



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E
RESISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS
(*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E *ZYMO MONAS
MOBILIS*) NA PRESENÇA DE CISPLATINA
EMPREGANDO UM SISTEMA FLUXO-BATELADA**

Edna Barboza de Lima

Recife

Julho/2016

Edna Barboza de Lima

**ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E
RESISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS
(*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E *ZYMOZOMONAS
MOBILIS*) NA PRESENÇA DE CISPLATINA
EMPREGANDO UM SISTEMA FLUXO-BATELADA**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Química pela
Universidade Federal Rural de
Pernambuco.

Orientador: André Fernando Lavorante

Co-Orientador: Wagner Eduardo da Silva

Bolsista CAPES

Recife

Julho/2016

Edna Barboza de Lima

**ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E
RESISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS
(*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E *ZYMO MONAS
MOBILIS*) NA PRESENÇA DE CISPLATINA
EMPREGANDO UM SISTEMA FLUXO-BATELADA**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

____/____/____

Prof. Dr. André F. Lavorante (Dept. de Química-UFRPE)

Orientador

Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva (Dept. de Química-UFRPE)

Co- Orientador

Prof. Dr^a Olga Martins Marques (Dept. de Eng. Química-UFPE)

1º Examinador

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho (Dept. de Química-UFRPE)

2º Examinador

Prof. Dr. Clécio Sousa Ramos (Dept. de Química-UFRPE)

Suplente

Prof. Dr^a Ana Paula Silveira Paim (Dept. de Química-UFPE)

Suplente

AGRADECIMENTOS

Ao professor André Fernando Lavorante pela orientação e dedicação prestada no presente trabalho.

Ao professor Wagner Eduardo da Silva pela co-orientação, apoio e auxílio nas atividades realizadas.

À todos os colegas do Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores especialmente a Ludhimilla pelos serviços prestados, ajudas e auxílios para realização das diversas funções desenvolvidas.

À Gustavo Campelo e Paulo Alberto pela colaboração na montagem, execução e programação do sistema.

Ao amigo Ayyaz Mahmood pela colaboração, ajuda, compreensão e palavras de apoio.

À professora Mônica Belian pela organização e dedicação ao programa de pós-graduação em química.

À todo o pessoal do CETENE especialmente os técnicos do Laboratório de Biologia: Isaac e Aldenise pela colaboração e auxílio nas análises microbiológicas.

A todos os professores do programa de pós-graduação em química pelos ensinamentos.

A todos os colegas de classe.

Aos meus pais Jozemil Barboza e Lenita Freitas pela força, dedicação e conselhos dados.

Aos meus irmãos Edson Barboza e Edvania Barboza pelas palavras de apoio e atenção.

À CAPES pelo auxílio cedido para realização de tal projeto.

Toda grande caminhada começa com um simples passo.

Buda

RESUMO

Neste trabalho foi empregado um sistema baseado em fluxo-batelada para estudo do perfil cinético de crescimento e resistência de microrganismos na presença do fármaco cisplatina, usada comumente no tratamento de câncer. Com o intuito de minimizar a geração de resíduos, foram utilizadas mini-bombas solenoide como sistema de propulsão de fluidos. Inicialmente foram realizados testes com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para verificar o seu perfil cinético de crescimento, porém tal microrganismo produziu uma elevada quantidade de biomassa aglomerada gerando assim interferência na análise turbidimétrica, chamada de efeito *backscattering* ou retroespalhamento. A fim de reduzir esse tipo de interferência, os testes posteriores, foram realizados com a bactéria *Zymomonas mobilis*, pois esta, mesmo produzindo uma quantidade considerável de biomassa, possui mobilidade (1 a 4 flagelos polares) o que garante melhor sua distribuição, dificultando a formação de aglomerados. Desde modo, foi possível obter o perfil cinético de crescimento e verificar seu comportamento frente ao uso da droga inorgânica cisplatina, no período de 24 h. Após esse tempo, o sistema apresentou interferências causadas pelo aumento da concentração celular. Para verificar a resistência da *Z. mobilis* ao agente antineoplásico (cisplatina) foram realizadas leituras turbidimétricas a 600 nm, empregando espectrofotômetro UV-Vis sem utilização do sistema fluxo-batelada. Também foram realizadas contagens microbianas em câmara de *Neubauer* e coloração de gram em lâminas de vidro. Os resultados obtidos com tais análises, além de reafirmar a ação anti-mitótica da cisplatina, também possibilitaram a elucidação temporal para os mecanismos bioquímicos de resistência do microrganismo testado frente ao antineoplásico em questão (CDDP).

ABSTRACT

This work utilized a flow-batch based system aiming to study the growth kinetic profile and resistance of microorganisms tested with inorganic drug cisplatin (CDDP), commonly used in cancer treatment. Aiming to reduce costs and waste production during the tests, Solenoid mini-pumps were used as fluid propulsion system. Such a device was connected to an integrated circuit ULN 2803 which was coupled to an electronic serial interface (USB 4000) to connect to computer's USB output that had the function to control the pulses of solenoid mini-pumps sent to reaction chamber. A multichannel UV-Vis spectrophotometer with a linear array of photodetectors was used as detection system. The data acquisition and control devices were obtained from program written in LABVIEW 8.5 language. Initially, the tests with *Saccharomyces cerevisiae* yeast were carried out to obtain their growth kinetic profile; however, the micro-organism produced a high amount of biomass and this caused interference in turbidimetric analysis, causing what we call backscattering or backscatter effect. In order to reduce interference, subsequent tests were performed with the bacterium *Zymomonas mobilis*, which not only produces a smaller amount of biomass but is also a non-pathogen used in cell biology. For such bacteria, it was possible to obtain the kinetic growth profile and verify its behavior with the use of inorganic drugs cisplatin for a period of 24 hours. After this time the system presented interference and reading errors caused by the increase in cell concentration. To evaluate the CDDP-resistance profile of the *Z. mobilis* turbidimetric readings were performed at 600 nm in UV-Vis without the flow-batch system. The cell count of the microbial were carried out in a Neubauer chamber and Gram stain was checked on glass slides. The result from such analyzes, reaffirm the anti-mitotic action of cisplatin as well allowed the chronological elucidation of the biochemical mechanisms of the resistance against anticancer tested (CDDP).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Sistemas em fluxo	16
2.2 Análise por injeção em fluxo	17
2.3 Fluxo-batelada	18
2.4 Turbidimetria	19
2.5 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.6 Bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	22
2.6.1 Perfil de cinético crescimento	23
2.6.2 Fases do crescimento microbiano	25
2.7 Drogas antineoplásicas	26
2.7.1 Cisplatina	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Soluções e Reagentes	30
4.2 Microrganismos	31
4.3 Meios de manutenção	31
4.4 Inóculos	31
4.5 Meios de cultura	32
4.6 Acessórios do sistema fluxo-batelada	32
4.7 Procedimentos Experimentais	36
4.7.1 Calibração das minibombas solenoide e da câmara de fluxo batelada	36
4.7.2. Testes com os microrganismos.....	38
4.7.2.1 Testes manuais usando a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Ajustes das minibombas solenoide e da câmara de fluxo batelada	40
5.2 Testes com as leveduras	42
5.3 Testes com a <i>Zymomonas mobilis</i> em sistemas fluxo batelada	48
5.4 Efeito da resistência de <i>Z. mobilis</i> com uso de cisplatina	52

CONCLUSÃO	59
PERSPECTIVAS.....	60
BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um sistema fluxo batelada. (a) Bomba peristáltica; (b) Acionador de válvula (c) Computador; (d) Válvulas solenoide de duas vias; (e) Câmara de reação; (f) Agitador magnético; (g) Detector.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2: Esquema de um sistema fluxo batelada. (a) Espectrofotômetro; (b) Fibra óptica; (c) Computador; (d) Mini-bombas de solenóide; (e) Câmara de reação; (f) Agitador magnético; (g) Interface serial; (h) Acionador das mini-bombas; (i) Lâmpada de Tungstênio-halogênio. 20

Figura 2: Esquema de turbidimetria..... 21

Figura 4: Divisão por brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrada através de micrografia eletrônica de varredura 23

Figura 5: Bactéria *Zymomonas mobilis*. 26

Figura 6: Curva de crescimento microbiano de acordo com cada etapa. A → B: Fase de latência (lag); B → C: Fase exponencial (log); C → D: Fase estacionária e D → E: Fase de morte (declínio)..... 26

Figura 7: Estrutura química da cisplatina. 33

Figura 8: Câmara de mistura / reação..... 35

Figura 9: Interface do programa LabVIEW® versão 8.6..... 36

Figura 10: Testes de diluição..... 42

Figura 11: Perfil cinético de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, sem tratamento de dados, as leituras de abs foram realizadas a cada 0,1 s..... 43

Figura 12: Perfil cinético de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , valores de absorvância obtidos a cada 1h.....	44
Figura 13 : Perfil de cinético de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> com diluição 1:2 do inóculo.....	45
Figura 14: Perfil de cinético de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> com diluição 1:50 do inóculo inicial.....	46
Figura 15: Perfil cinético de crescimento da <i>S.cerevisiae</i> sem agitação.	47
Figura 16: Placas de Petri com Agar Nutritivo (AN) usado para controle do meio de cultura SDL.....	48
Figura 17: Análise turbidimétrica em sistemas fluxo-batelada realizada com cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> com concentrações 0, 5, 10 e 20 µL de cisplatina.	49
Figura 18: Efeito da droga antineoplasica em diversas concentrações de cisplatina nos inóculos de <i>Zymomonas mobilis</i> . a) Controle, ou seja, apenas a suspensão de bactéria em meio de cultura sem uso da cisplatina, b) 5 µL de cisplatina, c) 10 µL de cisplatina e d) 20 µL de cisplatina	50
Figura 19: Análise turbidimétrica em cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> . a) Controle, ou seja, sem cisplatina, b) 5 µL de cisplatina, c) 10 µL de cisplatina, d) 20 µL de cisplatina	52
Figura 20: <i>Zymomonas mobilis</i> com 5 µL do agente antineoplásico cisplatina, a) 1º dia de tese, b) 2º dia de tese, c) 3º dia de tese, d) 4º dia de tese	53

Figura 21: *Zymomonas mobilis* com 10 µL do agente antineoplásico cisplatina, **a)** 1º dia de tese, **b)** 2º dia de tese, **c)** 3º dia de tese, **d)** 4º dia de tese
..... 54

Figura 22: *Zymomonas mobilis* com 20 µL do agente antineoplásico cisplatina, **a)** 1º dia de tese, **b)** 2º dia de tese, **c)** 3º dia de tese, **d)** 4º dia de tese
..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Sequência de acionamento das mini-bombas solenóide 37

Tabela 2: Capacidade das mini-bombas e da câmara de reação com seus respectivos desvios-padrão..... 41

Tabela 3: Contagem microbiana em câmara de Neubauer para sistema fluxo-batelada 51

Tabela 4: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 5 μL de droga inorgânica..... 56

Tabela 5: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 10 μL de droga inorgânica..... 56

Tabela 6: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 20 μL de droga inorgânica..... 57

Tabela 7: Tempo de resistência por concentração de antineoplásico 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AN – Agar Nutritivo

CDDP – *cis*-diamino-dicloro-platina (II) – (Cisplatina)

CFA – Análise em Fluxo Contínuo (*Continuous Flow Analysis*)

FBA – Análise em Fluxo Batelada (*Flow-Batch Analysis*)

FIA – Análise por Injeção em Fluxo (*Flow-Injection Analysis*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

MCFA – Análise em Fluxo por Multicomutação (*Multicommutation in Flow Analysis*)

PTPE – Politetrafluoretileno

YPD – Levedura Peptonada Dextrose (*Yeast Peptone Dextrose*)

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SDL – Sacarose, Dextrose, Extrato de Levedura

1 INTRODUÇÃO

Análise por injeção em fluxo é uma ferramenta analítica, na qual alíquotas de soluções de amostras e reagentes são introduzidas e transportadas até um detector. A zona da amostragem é transportada até o sistema de detecção por um fluxo carregador. Ao passar pelo sistema de detecção, um sinal é gerado e registrado na forma de sinal transiente, obtendo-se o então chamado diagrama. (ZAGATTO, *et al.*, 2012).

A partir da crescente demanda de amostras para análises químicas surgiram os analisadores automáticos como forma de tornar as análises mais robustas, as quais possuem alta frequência analítica, elevadas reprodutibilidades, repetibilidades e redução de erros operacionais. Segundo Almeida (2007), os analisadores podem ser classificados como: robotizados, em batelada, em fluxo e em fluxo-batelada. Tais analisadores podem ainda serem classificados como automáticos ou automatizados. Segundo a IUPAC, sistema automático não modifica sua operação, enquanto sistema automatizado tem a capacidade de alterar o desenvolvimento de análises a partir dos dados obtidos no decorrer do procedimento analítico (MCDOWALL, 1995).

Os sistemas fluxo-batelada possuem uma combinação dos analisadores em fluxo com os analisadores em batelada, ou seja, transporte de amostras e reagentes em fluxo juntamente com monitoramento do sinal analítico e processamento da amostra em compartimento fechado denominado câmara de reação.

A combinação dos analisadores em fluxo com os analisadores em batelada propuseram um sistema fluxo-batelada com alta precisão, baixo custo de análise, baixo consumo de amostras e reagentes, facilidade de automação e baixa geração de resíduos (BARRETO, 2012).

Os sistemas fluxo-batelada podem ser utilizados para avaliar cinéticas de reações e, no caso deste trabalho, acompanhar o perfil cinético de

crescimento de microrganismos e verificar a resistência dos mesmos frente ao uso de antineoplásicos.

