. Minimal Medium for Isolation of Auxotrophic *Zymomonas* Mutants. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 2, p. 496-498, 1982.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu. Rev. Biochem**, v. 62, p. 385–427, 1993.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; Bates, S. E. MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER: ROLE OF ATP-DEPENDENT TRANSPORTERS. **NATURE REVIEWS**, V. 2, 2002.

GUERRA, A. F. **Microbiologia Geral**: Fatores do crescimento microbiano. 1^a ed. Valença, p.13, 2016.

GUERRA, A. F. **Microbiologia de Alimentos**: Métodos de contagem microbiana. 1^a ed. Valença, p. 28, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HELLEMAN, J.; BURGER, K.; HAMELERS, I. H. L.; BOERSMA, A. W. M. BOERSMA; KROON, A. I. P. M.; STOTER, G.; NOOTER, K. Impaired cisplatin influx in an A2780 mutant cell line: Evidence for a putative, cis-configuration-specific, platinum influx transporter. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 8, p. 943–949, 2006.

HULS, M.; RUSSEL, F. G. M.; MASEREEUW, R. The Role of ATP Binding Cassette Transporters in Tissue Defense and Organ Regeneration. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 328, n. 1 p. 3-9, 2009.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2017.

<https://www.inca.gov.br/noticias/duas-decadas-de-dia-mundial-do-cancer-e-estimativa-2020-marcam-o-4-de-fevereiro-no-inca> – Acessado em Janeiro de 2020.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem. Ver**, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

JULIANO, R. L.; LING, V. A Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152–162, 1976.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct Cellular Responses to Platinum- Induced DNA Damage. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 1337-1358, 2007.

KAUFFMAN, G. B.; COWAN, D. O. Potassium tetrachloroplatinate (II). **Inorganic Synthesis**, v. 7, p. 240, 1963.

KAUFFMAN, G. B.; PENTIMALLI, R.; DOLDI, S.; HALL, M. D. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. **Platinum Metals Rev**, v. 54, n. 4, p. 250–256, 2010.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature**, v. 7, p. 573-584, 2007.

KIDANI, Y.; INAGAKI, K. Antitumor Activity of 1,2-Diaminocyclohexane-Platinum Complexes against Sarcoma-180 Ascites Form. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 12, 1978.

LIMA JÚNIOR, R. N.;;* ABREU, F. O. M. S. Produtos Naturais Utilizados como Coagulantes e Floculantes para Tratamento de Águas: Uma Revisão sobre Benefícios e Potencialidades. **Rev. Virtual Quim**, v. 10, n. 03, 2018.

LIU, Y.; YIN T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; GUY BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.; OYEN, R.; NI, Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quant Imaging Med Surg**, p. 1–22, 2015.

LOEHRER, P. J.; EINHORN, L. H. Drugs five years later. Cisplatin. **Annals of Internal Medicine**, v.100, p.704-713, 1984.

LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3145–3167, 2008.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, A. A. **Microbiologia de Brock. Tradução: Alice Freitas Versiani et al.** 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARIN, J. J. G.; BRIZ, O.; MACIAS, G. R.; MARTÍN, J. L.; MACIAS, R. I. R. Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. **Elsevier Ltd**, v. 30, p. 55–64, 2016.

MEADS, M. B.; HAZLEHURST, L. A.; DALTON, W. S. The Bone Marrow Microenvironment as aTumor Sanctuary and Contributor to Drug Resistance. **Clin Cancer Res**, v. 14 p. 2518-2526, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do câncer**: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 2ª Edição. Rio de Janeiro, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do câncer**: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 3ª Edição. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia**: bases clínicas do tratamento. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NATILE, G.; COLUCCIA, M. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 216, p. 383–410, 2001.

PANG, S. K.; YU, C. W.; YEUNG, A. S. C. F.; HO, Y. P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 363, N.1, P. 235–240, 2007.

PASETTO, L. M.; D'ANDREA, M. R.; ROSARIO, M.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. The development of platinum compounds and their possible combination. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 60, n. 1, p 59–75, 2006.

PENDYALA, L.; KIDANI, R.; PEREZ, R.; WILKES, J.; BEMACKI, R. J.; CREAVER, P. J. Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers. **Cancer Letters**, n. 97, p. 177–184, 1995.

REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**. N. 85, P. 1219–1226, 2013.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

ROSENBERG, B.; RENSHAW, E.; VANCAMP, L.; HARTWICK, J.; DROBNIK, J. Platinum-Induced Filamentous Growth in *Escherichia coli*. **American Society for Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 716-721, 1967.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, v. 30, p. 1799-1802, 1970.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, 2ed. Edgard Blücher LTDA: São Paulo, 2001.

SCOTTO, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. **Oncogene**, N.22, P. 7496–7511, 2003.

SIDDIK, H. Z.; AL-BAKER, S.; BURDITT, T. L.; KHOKHAR, A. R. Differential antitumor activity and toxicity of isomeric 1,2-diaminocyclohexane platinum (II) complexes. **J Cancer Res Clin Onco**, v. 120, p. 12–16, 1993.

SUGERMAN, D. T. Chemotherapy. **JAMA**, v. 310, n. 02, 2013.

SWINGS, J. & DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 1-46, 1977.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. O. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Artmed; 2005.

TURCO, M. C.; ROMANO, M. F.; PETRELLA, A.; BISOGNI, R.; TASSONE, P.; VENUTA, S. NF- κ B/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. **Leukemia**, v. 18, p. 11–17, 2004.

ULLAH, K.; , SOHAIL, M.; MANNAN, A.; RASHID, H.; SHAH, A.; MURTAZA, G.; ALI KHAN, S. A. Facile Synthesis of Chitosan Based-(AMPS-co-AA) Semi-IPNs as a Potential Drug Carrier: Enzymatic Degradation, Cytotoxicity, and Preliminary Safety Evaluation. **Current Drug Delivery**, v. 16, p. 242–253, 2019.

VOGELSTEIN, B., & KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 4, p. 138–141, 1993.