Os agentes antineoplásicos podem ser capazes de alterar o ciclo celular dos microrganismos evitando a proliferação desordenada de células neoplásicas. O uso dessas drogas no tratamento de cânceros é baseado no conceito da cinética e resistência celular, o qual inclui o ciclo de vida celular, o tempo do ciclo celular, a fração de crescimento e a massa tumoral.

O presente trabalho tem por objetivo utilizar um sistema fluxo-batelada para a avaliação da cinética de crescimento e a resistência de microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*) a diferentes concentrações do agente antineoplásico cisplatina (CDDP).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas em fluxo

Os sistemas em fluxo surgiram por volta de 1960, porém a consolidação de tais processos só ocorreu na década seguinte com a afirmação dos termos automático e automatizado (VALCÁRCEL, 1988).

Com o aumento da demanda por análises químicas e a necessidade de respostas mais rápidas e precisas os sistemas automáticos vieram como uma alternativa aos processos laboratoriais clássicos. Os principais objetivos dos sistemas automáticos são: eliminar erros operacionais, possibilitar um maior número de análises, aumento da frequência analítica, menor consumo de amostras e reagentes, maior sensibilidade e confiabilidade dos resultados (BARRETO, 2012).

Ainda hoje existe uma grande discussão quanto ao significado dos termos automático e automatizado. Segundo Cerdà, *et al.* (2014) o termo automático se refere a um sistema que ainda necessita de uma ação do

operador, enquanto que sistemas automatizados são capazes de reconhecer qualquer mudança e se adequar sem intervenção do analista.

Em processos analíticos são frequentemente usados métodos automáticos devido a sua simplicidade, fácil manuseio e baixo custo de aparelhagem.

2.2 Análise por injeção em fluxo

O termo Análise por Injeção em Fluxo (FIA) foi designado pela primeira vez por Ruzicka no ano de 1975 (RUZICKA e HANSEN, 1975). Porém, a classificação da técnica analítica foi estabelecida pela IUPAC apenas em 1994 (LINDER e WILLEM, 1994).

Análise por injeção em fluxo é uma ferramenta analítica com a função de inserção de soluções de amostras e/ou reagentes em fluido transportador de forma contínua ou não. A solução carregadora, que pode ser definida como fluido transportador, tem por função transportar as soluções da zona de amostragem até o detector.

Os parâmetros físico-químicos das diluições ou dispersões ocorridas no sistema FIA podem ser controlados pelos seguintes fatores: volume injetado, vazões dos fluidos, comprimento da bobina de reação e diâmetro interno da tubulação (CALATAYUD e GARCIA, 1993).

De maneira geral os componentes do sistema de análise em fluxo são: unidade propulsora, injetora, e de tratamento/mistura da amostra, além das unidades coletoras, de armazenagem e de detecção (SILVA JUNIOR, 2014).

O procedimento analítico empregando sistemas FIA podem ser divididos em três etapas: pré-tratamento das amostras, determinação dos analitos e processamento/análise de dados (MIRANDA, *et al.*, 2002). Tais sistemas podem ser acoplados a diversas técnicas instrumentais de detecção afim de melhorar a precisão dos resultados (ROCHA e NOBREGA, 1999).

A análise por injeção tem como principais características: precisão analítica, rapidez, simplicidade no manuseio, baixo consumo, redução de erros operacionais e custo acessível.

2.3 Fluxo-batelada

Os sistemas fluxo-batelada, do inglês “flow batch analysis” (FBA) são uma combinação dos sistemas em fluxo com os sistemas em batelada, pois o transporte de soluções de amostras e de reagentes bem como a detecção do sinal obtido são semelhantes aos processos dos analisadores em fluxo, enquanto que a reação química e sua homogeneização ocorrem antes do processo de detecção em um compartimento fechado denominado de câmara de reação, como nos sistemas em batelada. Os sistemas FBA combinam as vantagens dos analisadores em fluxo tais como, elevada taxa de amostragem, baixo custo, simplicidade de automação, baixo consumo de amostra e reagentes e baixa geração de resíduos, além da diversidade de aplicações encontradas nos analisadores em batelada (ALMEIDA, 2007)

No que diz respeito ao direcionamento do fluido até câmara de reação podem ser utilizadas válvulas solenoide de três vias cujas posições *on/off* (ligada ou desligada) são controladas por um “software” de computador. Nesse sistema ora amostra e/ou reagentes passam para a câmara, posição *on* da válvula, ora amostra/reagentes são direcionados para um descarte, posição *off* da válvula solenoide. Para a propulsão do fluido, normalmente, utiliza-se uma bomba peristáltica.

As mini-bombas solenoide utilizadas no sistema FBA tanto para a propulsão quanto para a inserção das soluções na câmara de mistura são acionadas por uma interface eletrônica controlada via computador, tais mini-bombas podem possuir volumes fixos ou ajustados conforme desejado.

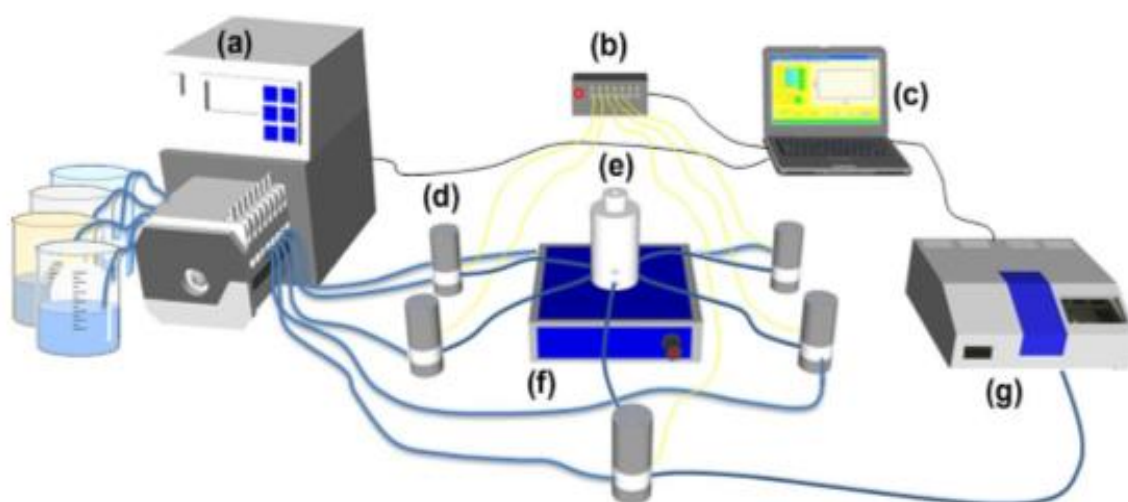
A câmara de reação, ou de mistura, é o compartimento onde ocorre a homogeneização da solução a ser analisada, tal procedimento ocorre com o auxílio de barra magnética e agitador magnético.

As medidas do sinal analítico podem ser realizadas diretamente na câmara de reação. Tais medidas podem ocorrer em fluxo contínuo ou em fluxo interrompido.

Os sistemas FBA podem ser acoplados a diversos tipos de sistemas de detecção.

A FIGURA 1 ilustra um esquema de um sistema fluxo-batelada e alguns de seus componentes.

Figura 1: Esquema de um sistema fluxo batelada. (a) Bomba peristáltica; (b) acionador de válvula; (c) Computador; (d) Válvulas solenoides de duas vias; (e) Câmara de reação; (f) Agitador magnético; (g) Detector. (DINIZ, ALMEIDA e ARAÚJO, 2012).

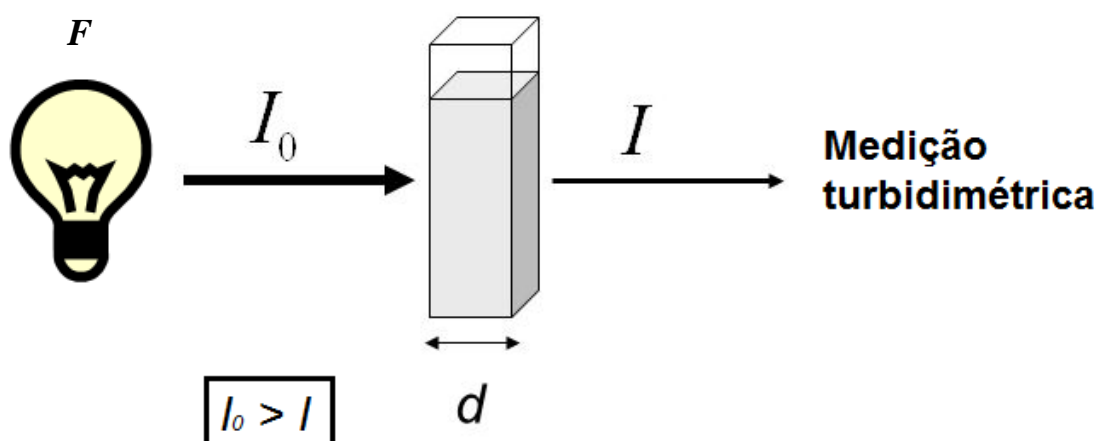


2.4 Turbidimetria

A turbidimetria é definida como um método de quantificação relacionada à medida da diminuição da intensidade do feixe de luz incidente (FIGURA 2), causado por uma solução contendo partículas, essa técnica é análoga à espectroscopia de absorção (BURTIS e DAVID, 2008). A variação na quantidade de luz que chega ao detector é inversamente proporcional ao

número de partículas presentes na suspensão e seu valor é registrado na forma de absorção (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Figura 2: Esquema da turbidimetria. I_0 = Intensidade da luz incidente; I = Intensidade da luz transmitida pela suspensão de células; d = Caminho óptico; F = Fonte de luz.



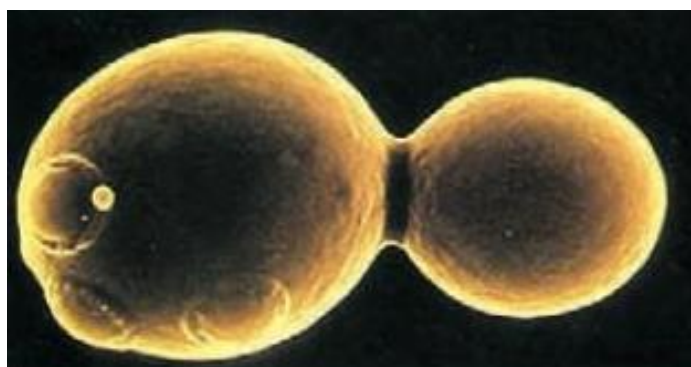
A análise por injeção em fluxo e fluxo-batelada, permitem o uso de detectores ópticos empregando análises turbidimétricas (RICART e MATEO, 2015). Tal análise se baseia na atenuação do feixe de radiação causado pela presença de partículas em suspensão formadas durante o processamento da amostra (ZAGATTO, *et al.*, 2012).

Medidas turbidimétricas requerem análises cuidadosas, com boa homogeneização da suspensão de material formado no decorrer do processo de análise química (SILVEIRA e TARLEY, 2008). Sistemas fluxo-batelada comumente utilizam agitação constante gerando uma melhor redistribuição e homogeneização das partículas no meio, tal fato contribuiu para um menor espalhamento da radiação eletromagnética UV-vis e obtenção de resultados analíticos mais precisos (ZAGATTO, *et al.*, 2012).

2.5 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* possui tamanho de aproximadamente 4 μm e em condições ideais de cultivo possuem um tempo de duplicação de cerca de 90 minutos (PASSARGE, 2004) pertence ao domínio Eukaryota, Reino Fungi; Filo Ascomycota (KURTZMAN, 1997). Tais leveduras são unicelulares diplóides com reprodução assexuada por brotamento (BOULTON e QUAIN, 2001) ou sexuada por esporulação (PRETORIUS, 2000). A FIGURA 3 apresenta a microscopia eletrônica de varredura da *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 3: Divisão por brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrada através de microscopia eletrônica de varredura (MADIGAN, *et al.*, 2010).



O pesquisador *Eduard Buchner* foi o pioneiro na investigação científica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seu estudo mostra o metabolismo celular desse microrganismo; a partir desse momento a *S.cerevisiae* passou a ser utilizada como modelo no âmbito da biologia celular (LEITE, 2010).

Além das aplicações industriais e dos processos fermentativos a *Saccharomyces* é utilizada no ramo farmacológico, em estudos bioquímicos e de biologia celular, tal microrganismo é utilizado como modelo para estudar aspectos moleculares relacionados ao câncer, contextos genéticos e resistência da levedura a drogas anticâncer (MATUO, *et al.*, 2012).

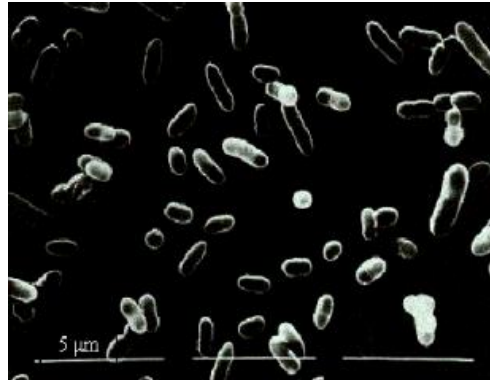
No ano de 1996 pesquisadores codificaram a sequência genômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SOUSA, 2013) e demonstraram que 40% dos seus genes partilham sequências de aminoácidos com proteínas humanas, além disso, 50% dos genes humanos possuem ortólogos em *S.cerevisiae*, devida homologia entre os genes humanos e os genes da *Saccharomyces* tal levedura passou a ser utilizada como modelo no âmbito da biologia celular com posterior aplicabilidade em eucariotas superiores (LEITE, 2010).

A estrutura das leveduras é relativamente semelhante a das células humanas por se tratar de um organismo eucariota, além do mais tal levedura pode ser cultivada em meios de crescimento previamente definidos permitindo ao investigador um melhor controle dos parâmetros analisados (LEITE, 2010). Como tais leveduras são unicelulares e não patogênicas, os procedimentos de adição e detecção de drogas adicionados nesses organismos para análise da cinética de crescimento são simples, rápidos e não agressivos.

2.6 Bactéria *Zymomonas mobilis*

A bactéria *Zymomonas mobilis* foi descoberta inicialmente em fermentações de plantas ricas em açúcares como o agave, vinhos de palmáceas e como contaminantes em cidras e em cervejas produzidas na Europa (SANTOS, 2012). É uma bactéria anaeróbia, gram-negativa, não patogênica (SWINGS e DE LEY, 1977), possui a forma de bastonete com 2 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,5 µm de largura (FIGURA 4), com colônias brancas ou creme que se desenvolvem a temperatura de 30 °C (FALCÃO DE MORAIS, 1983). Sua reprodução ocorre por divisão binária, as células resultantes podem ser encontradas isoladamente ou em pares, não possuem cápsulas e não formam esporos (SANTOS, 2012).

Figura 4: Bactéria *Zymomonas mobilis* (SANTOS, 2012).



De maneira similar a outros microrganismos quimiorganotróficos, *Z. mobilis* possibilita seu crescimento em glicose ou frutose, necessitando de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes para o seu desenvolvimento (VIKARE e KORHOLA, 1986). Não necessita de controle de oxigênio para manter a viabilidade do cultivo, pois a mesma também pode crescer em anaerobiose (GUNASEKARAN e RAY, 1999).

Diferente de outros microrganismos, como por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a *Zymomonas mobilis* possui rotas metabólicas simples o que leva a um rápido tempo de geração, variando de 90 a 120 minutos (OSMAN, 1985).

A bactéria *Z. mobilis* é muitas vezes vista como uma alternativa para estudos de biologia celular frente a levedura *S. cerevisiae*, pois além de possuir menor fator inibitório de crescimento na presença de componentes tóxicos (FRANDEN, PIENKOS e ZHANG, 2009), possuem também um melhor rendimento na conversão de açúcares à etanol, menor produção de biomassa e facilidade de manipulação genética (SHENE e BRAVO, 2001. LIN e TANAKA, 2006).

2.6.1 Perfil cinético de crescimento

O crescimento microbiano envolve a multiplicação e o crescimento populacional de uma cultura de células, além do aumento de biomassa

produzida por tais microrganismos. A essa variação na massa e na quantidade de culturas produzidas por unidade de tempo, chamamos de taxa de crescimento.

A duplicação do número de células em um determinado intervalo de tempo é denominada tempo de geração. Cada espécie que se duplica possui um tempo de geração característico, variando de acordo com as condições ambientais e genéticas. A Equação 2 é utilizada para encontrar o número de células produzidas (n) e a Equação 3 o tempo de geração (g).

$$n = \frac{\log N - \log N'}{0,301} \quad (2)$$

Onde:

n = número de células produzidas

N' = número inicial de células

N = número final de células

$$g = \frac{t}{n} \quad (3)$$

Onde:

g = tempo de geração

t = tempo

n = número de células produzidas

A taxa de crescimento e o tempo de geração permitem avaliar a concentração das células ao longo do tempo de incubação e verificar o

crescimento celular em função de possíveis alterações das condições ambientais.

O crescimento pode ser quantificado pelo método espectrofotométrico de turbidimetria ou nefelometria. Nesses métodos o crescimento celular é monitorado de acordo com a turbidez da solução.

O resultado obtido é expresso em termos de absorvância em função do tempo. O comprimento de onda mais utilizado para leituras de turbidimetria/nefelometria se encontra na região do vermelho em ~ 660 nm, pois comprimentos de onda nessa faixa geram menos dispersão de luz em relação a comprimentos de ondas menores, região azul do espectro eletromagnético visível.

O espalhamento da luz está diretamente relacionado com a intensidade da luz incidente e esta varia inversamente com o comprimento de onda.

2.6.2. Fases do crescimento microbiano

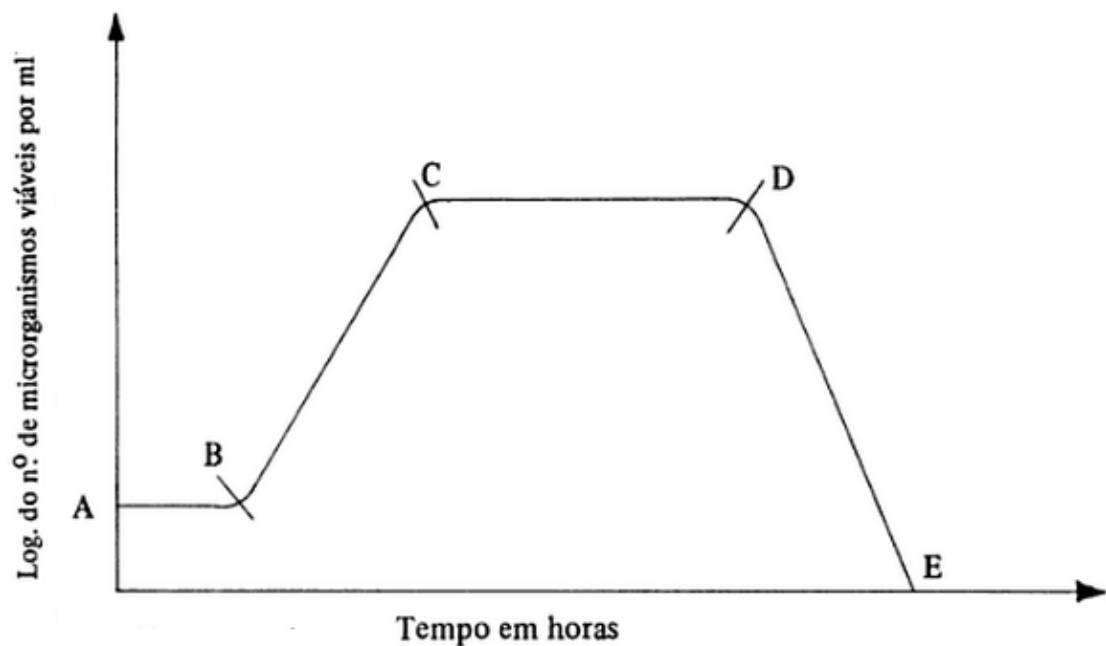
Uma cultura de célula microbiana cresce em sistema fechado e seu desenvolvimento pode ser acompanhado em diversas etapas, são elas:

- Fase de latência (fase lag): fase de adaptação do microrganismo a um novo meio com diferenças ambientais. Nessa etapa não há aumento significativo da população.
- Fase exponencial (fase log): nesta etapa as células estão adaptadas ao meio com excesso de nutrientes e os microrganismos possuem uma taxa de crescimento máxima.
- Fase estacionária: a partir dessa etapa a quantidade de nutrientes começa a ficar escassa e o crescimento microbiano começa a se estabilizar então o número de células que se dividem fica praticamente igual ao número de células que morrem.

- Fase de morte (declínio): nesta etapa o número de células mortas excede a quantidade de células vivas e ocorre uma perda da capacidade de divisão celular. Ocorre a redução do número de células por morte ou lise.

A FIGURA 5 ilustra as curvas do crescimento microbiano de acordo com suas etapas.

Figura 5: Curva de crescimento microbiano de acordo com cada etapa. A → B: Fase de latência (lag); B → C: Fase exponencial (log); C → D: Fase estacionária e D → E: Fase de morte (declínio). (GAVA, 1984)



2.7 Drogas antineoplásicas

O processo de carcinogênese é considerado como uma conversão progressiva de células humanas normais em células cancerosas. Essa conversão é provocada por alterações genéticas (MATUO, *et al.*, 2012).

A partir do ano de 1950 drogas citotóxicas passaram a ser utilizadas no tratamento quimioterápico de pessoas com câncer, a fim de aumentar a sobrevivência dos pacientes, porém tais medicamentos podem provocar efeitos toxicológicos diretos (KIKUCHI e PINTO, 2005).

Atualmente, o tratamento de tumores metastáticos com câncer ainda apresenta-se de forma agressiva para o paciente devido à resistência intrínseca adquirida aos medicamentos, limitando dessa maneira o seu potencial terapêutico (SCHENK, *et al.*, 2003).

A resistência ao agente antineoplásico pode ser desenvolvida de forma individual ou sinérgica, ou seja, através de mecanismos múltiplos dando origem ao fenômeno denominado por resistência a múltiplas drogas conhecido por MDR. Esses mecanismos podem atuar sobre o fármaco de formas diversas, tais como: diminuição da absorção da droga, aumento do efluxo, ativação de sistemas de desintoxicação, ativação de mecanismos de reparo do nDNA (DNA nuclear), evasão de apoptose induzida por drogas, entre outras (GILLET e GOTTESMAN, 2010).

O crescimento gradativo dos casos de câncer e a falta de tratamento adequado, ou seja, com compostos que atuem de forma seletiva sobre as células tumorais levaram a crescentes pesquisas por drogas anti-câncer mais efetivas e menos agressivas aos pacientes (MATUO, *et al.*, 2012).

Agentes quimioterápicos a base de platina vem sendo largamente utilizados no combate à células tumorais. Atualmente 41 % dos casos de câncer estão sendo tratados com a cisplatina em combinação com uma variedade de outras drogas incluindo carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina (WHEATE, *et al.*, 2010).

2.7.1 Cisplatina

Durante a década de 60, o pesquisador *Barnett Rosenberg* e seus colaboradores descobriram que um composto de coordenação de platina (II)

poderiam ser utilizado como agente citotóxico no tratamento do câncer (NEVES e VARGAS, 2011).

A pesquisa de *Rosenberg* consistia em aplicar um campo elétrico numa cultura de bactérias tipo *Escherichia coli*. O pesquisador observou que ao aplicar um campo elétrico na bactéria a divisão celular da mesma se inibia e suas células não se dividiam, apenas cresciam formando filamentos alongados (FONTES, CÉSAR e BERALDO, 2005). Tal fenômeno não ocorreu devido à corrente elétrica aplicada, mas sim devida hidrólise formada a partir dos eletrodos de platina presentes no experimento (ALDERDEN, HALL e HAMBLEY, 2006).

Após testes com bactérias *Rosenberg* passou a trabalhar com a cisplatina como droga antineoplásica devida sua capacidade antiproliferativa (SOUSA, 2013).

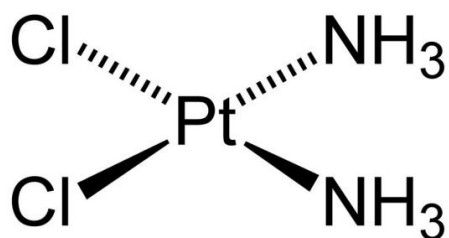
Os complexos de platina (II), $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, e de platina (IV), $\text{cis-}[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$, foram testados em ratos brancos contra tumores sarcoma 180, após 6 meses de testes foi verificado que os ratos não apresentaram quaisquer sinais de tumores cancerígenos, com isso a cisplatina passou a ser utilizada em ensaios clínicos como fármaco anti-câncer (ALDERDEN, HALL e HAMBLEY, 2006).

A cisplatina, CDDP, foi aplicada a pacientes com câncer pela primeira vez em 1971 e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978 para uma variedade de cancros, sendo atualmente um dos fármacos quimioterápicos mais utilizados (LEBWOHL e CANETTA, 1998).

A CDDP também é conhecida como "penicilina de câncer", devida sua ampla utilização no tratamento de câncer e também por ser a primeira grande droga quimioterápica a surgir no mercado (OLSZEWSKI e HAMILTON, 2010).

O composto inorgânico $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, FIGURA 6, denominado cisplatina passou a ser utilizado inicialmente em casos de câncer terminal e posteriormente em casos mais específicos para depois ser usado em procedimentos clínicos reduzindo a toxicidade renal causada por agentes citostáticos (FONTES, CÉSAR e BERALDO, 2005).

Figura 6: Estrutura química da cisplatina.



Atualmente a cisplatina é utilizada no tratamento de câncer testicular (taxa de cura de até 90%), de ovário, bexiga, câncer de pulmão, de colo e de útero, linfomas, mielomas, entre outros (ALDERDEN, HALL e HAMBLEY, 2006).

O agente antineoplásico cisplatina age como um alquilante se ligando a dupla hélice de nDNA através de pontes formadas a partir da sua reação com o aminoácido guanina, essa interação cisplatina-nDNA inibe a replicação e transcrição do nDNA impedindo a duplicação celular e a proliferação de células tumorais (WANG e LIPPARD 2005).

O uso da cisplatina é restrito, atualmente, devidos efeitos secundários causados, tais como: nefrotoxicidade (diminuição da função renal), neurotoxicidade (danos no sistema nervoso), ototoxicidade (perda auditiva) e mielossupressão (redução na atividade da medula óssea). Outro grave efeito causado pela cisplatina é a capacidade do tumor desenvolver resistência ao agente antineoplásico (WHEATE, *et al.*, 2010).

Para reduzir ou até mesmo acabar com os efeitos indesejados de toxicidade e resistência celular, causados pelo uso de cisplatina no tratamento de câncer, novos fármacos anticâncer a base de platina vem sendo estudados, a fim de melhorar a qualidade de vida e as taxas de sobrevivência para pacientes com câncer (WHEATE, *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

No trabalho proposto almejou-se o desenvolvimento de um sistema baseado em fluxo-batelada para o estudo de cinética de reações empregando microrganismo viável (*Saccharomyces cerevisiae* e/ou *Zymomonas mobilis*) como sistema padrão para a avaliação da cronologia de desencadeamento dos mecanismos de resistência frente à fármacos à base de platina, sendo para este último, utilizado o padrão antineoplásico (anti-mitótico) cisplatina (CDDP).