WARAD, I.; EFTAIHA, A. F.; AL-NURI, M. A.; HUSEIN, A. I.; ASSAL, M.; ABU-OBAID, A.; AL-ZAQRI, N.; HADDA, T. B.; HAMMOUTI, B. Metal ions as Antitumor Complexes-Review. **J. Mater. Environ. Sci**, v. 4, n. 4, p. 542–557, 2013.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R.; The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton transactions**, v. 39, n. 35, p. 8097–8340, 2010.

WHO (World Health Organization). **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 15 de junho de 2018.

YUSPA, S. H.; POIRIER, M. C. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. **Advances in cancer research**, v. 50, 1998.

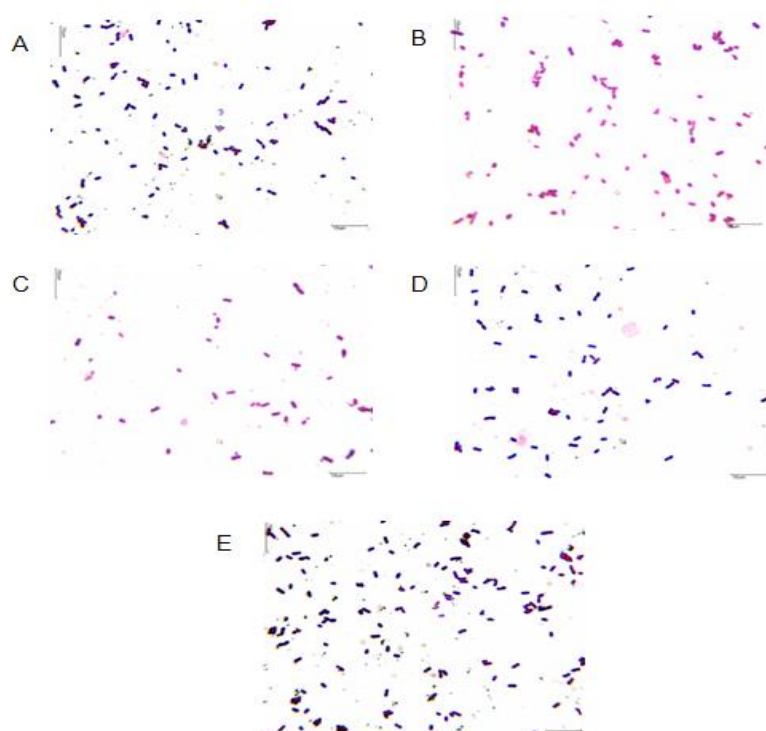
YUSPA, S. H. Overview of carcinogenesis: past, present and future. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 03, p. 341–344, 2000.

APÊNDICE A – TABELA DE MÉDIA DE COMPRIMENTO MICROBIANO PARA O SEGUNDO CONTROLE UTILIZADO E SUAS IMAGENS

Média do comprimento microbiano do segundo controle na fase estacionária sem adição de agente antimicrobiano.

Tempo (h)	Comprimento (μm)
12	2,0
24	2,018
36	2,074
48	2,057
60	2,106
72	2,089
Média (12-72)	2,057

Controle: morfologia das bactérias *Z. mobilis* sem agente antimicrobiano, imagens com: A) 12h, B) 24h, C) 36h, D) 60 e E) 72h de evento.



**APÊNDICE B – TABELAS REFERENTES ÀS CONTAGENS MICROBIANAS
DOS TESTES COM ADIÇÃO DOS ANTIMITÓTICOS AO SISTEMA**

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	13,0	1,0	14,0
3	16,5	0,5	17,0
5	16,5	3,0	19,5
7	19,5	2,0	21,0
9	55,0	11,0	65,0
11	50,0	17,0	67,0
12	65,0	13,5	78,5
13	5,0	1,5	6,5
15	16,0	1,0	17,0
17	15,0	4,5	19,5
19	25,0	7,5	32,5
21	55,0	20,0	75,0
23	80,0	45,0	125,0
24	110,0	77,0	187,0
25	4,0	2,0	6,0
27	12,5	14,0	26,5
29	10,0	22,0	32,0
31	45,0	30,0	75,0
33	65,0	35,00	100,0

35	60,0	55,0	115,0
36	75,0	68,0	143,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	6,0	1,5	7,5
3	5,5	1,0	6,5
5	13,0	1,0	14,0
7	20,0	3,5	23,5
9	26,0	4,0	30,0
11	70,0	3,0	70,0
12	100,0	5,0	105,0
13	12,0	1,0	13,0
15	20,5	2,0	22,5
17	20,0	5,0	25,0
19	30,0	10,0	40,0
21	27,5	17,5	45,0
23	50,0	38,0	88,0
24	60,0	70,0	130,0
25	1,5	4,0	5,5
27	10,0	17,5	27,5
29	19,0	31,0	50,0
31	26,0	34,0	60,0
33	50,0	45,5	95,5
35	70,0	23,5	93,5
36	82,0	20,5	102,5