3.2 Específicos

- Desenvolver a programação do sistema fluxo-batelada de acordo com as necessidades e utilização do sistema proposto.
- Propor uma metodologia que viabilize a utilização do sistema fluxo-batelada para cinética de crescimento dos microrganismos testados.
- Avaliar o tempo de desencadeamento da resistência, frente ao quimioterápico CDDP, para alguns microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* e/ou *Zymomonas mobilis*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções e reagentes

Para a calibração do sistema fluxo-batelada foi utilizada água destilada e corante azul de metileno na concentração 10^{-5} mol.L⁻¹.

Nos testes com microrganismos foram utilizados os meios de cultura YPD (para a *Saccharomyces cerevisiae*) e SDL (para a *Zymomonas mobilis*). Para verificar a pureza dos meios SDL e YPD foi utilizado um meio de cultura denominado ágar nutritivo (AN).

4.2 Microrganismos

Foram utilizadas culturas puras da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da bactéria *Zymomonas mobilis*, sendo a primeira obtida no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e a última obtida no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.3 Meios de manutenção das culturas

Os estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* foram repicados para tubos inclinados com meio Sabouraud sólido e incubados em estufa, durante 24 a 48h, a 27 °C, depois eram mantidos sob refrigeração.

As linhagens da bactéria *Zymomonas mobilis* foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio SDL na proporção 1:10, incubadas em estufa, durante 24 a 48h, a 27 °C, depois eram mantidos sob refrigeração.

4.4 Inóculos

As células de *Saccharomyces cerevisiae* eram transferidas dos tubos contendo meio Sabouraud sólido com alça de platina para a câmara de reação contendo 2 ml de meio de cultura YPD em ambiente estéril com chama de bico de Bunsen, depois a câmara era fechada e mantida sob agitação constante durante 24 h a temperatura ambiente.

As cepas bacterianas de *Zymomonas mobilis* eram preparadas em tubos de ensaio contendo meio SDL na proporção 1:10, sendo transferidos 2ml para uma câmara de reação fechada, via sistema fluxo-batelada, e mantida sob agitação constante durante 24h a temperatura ambiente.

Para os testes manuais a bactéria *Zymomonas mobilis* era preparada em Erlenmeyers contendo meio SDL na proporção 1:10, mantidos a 30 ° C em estufa e 150 rpm em shaker de agitação.

4.5 Meios de cultura

Para conservação das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizou-se meio Sabouraud sólido com a seguinte concentração: peptona de carne a 0,5% (m/v), peptona de caseína a 0,5% (m/v), glicose a 2% (m/v) e ágar a 1,5% (m/v). A manutenção dessa levedura foi realizada com meio de cultura YPD (Levedura Peptonada Dextrose) na seguinte composição: extrato de levedura a 1% (m/v), peptona a 2% (m/v) e glicose a 2% (m/v).

As culturas de *Zymomonas mobilis* foram mantidas em meio de cultura SDL (Sacarose Dextrose Extrato de Levedura) com a seguinte composição: glicose 2% (m/v) e extrato de levedura 0,5 % (m/v).

Os testes para comprovar a esterilidade dos meios de cultura utilizados e verificar a pureza das culturas testadas foram realizados em placas de Petri contendo meio Ágar nutritivo em sua forma sólida utilizando semeadura em estrias com swab. O meio Ágar nutritivo utilizado possuía a seguinte composição: extrato de carne 0,3 % (m/v), peptona de carne 0,5 % (m/v) e agar 1,5% (m/v).

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

4.6 Acessórios do sistema fluxo-batelada

O analisador em fluxo batelada proposto é constituído de unidades básicas tais como, sistema de propulsão e injeção de fluidos, sistema de mistura, sistema de detecção e sistema de controle.

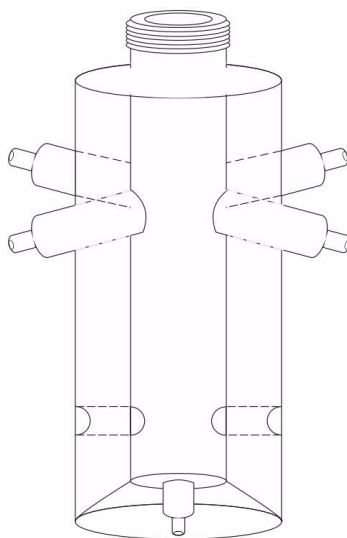
O sistema de propulsão de fluidos serve para impulsionar os líquidos por diversos canais mantendo a vazão constante e o sistema de injeção tem por função adicionar volumes pré-definidos de amostras, reagentes ou soluções a câmara de mistura. As mini-bombas de solenoide possuem as funções de propulsão e injeção de fluido, as mesmas foram utilizadas no sistema proposto e possuíam volumes ajustáveis entre 5 e 200 μL por pulso. Em tal sistema foram utilizadas três mini-bombas, sendo uma responsável pela

entrada da droga anti-câncer (cisplatina), outra usada no meio de cultura e a terceira ficou responsável pelo esvaziamento da solução no interior da câmara de reação.

Nesse sistema foi utilizada uma câmara de mistura constituída por um cilindro fabricado com material PTPE (Teflon®) cujo volume interno era de aproximadamente 2 mL. A câmara possuía quatro entradas e uma saída, no seu interior estava presente uma barra magnética para agitação constante da solução. A barra magnética utilizada era do tipo lisa com 5 mm de diâmetro por 15 mm de comprimento.

A FIGURA 7 ilustra a câmara de mistura/reacção utilizada nesse sistema fluxo batelada.

Figura 7: Câmera de mistura / reação.



A fim de eliminar possíveis contaminações externas a câmara de reação foi coberta por uma tampa de mesmo material fechado por rosqueamento. A câmara de reação era posicionada sobre um agitador magnético (marca IKA, modelo Lab Disc White) responsável pela agitação da mistura.

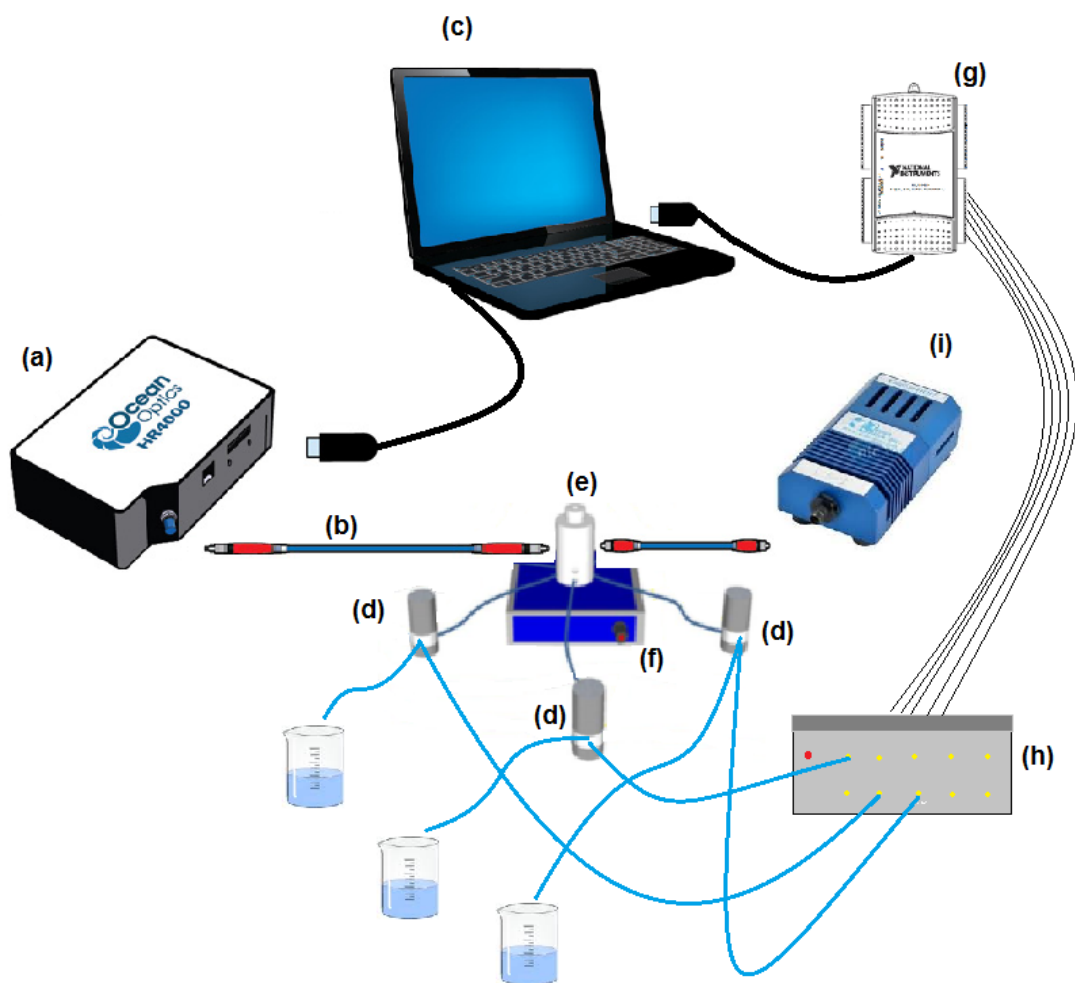
O sistema de detecção era constituído por um espectrofotômetro UV-vis da marca Ocean Optics® modelo USB 4000 acoplado a uma lâmpada de tungstênio-halogênio de mesma marca e modelo LS-1-LL por meio de fibras óticas com 50 e 300 µm de diâmetro interno. O espectrofotômetro foi utilizado para medir a redução da transmissão da luz no meio, causado pela formação de biomassa produzida pelo microrganismo utilizado. Os valores experimentais foram obtidos através da absorbância medida no espectrofotômetro.

Para o controle do sistema utilizou-se um microcomputador portátil, o qual foi conectado um circuito integrado CI ULN 2803 com arranjo de oito transistores e amperagem de 1 A, construído no laboratório que permite o controle simultâneo de até sete portas de saída. O sistema era alimentado por uma fonte de tensão contínua interligada ao próprio acionador com cerca de 12V.

As portas de entrada do acionador ULN 2803 foram conectadas a interface serial NI USB-6210. Essa interface serial permite a comunicação do acionador com o computador via cabo USB onde são acionados os comandos em nível lógico (0 ou 1), para ligar ou desligar as portas de saída conectadas as mini-bombas solenoide. Nesse sistema foi utilizada uma interface da marca National Instruments® modelo NI USB-6210. O dispositivo NI USB-6210 de série M é um módulo multifuncional de aquisição de dados (DAQ) com alimentação por barramento e interface USB. Esse dispositivo possui 16 entradas analógicas sendo 4 linhas de saída digital, 4 faixas de entrada programável ($\pm 0,2$ a ± 10 V) e dois temporizadores.

A FIGURA 8 ilustra um esquema o sistema fluxo-batelada empregado para o estudo de cinética de reações empregando microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* e/ou *Zymomonas mobilis* para a avaliação da cronologia de desencadeamento dos mecanismos de resistência à fármacos à cisplatina.

Figura 8: Esquema de um sistema fluxo batelada. (a) Espectrofotômetro; (b) Fibra óptica; (c) Computador; (d) Mini-bombas de solenóide; (e) Câmara de reação; (f) Agitador magnético; (g) Interface serial; (h) Acionador das mini-bombas; (i) Lâmpada de Tungstênio-halogênio.



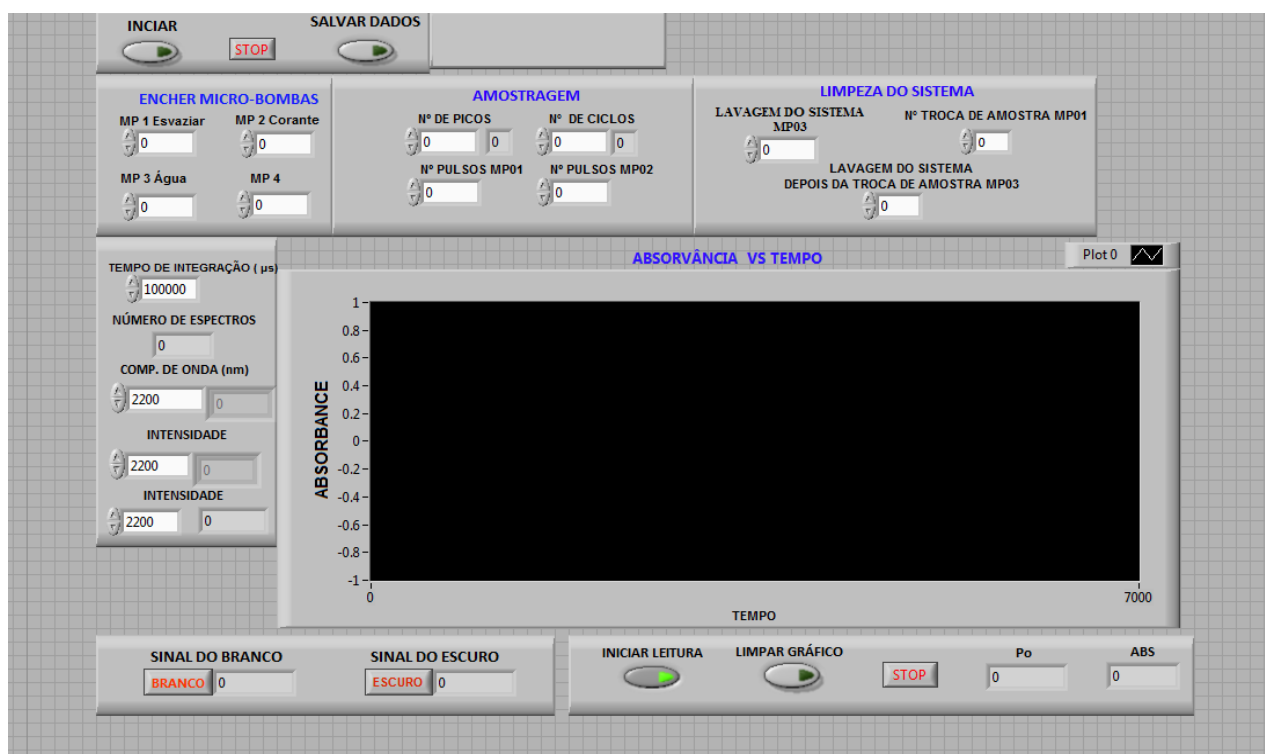
No presente trabalho o programa de linguagem gráfica utilizado foi o LabVIEW® na sua versão 8.6 para a interface com o usuário.

O volume de solução inserido pela mini-bomba na câmara de mistura era proporcional a quantidade de pulsos relacionados a abertura e fechamento da solenoide.

Na interface do programa de controle também era possível observar graficamente a resposta analítica, em tempo real, cujo gráfico obtido relaciona quantidade de radiação absorvida versus tempo de análise.

A FIGURA 9 apresenta-se a interface com o usuário para o controle do sistema em fluxo-batelada proposto.

Figura 9: Interface do programa LabVIEW® versão 8.6.



4.7 Procedimentos Experimentais

4.7.1 Calibração das mini-bombas solenoide e da câmara de fluxo batelada

Inicialmente, foi realizado o procedimento de calibração das mini-bombas solenoide utilizadas no sistema proposto. Para tanto, pesou-se um béquer vazio e, posteriormente, foram adicionados 100 pulsos de água ao mesmo béquer e anotado o novo peso. A diferença entre esses valores com as unidades de grandezas adequadas determinaram os ajustes do volume por pulso de cada mini-bomba, considerando a densidade da água como sendo $1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

Após os ajustes dos volumes das mini-bombas, realizou-se um teste para avaliar volume da câmara de reação.

Avaliou-se o sistema proposto empregando uma solução de azul de metileno na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ monitorando a leitura de absorção do corante à 600 nm. Esses testes foram realizados com o intuito de verificar até onde a leitura de absorbância era eficaz, ou seja, a quantidade mínima de solução presente na câmara que fosse capaz de gerar o sinal de absorbância x tempo de forma coerente com os dados obtidos na literatura.

Na câmara de reação foi adicionada água destilada como branco, através do acionamento da mini-bomba P₃ por um tempo de 9 segundos o que equivale a 45 pulsos. Após determinação da linha de base a câmara foi esvaziada acionando a mini-bomba P₁ por um tempo de 10 s, equivalente a 50 pulsos. A mesma foi preenchida com azul de metileno pelo acionamento da mini-bomba P₂ por 9 segundos (45 pulsos), posteriormente metade do volume de azul de metileno foi aspirado da câmara (acionamento de P₁ com 22 pulsos) e o volume completado com água destilada (acionamento de P₃ com 22 pulsos), essa diluição foi realizada 9 vezes, sob agitação magnética constante.

Para realizar essas diluições foram usadas as sequências de acionamento das mini-bombas mostradas na TABELA 1. As etapas (a-c) correspondem aos testes de diluição usando água destilada e azul de metileno. Na etapa c ocorre o esvaziamento da câmara de reação.

Tabela 1 : Sequência de acionamento das mini-bombas solenóide

Analitos	Etapas	P₁	P₂	P₃	Pulsos	Tempo (s)	Volume total inserido na câmara (µL)
Água/ suspensão de <i>Z.mobilis</i>	a	0	0	1	45	9	1980
Corante	b	0	1	0	45	9	2025
Esvaziar	c	1	0	0	50	10	2250
Meio de cultura YPD		0	1	0	45	9	2025

0: desligado; 1: ligado

Após ajustado, o sistema foi utilizado para determinar o perfil cinético de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da bactéria *Zymomonas mobilis* nas mesmas condições estabelecidas, mas sem a presença do corante.

4.7.2. Testes com os microrganismos

Para testes utilizando as leveduras, realizou-se o acionamento da mini-bomba P₂ (meio de cultura) por um tempo de 9s o que equivale a 45 pulsos. Foi lido o sinal do escuro e depois o sinal do branco com o YPD. Posteriormente, foi inoculada uma cultura de *S. cerevisiae* a câmara com o meio YPD e foi lido o sinal analítico da amostra. Esse sistema fluxo-batelada ficou sob agitação constante por um período de 24h realizando leituras de absorbância versus tempo a cada 0,1s.

Para teste realizado com a bactéria *Zymomonas mobilis*, dentro da câmara de reação, utilizou o acionamento da mini-bomba P₂ (com meio de cultura SDL) por um tempo de 9 s o que equivale a 45 pulsos. Foi lido o sinal do escuro e, em seguida, o sinal do branco com o SDL. Posteriormente, foi preparada uma suspensão de *Zymomonas mobilis* com 1 ml da bactéria já repicada e 9 mL de meio de cultura SDL, tal suspensão foi obtida em condições estéreis. Após se obter a linha de base com o meio de cultura SDL, a câmara de reação foi esvaziada acionando-se a mini-bomba P₁ por 10 segundos (50 pulsos) e, posteriormente, completada com a suspensão preparada de *Zymomonas mobilis* através do acionamento da mini-bomba P₃ por 9 segundos (45 pulsos). Esse sistema fluxo-batelada ficou sob agitação constante por um período de 24h realizando leituras de absorbância versus tempo a cada 0,1s.

Foram realizados testes para avaliar a resistência do microrganismo frente ao uso de drogas antineoplásicas nas concentrações 5, 10 e 20 µL. Para tais testes foi utilizado o procedimento descrito acima para a *Zymomonas mobilis*, com acréscimo de cisplatina à câmara de reação após adição da suspensão da bactéria. A adição da droga inorgânica foi feita através do acionamento da mini-bomba P₄ com 1, 2 e 4 pulsos respectivamente. O sistema ficou sob agitação constante no período de 24 h.

4.7.2.1 Testes manuais usando a bactéria *Zymomonas mobilis*

A fim de analisar a resistência da bactéria *Z. mobilis* frente ao uso da cisplatina fez-se o uso de testes manuais, pois o sistema fluxo-batelada mostrou limitação nas leituras de absorbância após 24 h de teste.

Inicialmente, uma cepa de *Z.mobilis* foi cultivada em meio SDL por um período de 3 dias. Cada curva de crescimento era obtida a partir dos valores de absorbância lidos a cada 2 horas num período de 24 h. Após atingir toda a fase exponencial de crescimento, parte da suspensão bacteriana era desprezada ficando apenas 10 % de inóculo como linhagem para crescimento. A esse inóculo era acrescentado meio de cultura SDL até atingir o mesmo volume final de suspensão usado no primeiro dia de teste e posteriormente se iniciavam as leituras de absorbância, tal processo de re-alimentação do microrganismo foi realizado durante dois dias para obtenção das três curvas de crescimento pré-estabelecidas.

Para os testes de avaliação de resistência da bactéria foram usadas concentrações de 5, 10 e 20 μL de cisplatina postas na suspensão de células bacterianas. O procedimento de construção da curva de crescimento segue o padrão descrito acima, ou seja, leituras a cada 2 h até o microrganismo atingir toda a fase exponencial de crescimento. Após atingir tal fase parte da suspensão bacteriana foi desprezada restando apenas 10 % de inóculo no qual era re-alimentado com meio SDL até volume final igual ao usado no primeiro dia de teste, e posterior acréscimo da droga inorgânica. Foi estabelecido que os testes deveriam ser realizados até o microrganismo obter resistência à droga inserida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do crescimento celular foi realizada empregando a detecção turbidimétrica, pois ao se multiplicar o microrganismo produz partículas de tamanhos maiores que provocam a redução da quantidade de luz

(radiação transmitida), turvando a solução. A radiação não dispersa é registrada no espectrofotômetro e lida como absorbância, onde sua representação está indicada na Equação 4.

$$\text{Abs} = \log (I_0/I) \quad (4)$$

Onde:

Abs = Absorbância

I_0 = Intensidade da luz incidente

I = Intensidade da luz transmitida pela suspensão de células

Alguns fatores podem afetar a leitura do valor de absorbância, tais como: quantidade de luz que atravessa a suspensão, tamanho das partículas geradas, comprimento de onda da luz incidente e diâmetro da câmara de reação.

Os comprimentos de onda mais curtos, região azul do espectro, permitem uma maior sensibilidade nas leituras de absorbância. Porém em suspensões celulares densas as medidas de absorbância são mais precisas em leituras realizadas com comprimentos de onda mais longos, região vermelha do espectro que corresponde a uma absorbância de aproximadamente 660 nm, isso ocorre porque nesta faixa de comprimento de onda é gerada uma menor dispersão de luz.

5.1 Ajustes das mini-bombas solenoide e da câmara de fluxo batelada

A calibração do volume bombeado pelas mini-bombas e a capacidade volumétrica da câmara de fluxo-batelada foram realizadas em testes preliminares usando água destilada e azul de metileno como soluções-testes, e os resultados das análises estão apresentados na TABELA 2. De acordo com os resultados apresentados nesta tabela, pode-se observar que as mini-

bombas apresentam-se reprodutíveis, com RSD (desvio padrão relativo) inferiores a 3% para as três mini-bombas estudadas.

Tabela 2: Capacidade das mini-bombas e da câmara de reação com seus respectivos desvios-padrão

	Mini-bomba 1 (μL)	Mini-bomba 2 (μL)	Mini-bomba 3 (μL)	Câmara de reação (mL)
Capacidade	43,909	42,986	43,501	2,003
	45,001	45,518	43,552	2,005
	46,015	45,582	44,424	2,007
	45,03	45,879	45,015	2,002
	45,687	45,984	44,614	2,005
média	45,128	45,190	44,221	2,004
desvio	0,808	1,25	0,70	0,002
RSD %	1,79	2,76	1,51	0,87

Na construção da câmara de fluxo-batelada estabeleceu-se que a mesma deveria ter um volume de aproximadamente 2,0 mL. Neste sentido, acionou-se a mini-bomba P₃ com 45 pulsos para verificar o volume da câmara. Para tanto, realizou-se o mesmo procedimento para verificar o volume inserido da mini-bomba por pulso, pesou-se a câmara vazia e, posteriormente, cheia com água. Nota-se um RSD inferior a 1%, demonstrando, novamente, a repetibilidade da mini-bomba e confirmou-se o volume de 2,0 mL como capacidade máxima da câmara.

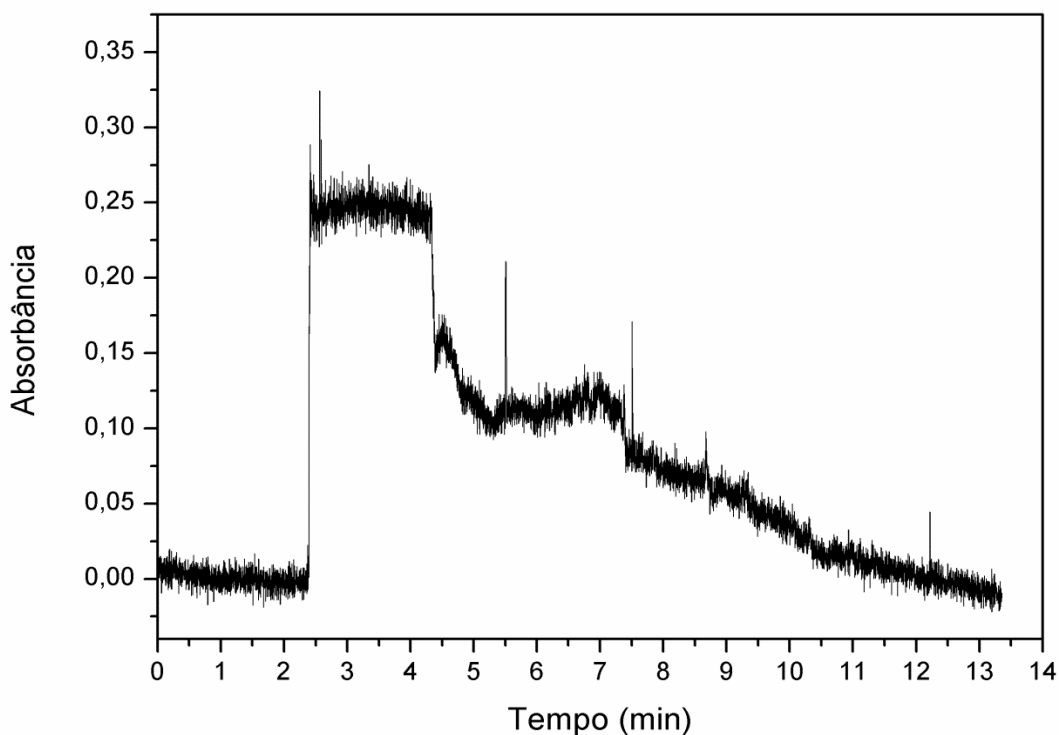
Após calibração das mini-bombas e determinação da capacidade máxima da câmara de reação, foram realizados testes de diluição com água destilada e corante azul de metileno, para simular o que o processo de adição de meio de cultura à microrganismos, pois almeja-se monitorar o perfil de crescimento de organismos vivos, e os resultados são mostrados na Figura 9.