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	8,5	0,5	9,0
3	8,5	0	8,5
5	11,0	0,5	11,5
7	15,0	3,0	18,0
9	28,0	11,0	39,0
11	65,0	25,0	90,0
12	135,0	10,0	145,0
13	5,0	2,0	7,0
15	10,0	1,0	11,0
17	13,0	5,0	18,0
19	15,0	10,0	25,0
21	12,0	10,0	22,0
23	17,0	28,0	45,0
24	25,0	40,0	65,0
25	1,0	5,0	6,0
27	7,0	10,0	17,0
29	15,0	25,0	40,0
31	16,0	44,0	60,0
33	42,0	20,0	62,0
35	55,0	10,0	65,0
36	45,0	10,0	55,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	3,0	0	3,0
3	5,5	0,5	6,0
5	11,0	1,0	12,0
7	15,5	1,5	17,0
9	30,0	6,0	36,0
11	70,0	10,0	80,0
12	105,0	12,0	117,0
13	4,0	1,0	5,0
15	10,5	6,5	17,0
17	13,0	12,5	25,5
19	10,0	30,0	40,0
21	4,5	17,5	22,0
23	10,0	45,0	55,0
24	8,5	60,0	68,5
25	1,5	7,5	9,0
27	0,5	19,5	20,0
29	3,5	25,0	28,5
31	10,0	47,5	57,5
33	24,0	50,0	74,0
35	55,0	65,0	120,0
36	73,0	45,0	118,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	4,5	0	4,5
3	8,5	0,5	9,0
5	19,0	0,5	19,5
7	25,0	2,0	27,0
9	21,5	13,0	34,5
11	45,0	25,5	70,5
12	74,0	58,0	132,0
13	3,0	7,5	10,5
15	0,5	6,5	7,0
17	15,0	19,0	34,0
19	5,0	25,5	35,5
21	13,5	30,0	43,5
23	9,5	45,0	54,5
24	6,0	83,8	89,8
25	1,0	5,0	6,0
27	1,5	15,0	16,5
29	2,0	35,0	37,0
31	5,0	60,0	65,0
33	29,5	80,5	110,0
35	42,0	79,5	121,5
36	50,0	72,0	122,0
37	2,5	1,5	4,0
39	5,0	1,5	6,5

41	15,0	3,5	18,5
43	30,0	0,5	30,5
45	45,0	0	45,0
47	40,0	2,5	42,5
48	60,0	1,0	61,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	3,0	0,45	3,45
3	2,5	1,5	4,0
5	12,0	4,5	16,5
7	23,5	10,0	33,5
9	31,0	18,0	49,0
11	39,5	36,5	76,0
12	40,5	47,5	88,0
13	2,0	3,5	5,5
15	6,5	11,5	18,0
17	12,0	18,0	20,0
19	13,5	29,0	42,5
21	13,0	45,0	58,0
23	18,0	57,5	75,5
24	24,5	70,15	94,65
25	1,5	5,0	6,5
27	5,5	16,5	22,0
29	18,0	34,5	52,5
31	20,0	39,5	59,5
33	30,6	42,0	62,6
35	42,5	47,5	90,0
36	44,5	55,8	100,3
37	2,5	4,7	7,2
39	9,5	6,9	16,4

41	22,5	10,0	32,5
43	42,5	6,5	49,0
45	68,6	5,0	73,6
47	94,0	4,5	98,5
48	113,5	1,5	115,0
-			

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $4,163 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	3,0	0,5	3,5
3	5,0	3,0	8,0
5	9,0	5,5	14,5
7	21,5	17,5	39,0
9	24,0	25,5	59,5
11	21,5	30,5	52,0
12	31,5	48,0	79,5
13	2,5	4,0	6,5
15	8,4	12,5	20,9
17	7,5	13,5	21,0
19	14,0	20,4	34,4
21	12,5	38,5	51,0
23	23,5	34,5	58,0
24	33,0	58,5	91,5
25	0,5	1,5	2,0
27	1,0	2,5	3,5
29	2,5	3,5	6,0
31	2,0	5,0	7,0
33	3,5	4,5	8,0
35	4,5	4,5	9,0
36	2,5	10,0	12,5
37	1,0	3,0	4,0
39	2,0	9,5	11,5
41	2,2	24,0	26,2
43	10,5	30,5	41,0

45	17,0	41,0	58,0
47	23,0	51,0	74,0
48	35,0	40,0	75,0
49	3,0	5,5	8,5
51	12,5	8,0	20,5
53	40,0	15,0	35,0
55	49,5	14,5	64,0
57	55,0	25,0	80,0
59	67,5	34,0	101,5
60	69,0	41,0	110,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	7,5	0	7,5
3	10,5	0	10,5
5	13,0	0	13,0
7	19,5	1,5	21,0
9	15,0	5,0	20,0
11	50,0	12,0	62,0
12	75,0	25,5	110,5
13	4,5	0,5	5,0
15	13,0	3,0	16,0
17	13,5	5,0	18,5
19	32,0	18,0	50,0
21	45,0	30,0	75,0
23	55,0	32,5	87,5
24	73,5	35,0	108,5
25	10,0	0,5	10,5
27	20,0	10,0	30,0
29	45,0	6,0	51,0
31	40,0	20,0	60,0
33	56,0	35,0	91,0

35	58,0	42,0	100,0
36	45,0	65,5	110,5
37	1,0	2,0	3,0
39	0,5	10,0	10,5
41	11,5	22,0	33,5
43	25,0	35,0	60,0
45	33,0	45,0	78,0
47	40,0	55,0	95,0
48	65,0	70,5	135,5
49	3,0	3,5	6,5
51	4,5	5,5	10,0
53	7,0	7,5	14,5
55	28,0	12,0	40,0
57	55,0	0,5	55,5
59	90,0	0	90,0
60	110,0	0	110,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	6,5	0	6,5
3	10,5	0	10,5
5	12,5	0,5	13,0
7	20,0	2,0	22,0
9	26,5	9,0	35,5
11	40,0	25,0	65,0
12	55,0	20,0	75,0
13	5,5	1,0	6,5
15	10,0	5,5	15,5
17	15,0	21,0	36,0
19	7,5	67,0	74,5
21	12,0	90,0	102,0
23	35,0	80,0	115,0
24	45,5	104,0	149,5
25	1,5	5,0	6,5
27	2,0	8,0	10,0
29	1,0	15,0	16,0
31	13,0	30,5	43,5
33	15,0	48,0	63,0