Pode-se observar na FIGURA 10 que o sistema está respondendo conforme o esperado, pois como a amostra (azul de metileno) está sendo diluída à aproximadamente 50% (v/v) do seu volume inicial. A tendência desse

processo é que a leitura de absorvância se iguale a leitura do branco, após sucessivas diluições e, este fato pode ser observado nesta Figura.

Os resultados também mostraram que é possível obter a leitura de absorvância com no mínimo 20 % (em volume) da capacidade total da câmara. O volume da câmara é limitado pela altura onde está posicionada as respectivas fibras óticas para o transporte da radiação da fonte de radiação até a câmara e, da câmara até o detector.

Figura 10: Testes de diluição com água destilada e corante azul de metileno 10^{-5} mol.L⁻¹

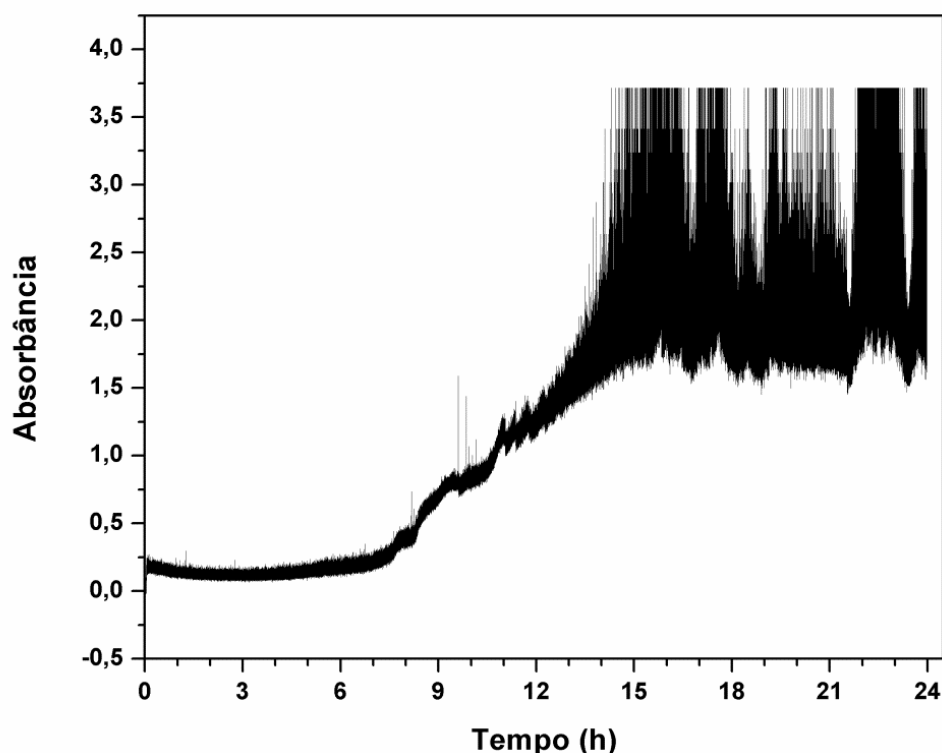


5.2 Testes com as leveduras

Após os ajustes dos parâmetros instrumentais foram realizados testes com a levedura na presença do meio de cultura YPD para determinação do perfil cinético de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de controle. Os valores de absorvância eram obtidos a cada 0,1 s. O crescimento da cultura de *S.cerevisiae* foi monitorado em 600 nm.

A resposta do perfil de crescimento da levedura apresentado na FIGURA 11 possui o perfil esperado para uma curva de crescimento de *S.cerevisiae*, porém após 12 h de fermentação o sinal obtido se apresenta de forma ruidosa, isso pode ser devido ao tamanho das partículas em suspensão (> 0,4 mm de diâmetro) e ocorre o efeito “backscattering”, ou seja, a radiação é refletida em direção a fonte de luz (LAWLER, 2005).

Figura 11: Perfil cinético de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, sem tratamento de dados, as leituras de absorbâncias foram realizadas a cada 0,1 s.

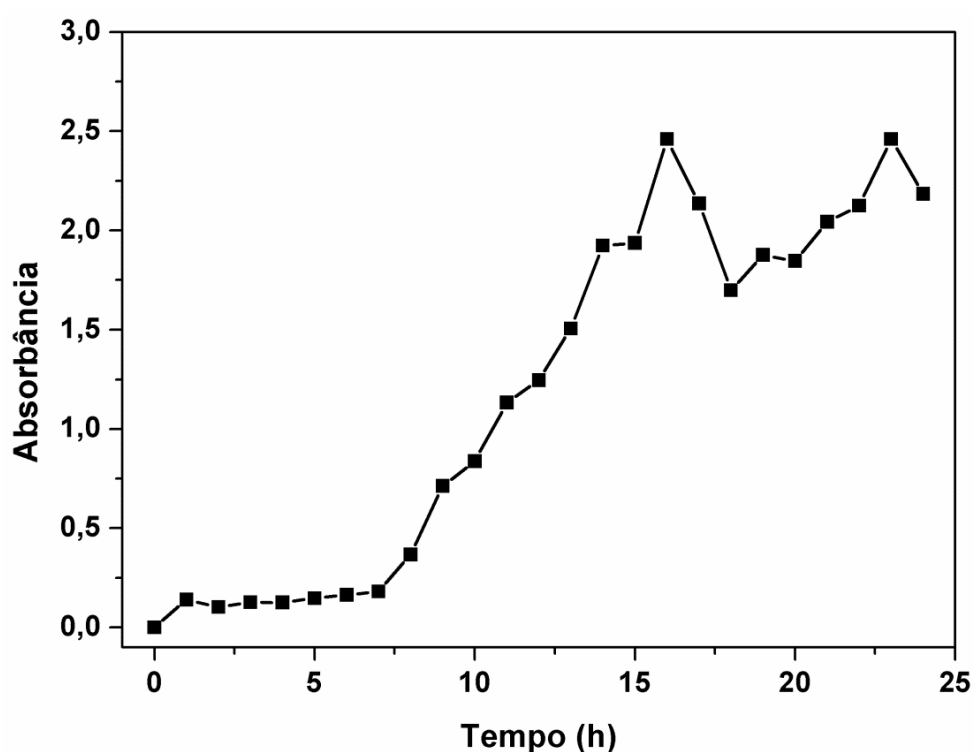


A fim de melhorar a visualização da curva de crescimento do microrganismo eliminando grande parte do ruído obtido, foram realizados ajustes no gráfico apresentado na FIGURA 12, através da redução do número de leituras. Normalmente nas curvas de crescimento de microrganismos são realizadas leituras de absorbância a cada 1 h durante um período total de 24h. Esse mesmo procedimento foi realizado para a curva de crescimento obtida na

FIGURA 12, a fim de reduzir ruídos e comparar o resultado obtido com os dados encontrados na literatura e os resultados são apresentados na FIGURA 11.

Na FIGURA 12, pode-se observar que nas 7 h iniciais de experimento a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se encontra na fase inicial de crescimento, (fase latência ou fase lag). Nessa etapa, o microrganismo passa por uma adaptação frente às diferenças ambientais. Após 7 h de experimento a *S.cerevisiae* apresenta-se na fase exponencial de crescimento, ou fase log. Nessa etapa o microrganismo possui uma taxa máxima de crescimento.

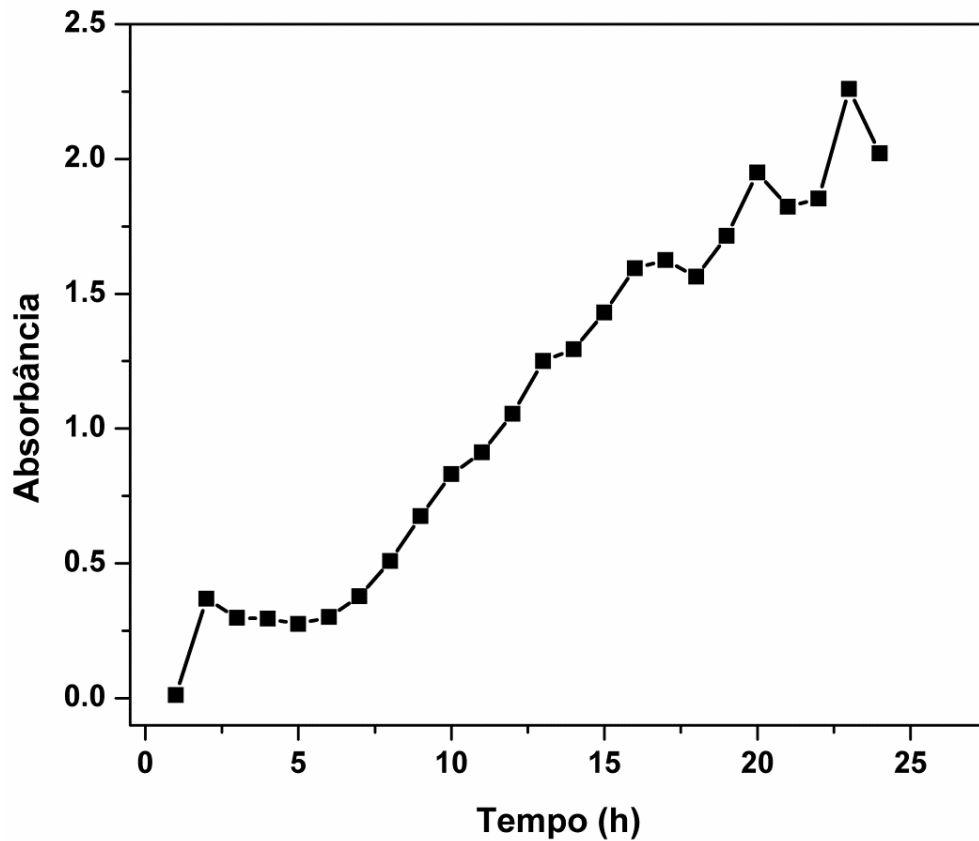
Figura 12: Perfil cinético de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, valores de absorbância obtidos a cada 1h.



Um teste posterior foi realizado variando a concentração inicial do inóculo, numa razão 1:2 (v/v). A finalidade desta diluição era retardar o tempo de geração da levedura, o tamanho e a quantidade de células presentes no

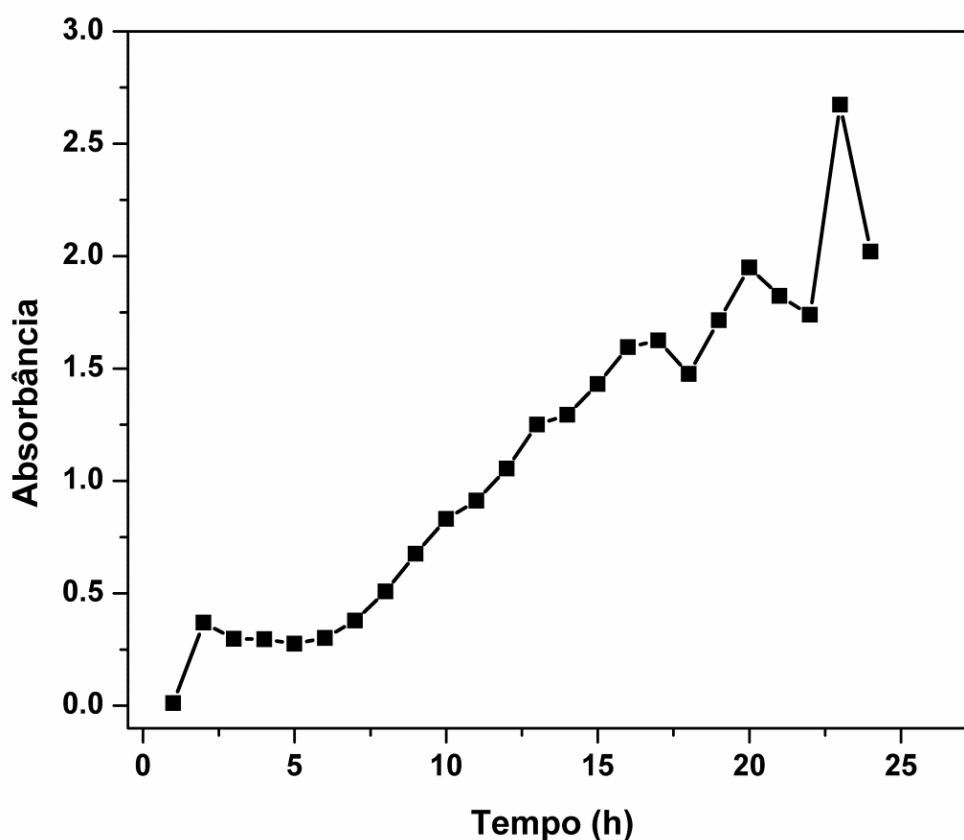
meio reduzindo assim o efeito de espalhamento da luz, conforme apresentado na FIGURA 13.

Figura 13 : Perfil de cinético de crescimento da *S. cerevisiae* com diluição 1:2 do inóculo.



Com intuito de reduzir ainda mais o ruído gerado pelo efeito de espalhamento da luz, um terceiro teste foi realizado com diluição 1:50 do inóculo inicial. O gráfico obtido encontra-se na FIGURA 14.

Figura 14: Perfil de cinético de crescimento da *S. cerevisiae* com diluição 1:50 do inóculo inicial



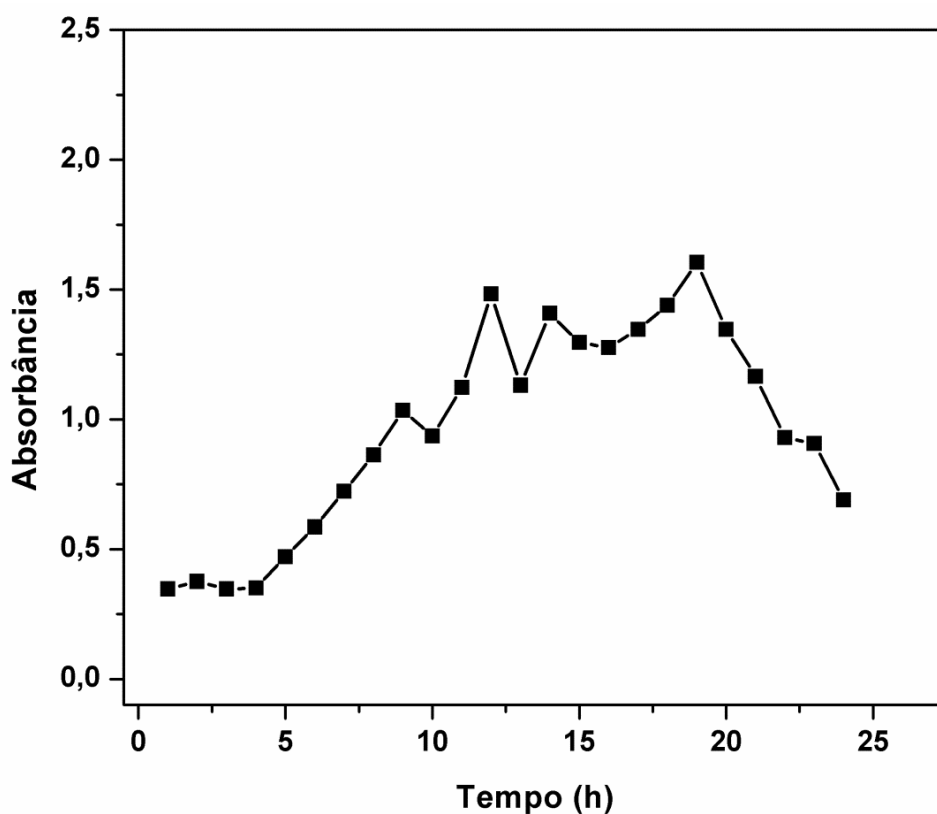
Os resultados mostraram que ao diluir a solução inicial de células em 1:2 (v/v) houve um retardamento no tempo de geração, ou seja, após as 24 h de fermentação um menor número de células foi produzido e uma menor quantidade de biomassa foi gerada. Assim a solução final ficou mais límpida que a solução concentrada, houve um menor espalhamento de luz (redução do efeito backscattering) e uma melhor relação sinal-ruído.

Na diluição 1:50 (v/v) praticamente não houve mudança em relação ao perfil cinético de crescimento do microrganismo, em comparação com a curva de crescimento obtida na diluição 1:2 (v/v), devido a concentração de células já serem extremamente baixa no início do processo de fermentação de ambos testes.

Durante a execução dos testes notou-se que a agitação magnética interferia no sinal de absorbância obtido, pois o agitador magnético ora tocava

na luz advinda da fibra ótica, ora formava vórtex. Então foi realizado um teste sem agitação magnética (FIGURA 15) para visualizar até que ponto a levedura era capaz de sobreviver.

Figura 15: Perfil cinético de crescimento da *S.cerevisiae* sem agitação da solução contida na câmara.



Pode observar na FIGURA 15 que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* obteve um crescimento celular por cerca de 12,5h de fermentação, após esse tempo, o microrganismo passou a ser depositado no fundo da câmara de reação.

A turbidimetria foi utilizada como método de análise para determinar o crescimento do microrganismo, através das medidas de absorbância foi possível determinar o aumento gradual no crescimento celular, porém quando as células das leveduras obtinham tamanhos grandes e geravam uma

quantidade significativa de biomassa, o espalhamento da luz na suspensão aumentava, causando o que chama de efeito backscattering. Esse efeito produz uma reflexão difusa, na qual o ângulo da luz incidente é desviado gerando um espalhamento múltiplo.

Para reduzir os efeitos de espalhamentos (efeitos *backscattering*) decidimos usar a bactéria *Zymomonas mobilis* nos testes posteriores, pois a mesma produz uma menor quantidade de biomassa comparada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e ambas por conterem ortólogos com seres humanos são utilizadas como microrganismo modelo na biologia celular.

5.3 Testes com a *Zymomonas mobilis* em sistemas fluxo batelada

A bactéria *Zymomonas mobilis* é um microrganismo não patogênico com tempo de geração que varia de 90 a 120 minutos e que possui mobilidade em relação a *S. cerevisiae*.

O teste preliminar realizado com a *Zymomonas mobilis* consistia em analisar a pureza dos meios de cultura utilizados como fonte de nutrientes para o desenvolvimento de tal microrganismo. O meio de cultura SDL, usado como fonte nutritiva para *Z.mobilis*, foi inoculado em placas de Petri contendo agar nutritivo sólido, meio de controle (FIGURA 16).

Figura 16: Placas de Petri com agar nutritivo (AN) usado para controle do meio de cultura SDL.

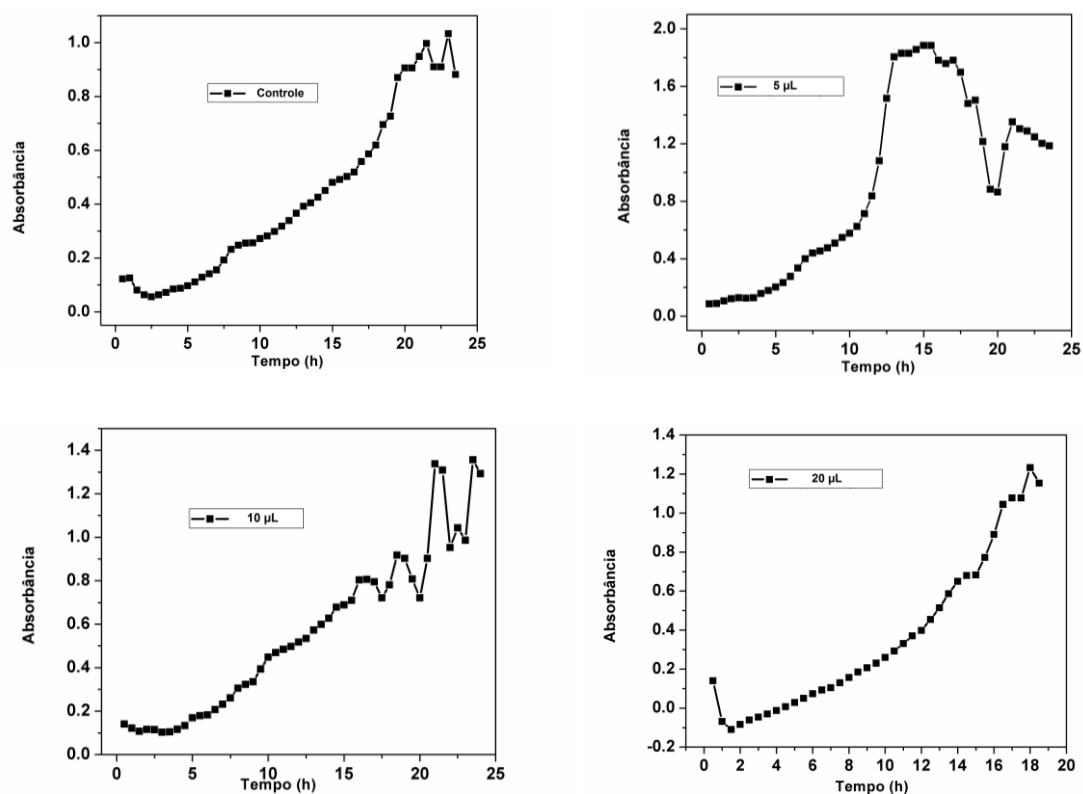


A FIGURA 16 mostra que as placas de Petri não apresentaram contaminação, logo o meio de cultura estava livre de contaminantes e poderia ser utilizado como nutriente nos testes posteriores com a *Zymomonas mobilis*.

Após certificação da pureza do meio de cultura SDL, testes posteriores foram realizados com intuito de analisar o crescimento celular e a resistência da bactéria *Zymomonas mobilis* a diferentes concentrações de cisplatina. Foram feitos cultivos durante um período de 24h no sistema fluxo-batelada à temperatura ambiente. Os cultivos foram inoculados diretamente em meio SDL contendo 0, 5, 10 e 20 μL de cisplatina (FIGURA 17).

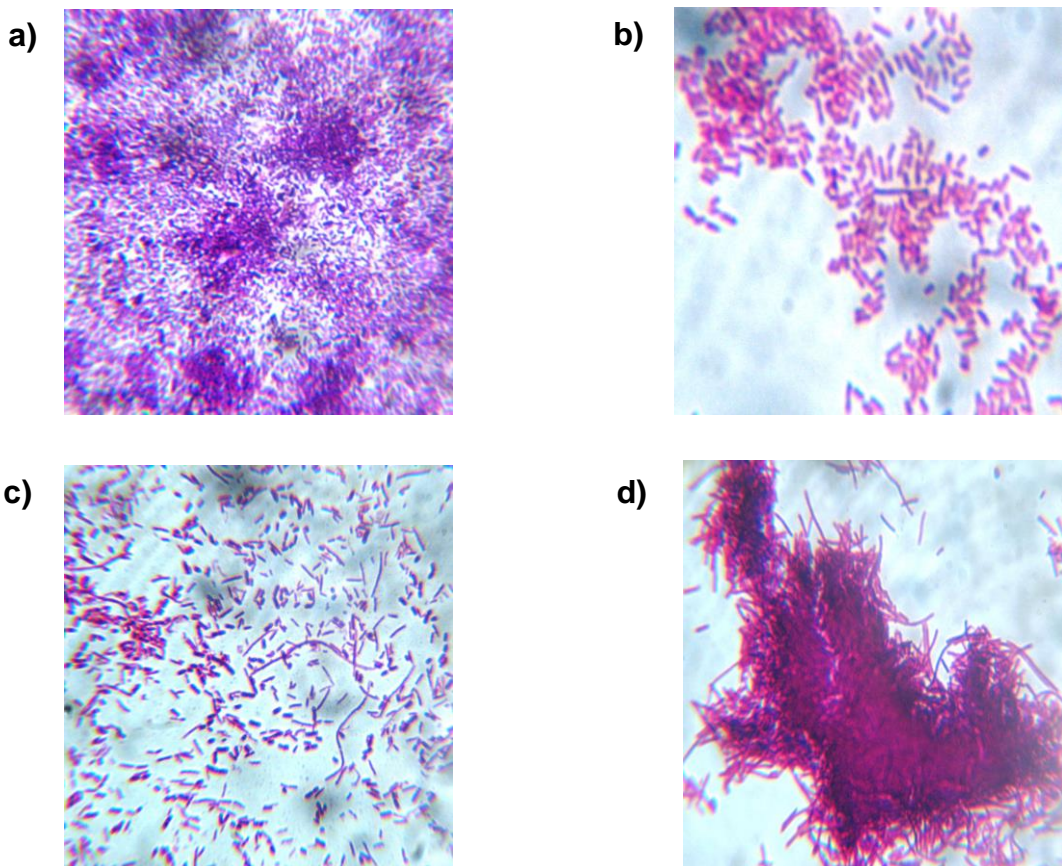
A amostra de nome controle representa a suspensão de bactéria apenas em meio SDL, sem uso de cisplatina.

Figura 17: Análise turbidimétrica em sistemas fluxo-batelada realizada com cultivos de *Z. mobilis* nas concentrações 0, 5, 10 e 20 μL de cisplatina, respectivamente.



O aumento da concentração da droga antineoplásica (cisplatina) causou inibição na divisão celular da bactéria, assim, em função do tempo, o microrganismo ao invés de se dividir se alongava formando extensos filamentos até aglomerações, como pode ser observado na FIGURA 18. Apesar de haver crescimento celular, parte dos valores de absorbância medidos por turbidimetria aumentaram seu valor devido a esse alongamento das células bacterianas e não devida divisão celular propriamente dita.

Figura 18: Efeito da droga antineoplásica em diversas concentrações de cisplatina nos inóculos de *Zymomonas mobilis*. **a)** Controle, ou seja, apenas a suspensão de bactéria em meio de cultura sem uso de cisplatina, **b)** 5 μL de cisplatina, **c)** 10 μL de cisplatina e **d)** 20 μL de cisplatina.



Observa-se na FIGURA 18, que com o aumento da concentração da cisplatina no inóculo de *Z.mobilis* houve um aumento no tamanho do

microrganismo causado pela interrupção da divisão celular. Na concentração de 20 µL de droga o microrganismo aumentou de tamanho e formou aglomerados que por sua vez interferiram na leitura de absorvância causando dispersão da radiação eletromagnética proveniente da fonte de luz, com isso a análise turbidimétrica para essa concentração só pôde ser realizada até cerca de 19 h de cultivo.

Apesar da droga antineoplásica inibir a divisão celular da bactéria, a mesma não impede, por completo, processo de crescimento da *Z.mobilis*, isto para as concentrações utilizadas. A TABELA 3 mostra as contagens de células vivas da bactéria *Zymomonas mobilis* feitas em câmara de Neubauer.