35	37,0	80,0	117,0
36	50,5	74,0	124,5
37	8,0	0	8,0
39	28,0	1,5	29,5
41	25,0	0	25,0
43	75,0	5,0	80,0
45	85,0	5,0	90,0
47	115,0	2,0	117,0
48	142,0	1,0	143,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $1,3 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	4,0	0	4,0
3	4,5	1,0	5,5
5	10,0	1,5	11,5
7	22,5	7,5	30,0
9	50,0	20,0	70,0
11	40,0	35,0	75,0
12	35,0	50,0	85,0
13	2,5	7,0	9,5
15	0,4	14,5	14,9
17	3,0	30,5	33,5
19	15,0	50,0	65,0
21	20,5	45,0	65,5
23	40,0	66,0	106,0
24	52,5	70,0	122,5
25	3,0	9,0	12,0
27	7,0	10,0	17,0
29	6,5	15,0	21,5
31	20,0	25,0	45,0
33	32,5	20,5	53,0

35	45,0	22,0	67,0
36	90,0	10,0	100,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $2,0 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	4,5	0	4,5
3	4,5	0,5	5,0
5	16,5	3,0	19,5
7	28,0	15,0	43,0
9	35,5	24,0	59,5
11	30,0	44,0	74,0
12	38,0	52,5	90,5
13	4,5	8,0	12,5
15	7,0	9,5	16,5
17	5,5	14,5	20,0
19	9,0	28,0	37,0
21	16,0	38,0	54,0
23	25,0	55,0	80,0
24	30,5	65,0	95,5
25	2,0	7,5	9,5
27	4,0	5,0	9,0
29	10,0	21,5	31,5
31	22,5	32,5	55,0
33	32,0	23,5	55,5

35	78,0	12,0	90,0
36	97,5	3,5	101,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $2,5 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	4,0	0	4,0
3	10,5	5,5	15,5
5	12,5	9,5	22,0
7	14,5	11,0	25,5
9	25,0	17,5	42,5
11	50,0	60,0	110,0
12	44,0	80,0	124,0
13	3,0	7,5	10,5
15	2,0	6,0	8,0
17	10,0	20,5	30,5
19	15,0	25,0	40,0
21	27,0	45,0	72,0
23	35,5	50,0	85,5
24	36,5	63,0	99,5
25	3,0	7,5	10,5
27	9,0	11,5	20,5
29	15,0	25,0	40,0
31	22,0	29,5	51,5
33	40,0	31,5	71,5

35	64,0	26,5	90,5
36	103,5	9,0	112,5

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $3,146 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	9,4	0,75	10,15
3	14,5	0,3	14,8
5	17,5	7,5	25,0
7	14,5	4,5	19,0
9	12,0	16,0	28,0
11	15,5	23,5	39,0
12	15,0	28,5	43,5
13	0	7,5	7,5
15	1,5	4,0	5,5
17	2,5	6,0	8,5
19	4,0	11,5	15,5
21	4,0	9,5	13,5
23	2,5	11,0	13,5
24	5,0	11,0	16,0
25	5,5	7,5	13,0
27	4,0	14,0	18,0
29	8,0	18,5	26,5
31	10,0	24,0	34,0
33	32,0	15,0	47,0

35	65,0	9,0	74,0
36	82,0	2,0	84,0

Contagem microbiana com destaque para a visualização do tempo de resistência para teste com $4,405 \times 10^{-7}$ mol de OXP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
1	12,1	0,25	12,35
3	13,5	0,3	13,8
5	5,5	9,5	15,0
7	8,5	12,5	21,0
9	5,0	19,0	24,0
11	6,5	22,0	28,5
12	8,0	34,5	42,5
13	0	3,5	3,5
15	0,5	3,5	4,0
17	0,5	4,5	5,0
19	0,5	3,0	3,0
21	1,0	9,5	10,0
23	1,5	15,5	17,0
24	1,5	20,5	22,0
25	1,15	2,05	3,20
27	0,44	2,25	2,69
29	2,6	2,85	5,45
31	3,5	5,5	9,0
33	6,0	7,0	13,0

35	6,5	6,5	13,0
36	7,5	4,5	12,0

**APÊNDICE C – TABELAS DE CONTINUAÇÃO DOS TESTES COM
ANTIMITÓTICO – COMPROVAÇÃO DE NÃO INVERSÃO DE POPULAÇÃO
APÓS ADQUIRIDOS TEMPOS DE RESISTÊNCIA**

Contagem microbiana para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	3,5	2,0	5,5
39	6,5	2,0	8,5
41	15,0	4,0	19,0
43	25,0	3,5	28,5
45	55,0	1,0	56,0
47	75,0	1,5	76,5
48	134,0	1,0	135,0
49	7,0	0,5	7,5
51	12,5	1,0	13,5
53	20,5	2,5	23,0
55	60,0	2,0	62,0
57	70,0	1,0	71,0
59	105,0	1,5	106,5
60	120,0	1,0	121,0
61	10,5	0	10,5
63	22,5	0,5	23,0
65	40,0	0	40,0
67	85,0	0	85,0

69	100,0	0	100,0
71	130,0	0	130,0
72	165,0	0	165,0

Contagem microbiana para teste com $7,0 \times 10^{-8}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	9,5	0,5	10,0
39	14,0	0,5	14,5
41	25,0	0	25,0
43	35,0	0	35,0
45	50,0	0	50,0
47	86,0	5,0	91,0
48	115,0	5,5	120,5
49	8,5	1,5	10,0
51	12,5	2,0	14,5
53	35,0	3,0	38,0
55	72,0	3,5	75,5
57	90,5	3,0	93,5
59	115,0	2,0	117,0
60	117,0	0,5	117,5
61	6,0	0	6,0
63	28,0	0,5	28,5
65	44,5	0	44,5
67	69,5	0	69,5
69	99,0	0,5	99,5
71	132,0	0	132,0

72

149,0

0

149,0

Contagem microbiana para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	3,0	0,5	3,5
39	3,0	0,5	3,5
41	10,0	0	10,0
43	20,0	0	20,0
45	65,0	1,5	66,5
47	85,0	2,5	87,5
48	102,0	1,5	103,5
49	4,0	0,5	4,5
51	9,5	2,0	11,5
53	13,0	1,0	14,0
55	35,0	0	35,0
57	50,5	1,5	52,0
59	88,0	0,5	88,5
60	92,0	0	92,0
61	2,0	0	2,0
63	13,0	0	13,0
65	22,5	0	22,5
67	53,0	1,0	54,0
69	85,0	0,5	85,5
71	120,0	0	120,0

72

137,0

0

137,0

Contagem microbiana para teste com $1,5 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	4,5	2,5	7,0
39	21,0	3,5	24,5
41	37,0	1,5	39,5
43	49,5	0	49,5
45	55,5	0,5	56,0
47	75,0	0	75,0
48	88,0	0	88,0
49	6,0	0	6,0
51	19,0	0,5	19,5
53	32,0	0,5	32,5
55	55,0	0	55,0
57	83,0	1,0	84,0
59	105,0	0	105,0
60	108,0	0	108,0
61	6,5	0	6,5
63	14,0	0,5	14,5
65	33,5	0	33,5
67	59,0	1,0	60,0
69	90,0	0	90,0
71	122,0	0	122,0

72

125,0

0,5

125,5

Contagem microbiana para teste com $1,8 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
49	7,5	0	7,5
51	14,0	0	14,0
53	32,5	0,5	33,0
55	59,0	0,5	59,5
57	70,0	0	70,0
59	89,0	0	89,0
60	100,0	0	100,0
61	11,5	0	11,5
63	23,5	0,5	24,0
65	48,5	0	48,5
67	65,0	0,5	65,5
69	82,0	1,0	83,0
71	114,0	0	114,0
72	119,0	0	119,0

Contagem microbiana para teste com $2,081 \times 10^{-7}$ mol de CDDP.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
49	4,0	0,1	4,1
51	17,0	0,5	17,0
53	29,5	1,5	31,0
55	66,5	1,0	67,5
57	87,5	2,0	89,5
59	113,0	2,0	115,0
60	120,0	1,5	121,5

Contagem microbiana para teste com $5,0 \times 10^{-8}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
61	10,5	0	10,5
63	25,5	0,5	26,0
65	50,0	0	50,0
67	85,0	1,0	86,0
69	125,0	0	125,0
71	144,0	0	144,0
72	160,0	0,5	160,5

Contagem microbiana para teste com $1,0 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
49	7,5	0	7,5
51	8,5	0,5	9,0
53	18,5	1,5	20,0
55	10,0	0	10,0
57	42,0	0	42,0
59	55,0	5,0	60,0
60	105,0	0,5	105,5
61	13,0	0	13,0
63	26,5	0	26,5
65	42,0	0	42,0
67	65,0	1,5	66,5
69	90,0	0	90,0
71	126,0	0	126,0
72	138,0	0	138,0

Contagem microbiana para teste com $1,3 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	10,5	0,5	11,0
39	21,5	0	21,5
41	40,0	3,5	43,5
43	42,5	7,0	49,5
45	65,0	4,0	69,0
47	80,0	1,0	81,0
48	105,0	0	105,0
49	5,5	0,5	6,0
51	17,0	2,5	19,5
53	18,0	0,5	18,5
55	25,0	0	25,0
57	30,0	0	30,0
59	50,0	1,5	51,5
60	75,0	0	75,0
61	7,0	0	7,0
63	11,0	1,0	12,0
65	15,5	0	15,5
67	30,0	0,5	30,5
69	67,5	0	67,5
71	85,0	1,0	86,0

72

110,0

0

110,0

Contagem microbiana para teste com $2,0 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	4,0	0,5	4,5
39	9,5	0,5	10,0
41	20,0	1,5	21,5
43	35,0	0	35,0
45	60,0	0,5	60,5
47	115,0	4,0	119,0
48	140,0	2,5	142,5
49	6,0	0,5	6,5
51	12,5	2,0	14,5
53	15,0	1,0	16,0
55	35,0	0	35,0
57	55,0	1,5	56,5
59	95,0	0	95,0
60	135,0	0	135,0
61	3,5	0	3,5
63	20,5	0,5	21,0
65	31,0	0	31,0
67	65,0	0	65,0
69	70,0	0,5	70,5
71	90,0	0	90,0

72

104,0

0

104,0

Contagem microbiana o para teste com $2,5 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatia.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	3,5	0	3,5
39	7,0	0	7,0
41	25,0	0,5	25,5
43	36,0	2,0	38,0
45	50,0	1,5	51,5
47	72,0	1,5	73,5
48	95,0	0	95,0
49	7,0	0,5	7,5
51	10,0	2,5	12,5
53	19,0	0,5	19,5
55	55	0	55,0
57	65,0	1,0	66,0
59	70,0	0	70,0
60	90,0	0,5	90,5
61	4,5	0	4,5
63	14,5	0	14,5
65	38,0	0	38,0
67	70,0	1,5	71,5
69	85,0	0	85,0
71	98,0	1,0	99,0

72

100,5

0

100,5

Contagem microbiana para teste com $3,146 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	6,0	0	6,0
39	16,0	0,5	16,5
41	20,0	0	20,0
43	42,0	1,0	43,0
45	53,0	2,0	55,0
47	69,0	2,5	71,5
48	82,5	2,5	85,0
49	3,5	0,05	3,55
51	12,0	1,0	13,0
53	33,0	0,5	33,5
55	64,5	1,0	65,5
57	81,5	0	81,5
59	94,5	0	94,5
60	103,0	0	103,0
61	5,5	0	5,0
63	9,0	0,5	9,5
65	26,0	0	26,0
67	42,0	0	42,0
69	67,0	0	67,0
71	84,5	0	84,5

72

98,4

0

98,4

Contagem microbiana para teste com $4,405 \times 10^{-7}$ mol de Oxaliplatina.

Tempo do evento (h)	Contagem de células não filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (C.C./mL) (10^6)	Contagem de células totais (C.C./mL) (10^6)
37	0,35	0,1	0,45
39	1,5	1,0	2,5
41	4,0	3,0	7,0
43	10,0	2,0	12,0
45	14,5	0,5	14,5
47	19,0	0,5	19,5
48	20,5	0	20,5
49	0,2	0	0,2
51	1,0	0	1,0
53	1,0	0,4	1,4
55	2,5	0	2,5
57	10,5	0	0
59	32,0	0,5	32,5
60	56,0	0	56,0
61	0,5	0	0,5
63	1,0	0	0
65	3,5	0	3,5
67	19,0	0	19,0
69	25,0	0	25,0
71	39,5	0	39,5

72

42,0

0

42,0

APÊNDICE D – TABELA DO SEGUNDO CONTROLE DOS TESTES COM ANTIMITÓTICO – REFERÊNCIA PARA OS TESTES COM 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 E $1,8 \times 10^{-7}$ mol DE CDDP E 0,5; 1,0; 1,3; 2,0; 2,5; 3,146 E $4,405 \times 10^{-7}$ mol DE OXALIPLATINA.

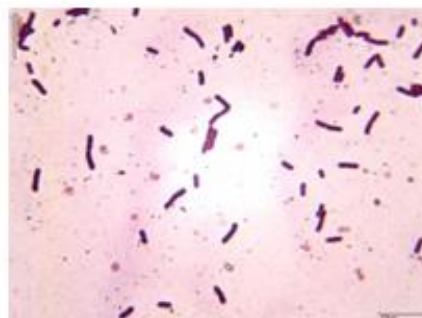
Contagem microbiana e tempo do evento para controle.

Tempo do evento(h)	Contagem de células não filamentosas (UFC/mL) (10^6)	Contagem de células filamentosas (UFC/mL) (10^6)	Contagem de células totais (UFC/mL) (10^6)
1	9,5	0	9,5
3	20,5	0	20,5
5	61,5	0	61,5
7	95,0	0	95,0
9	105,0	0	105,0
11	165,0	0	165,0
12	205,0	0	205,0
13	11,0	0	11,0
15	35,0	0	35,0
17	50,0	0	50,0
19	75,0	0	75,0
21	95,0	0	95,0
23	125,0	0	125,0
24	135,0	0	135,0
25	6,0	0	6,0
27	15,0	0	15,0

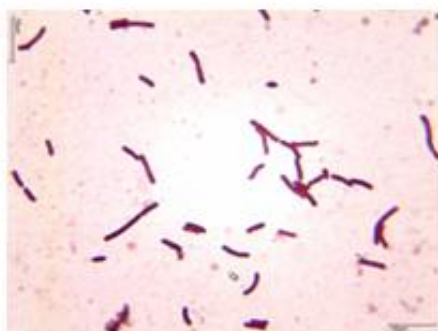
29	30,0	0	30,0
31	51,0	0	51,0
33	80,0	0	80,0
35	126,0	0	126,0
36	160,0	0	160,0
37	8,0	0	8,0
39	29,0	0	29,0
41	38,5	0	38,5
43	50,5	0	50,5
45	90,0	0	90,0
47	170,0	0	170,0
48	250,0	0	250,0
49	26,0	0	26,0
51	65,0	0	65,0
53	69,0	0	69,0
55	100,0	0	100,0
57	125,0	0	125,0
59	150,0	0	150,0
60	185,0	0	185,0
61	15,0	0	15,0
63	26,5	0	26,5
65	40,0	0	40,0
67	85,0	0	85,0
69	165,0	0	165,0

71	220,0	0	220,0
72	260,0	0	260,0

**APÊNDICE E – IMAGENS DA BACTÉRIA *Z. MOBILIS* SOB AÇÃO DO
ANTIMITÓTICO - CDDP**



**APÊNDICE F – IMAGENS DA BACTÉRIA *Z. MOBILIS* SOB AÇÃO DO
ANTIMITÓTICO – OXP**

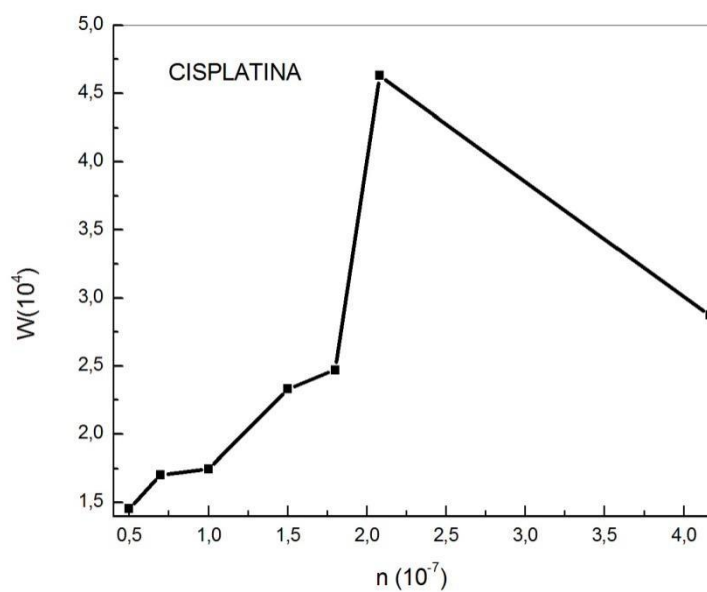


APÊNDICE G – VALORES E GRÁFICOS DA TAXA EVOLUTIVA

Valores referentes a teste 1 da Taxa Evolutiva com CDDP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,454	31
0,7	1,704	33
1,0	1,744	33
1,5	2,330	36
1,8	2,470	37
2,081	4,631	39
4,163	2,874	51

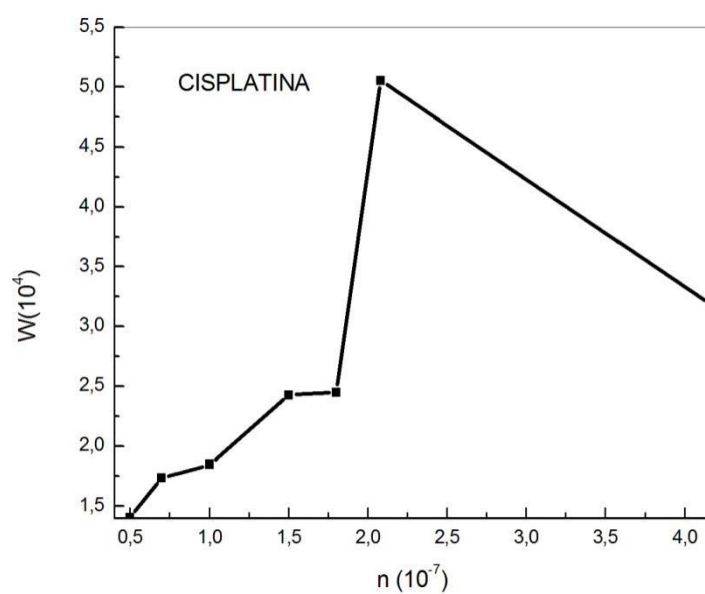
Gráfico referente a teste 1 da Taxa Evolutiva com CDDP.



Valores referentes a teste 2 da Taxa Evolutiva com CDDP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,562	31
0,7	1,736	33
1,0	1,846	33
1,5	2,427	36
$1,8 \times 10^{-7}$	2,449	37
2,081	5,055	39
$4,163 \times 10^{-7}$	2,7	51

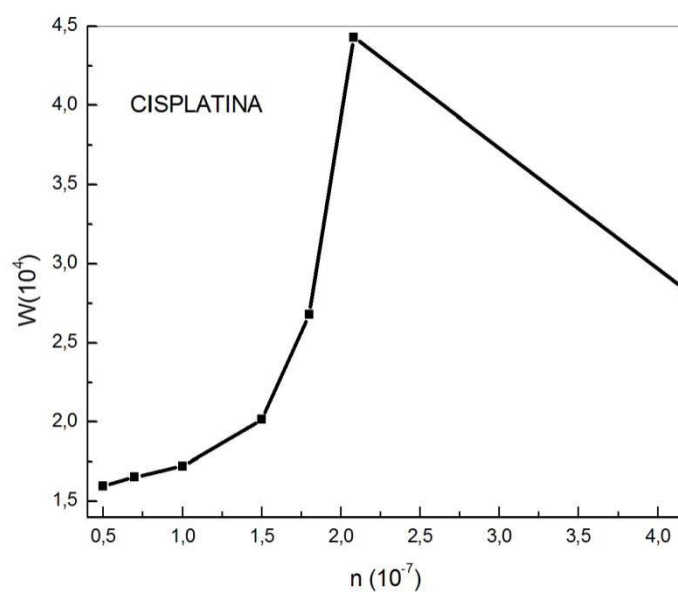
Gráfico referente a teste 2 da Taxa Evolutiva com CDDP.



Valores referentes a teste 3 da Taxa Evolutiva com CDDP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,596	31
0,7	1,654	33
1,0	1,722	33
1,5	2,679	36
1,8	2,679	37
2,081	4,451	39
4,163	2,845	51

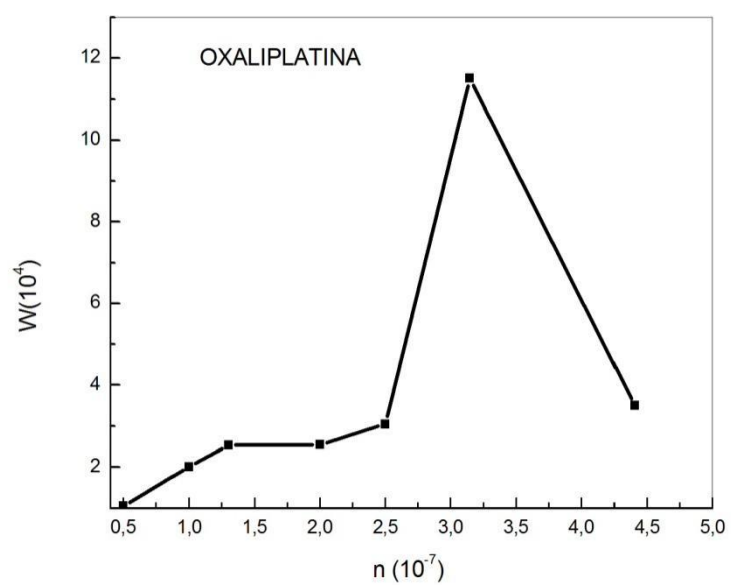
Gráfico referente a teste 3 da Taxa Evolutiva com CDDP.



Valores referentes a teste 1 Taxa Evolutiva com OXP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h \cdot 1 \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,05	55
1,0	2,010	37
1,3	2,535	33
2,0	2,539	33
2,5	3,05	33
3,146	11,505	33
4,405	3,497	36

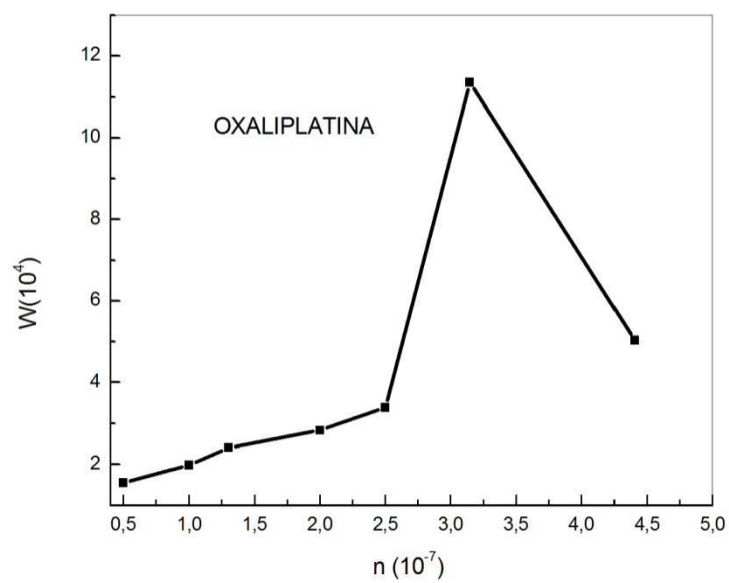
Gráfico referente a teste 1 da Taxa Evolutiva com OXP.



Valores referentes a teste 2 Taxa Evolutiva com OXP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h^{-1} \cdot mol^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,131	55
1,0	1,986	37
1,3	2,409	33
2,0	2,829	33
2,5	3,388	33
3,146	11,362	33
4,405	5,037	36

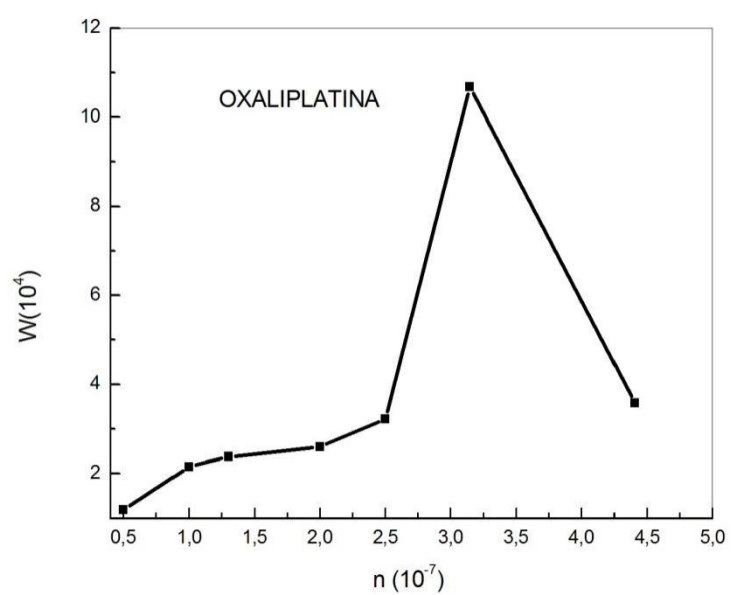
Gráfico referente a teste 2 da Taxa Evolutiva com OXP.



Valores referentes a teste 3 Taxa Evolutiva com OXP e tempo de inversão populacional.

Número de mol (10^{-7})	W ($10^4 \cdot h \cdot 1 \cdot \text{mol}^{-1}$)	Tempo de inversão (h)
0,5	1,191	55
1,0	2,118	37
1,3	2,376	33
2,0	2,596	33
2,5	3,222	33
3,146	12,074	33
4,405	3,586	36

Gráfico referente a teste 3 da Taxa Evolutiva com OXP.



APÊNDICE H – PATENTE DEPOSITADA

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2018 015226 2**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24416174000106**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 52171-900**País:** Brasil**Telefone:** (81) 332 06104**Fax:** (81) 332 06001**Email:** coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 6

Nome: WAGNER EDUARDO DA SILVA

CPF: 02829311477

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua da Boa Vontade, 132 – Apto 204, Tamarineira

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 52110-070

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 480093

Fax:

Email: wesdqr@gmail.com

Inventor 2 de 6

Nome: MONICA FREIRE BELIAN

CPF: 02430105403

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua da Boa Vontade, 132 – Apto 204, Tamarineira

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 52110-070

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 643777

Fax:

Email: monica.freirebelian@ufrpe.br

Inventor 3 de 6

Nome: CARINE EMILE MENEZES LAGRANGE

CPF: 07222682465

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Monteiropolis,532,Janga

Cidade: PAULISTA

Estado: PE

CEP: 53437-470

País: BRASIL

Telefone: (81) 986 585255

Fax:

Email: mile_cari@hotmail.com

Inventor 4 de 6

Nome: ANDRE FERNANDO LAVORANTE

CPF: 19030329890

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dona Inês Correia de Araújo ,156,BL A,APT 504,Caixaanga

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 50800-220

País: BRASIL

Telefone: (81) 995 441950

Inventor 5 de 6

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/07/2018 às 17:16, Petição 870180064283

Nome: EDNA BARBOZA DE LIMA

CPF: 06521201484

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: AV. AFONSO OLINDENSE,1048,VARZEA

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 50810-000

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 408063

Fax:

Email: ednabarbozalima@gmail.com

Inventor 6 de 6

Nome: LUDHIMILLA SUELEN GOMES LINS DE LIMA

CPF: 05592862440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorado

Endereço: Avenida pinheiros,733,Apt 1002,bl a, Imbiribeira

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 51170-150

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 550167

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE AVALIAÇÃO CRONOLÓGICA DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA FRENTE A QUIMIOTERÁPICOS

Resumo: "MÉTODO DE AVALIAÇÃO CRONOLÓGICA DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA FRENTE A QUIMIOTERÁPICOS". A presente invenção trata-se de um método de avaliação da resistência adquirida por sistemas biológicos frente a agentes antimitóticos (antineoplásicos), constituindo assim, em um promissor método a ser aplicado aos quimioterápicos mais utilizados na terapêutica do câncer. O referido método deverá ser aplicado na Avaliação Cronológica da Resistência Adquirida frente a Quimioterápicos (Método ACRAQ) utilizados, por exemplo, em oncologia, no que se refere à sugestão e elaboração de protocolos mais seguros de administração de agentes antitumorais para pacientes com câncer, podendo dar condições ao oncologista de inferir e decidir, para um determinado regime quimioterápico, qual a droga menos propensa ao desencadeamento do fenômeno MDR (MultiDrug Resistance – resistência a multidrogas). A referida invenção apresenta-se como inovação tecnológica, do ponto de vista metodológico e interpretativo, pois não existe ainda um método de avaliação de resistência adquirida por sistemas biológicos frente a quimioterápicos. Através do método proposto foi possível avaliar, em escala temporal, o desencadeamento do fenômeno da resistência adquirida através de um modelo celular bacteriano o qual foi mantido em contato com um antimitótico, a CDDP, também utilizado como modelo.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/07/2018 às 17:16, Petição 870180064283

Petição 870180064283, de 25/07/2018, pág. 2/31