Tabela 3: Contagem microbiana em câmara de Neubauer para o sistema fluxo-batelada

Amostras	Contagem, número de células totais vivas/mL
Controle	$5,0 \times 10^5$
5 µL de cisplatina	$4,1 \times 10^5$
10 µL de cisplatina	$3,8 \times 10^5$
20 µL de cisplatina	$2,1 \times 10^5$

A partir dos dados indicados na TABELA 3 nota-se que o número de células totais por mL de suspensão reduz com o aumento da concentração da cisplatina, confirmando novamente que o uso de droga antineoplásica inibe a divisão celular, com isso podemos concluir que a cisplatina tem potencial para ser utilizada como um agente antineoplásico capaz de reduzir ou até mesmo eliminar tumores de cancro, pois a mesma interfere na divisão celular de células tumorais podendo levar a morte celular.

No entanto, testes com um maior tempo de análises devem ser realizados para predizer até que ponto a cisplatina é eficaz na inibição da divisão celular de células tumorais, pois devido a formação de aglomerados celulares na suspensão microbiana houveram interferências nas leituras de

absorbância obtidas para tais amostras por tal motivo as análises só puderam ser realizadas em sistema fluxo-batelada em períodos de no máximo 24 h.

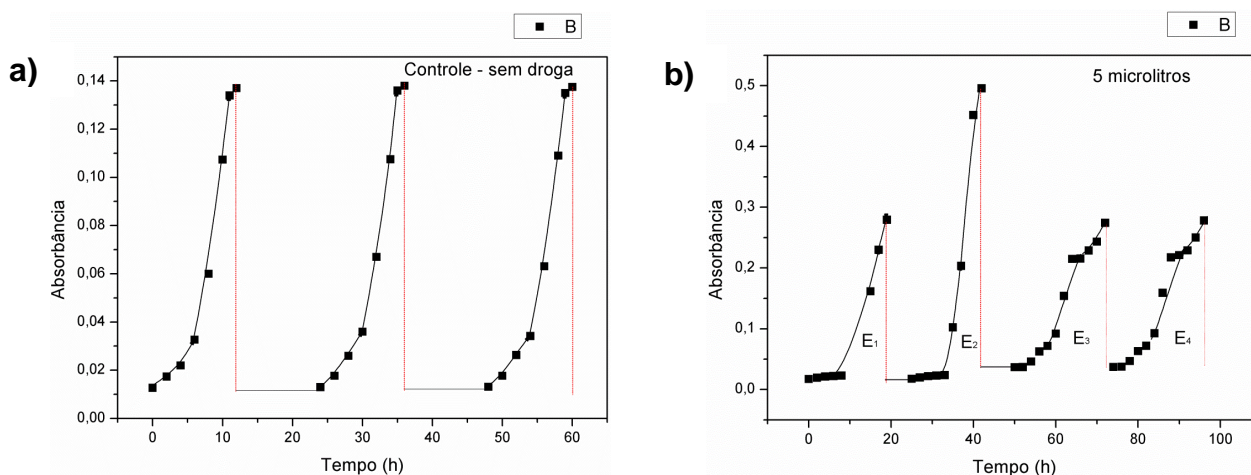
5.4 Efeito da resistência de *Z. mobilis* com uso de cisplatina

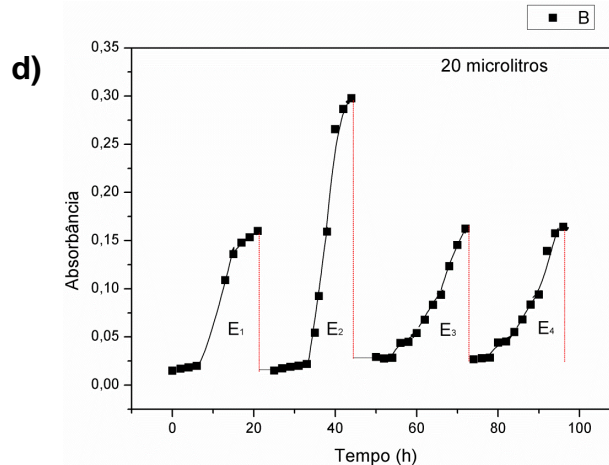
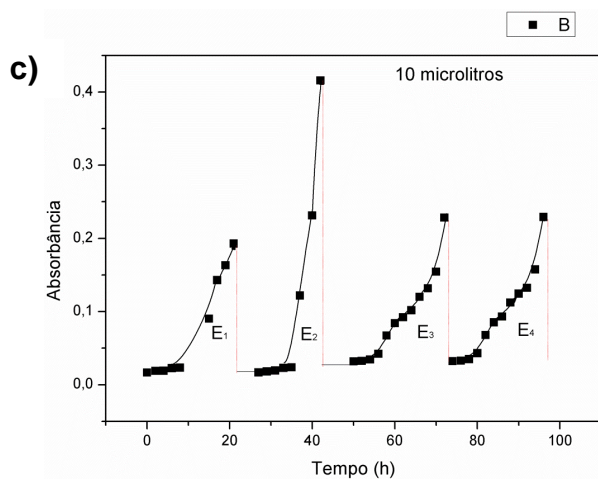
O efeito da resistência é causado pela ausência de resposta inibitória por parte de agentes antineoplásicos, frente a determinadas células tumorais, quando isso ocorre há uma adaptação de algumas células (resistentes) quanto às novas condições fisiológicas, referendo-se, inclusive, à presença de agentes antimetabólicos.

A fim de analisar a resistência de células tumorais frente ao uso de cisplatina como agente antineoplásico, foram realizados testes pilotos com a bactéria *Zymomonas mobilis* usada como modelo celular para estudar parâmetros cronológicos de resistência frente a CDDP.

Uma linhagem de *Z. mobilis* foi cultivada em meio SDL por três dias para ser usado como meio de controle para os demais testes (Figura 19a). Os testes de resistência microbiana foram realizados com *Zymomonas mobilis* em meio SDL na presença de cisplatina nas concentrações 5, 10 e 20 μL para cada 2 mL de suspensão bacteriana (Figuras 19 b,c e d).

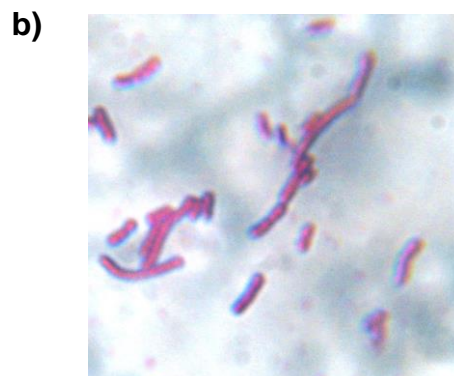
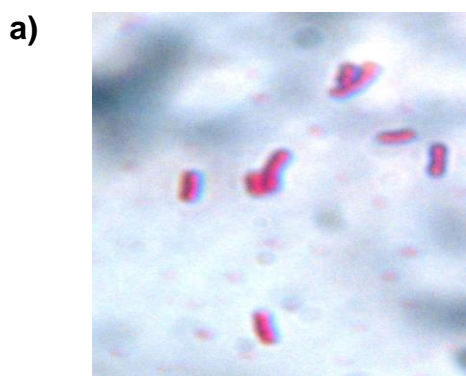
Figura 19: Análise turbidimétrica em cultivos de *Zymomonas mobilis*. **a)** Controle, ou seja, sem cisplatina, **b)** 5 μL de cisplatina, **c)** 10 μL de cisplatina, **d)** 20 μL de cisplatina.





A partir dos gráficos mostrados na FIGURA 19 podemos observar que nas amostras contendo antineoplásicos apresentaram maiores valores de absorbância na fase exponencial frente ao controle. Este fato ocorre devido aumento do tamanho dos microrganismos causados pela interrupção da mitose na metáfase, ou seja, ocorre o impedimento da divisão celular. Esse aumento de tamanho causado pelos agentes antineoplásicos pode ser notado nas FIGURAS 20, 21 e 22.

Figura 20: *Zymomonas mobilis* com 5 μ L do agente antineoplásico cisplatina, **a)** 1^o dia de teste, **b)** 2^o dia de teste, **c)** 3^o dia de teste, **d)** 4^o dia de teste.



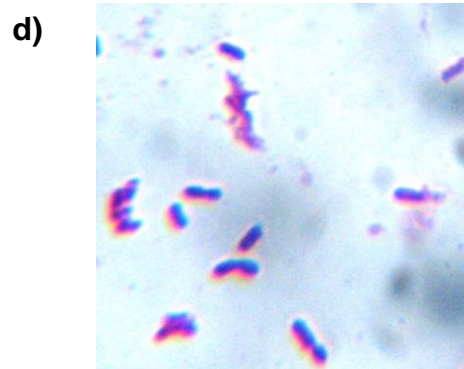
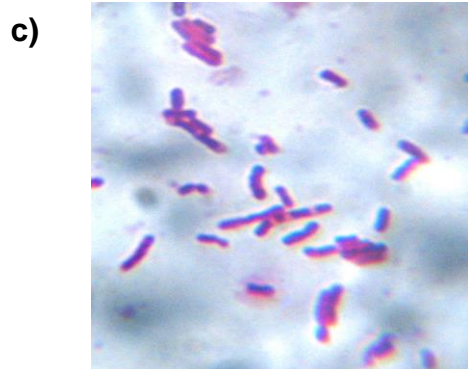


Figura 21: *Zymomonas mobilis* com 10 μ L do agente antineoplásico cisplatina, **a)** 1^o dia de teste, **b)** 2^o dia de teste, **c)** 3^o dia de teste, **d)** 4^o dia de teste.

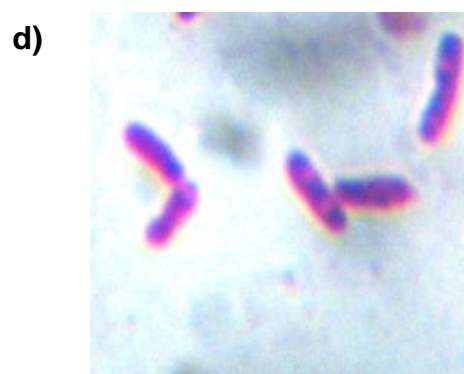
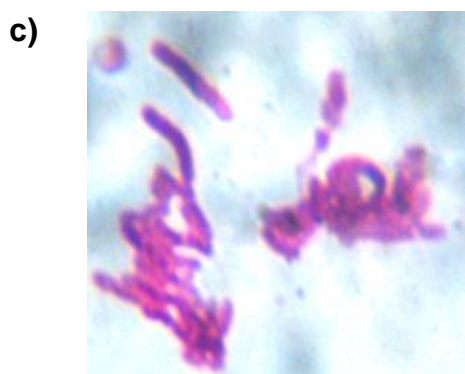
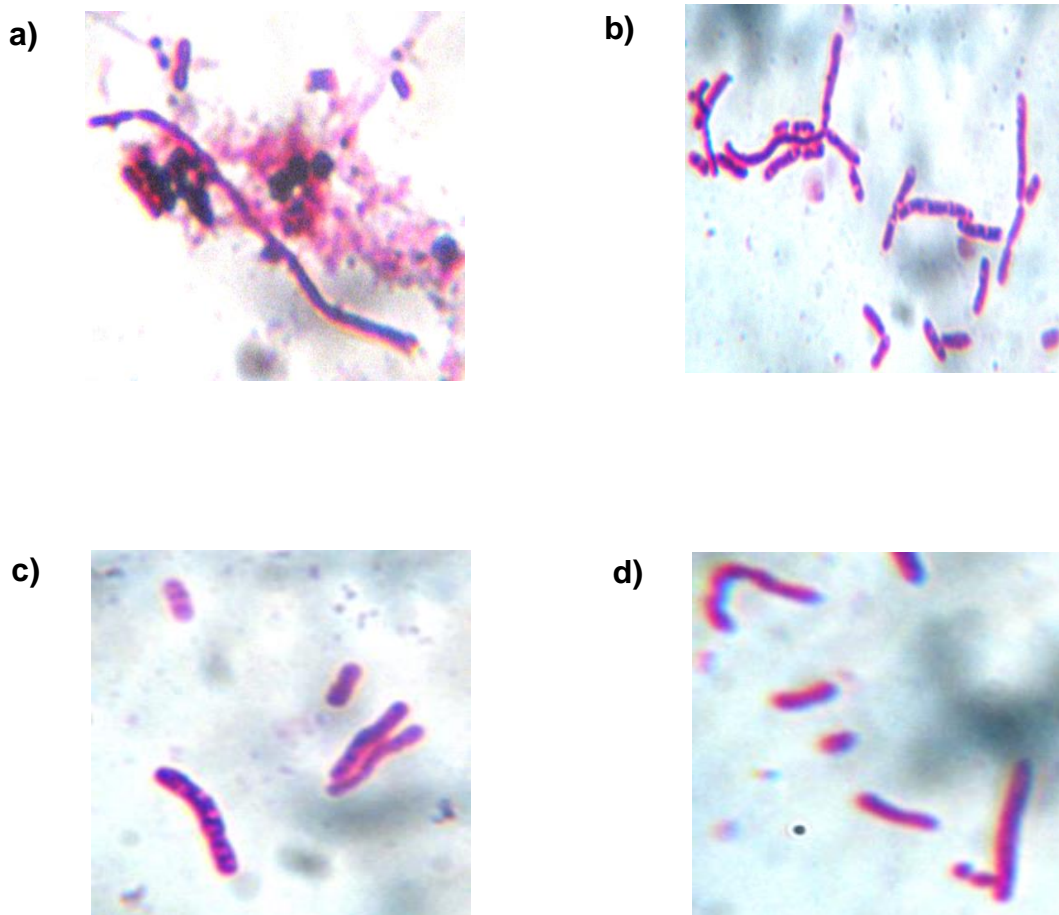


Figura 22: *Zymomonas mobilis* com 20 μ L do agente antineoplásico cisplatina, **a)** 1º dia de teste, **b)** 2º dia de teste, **c)** 3º dia de teste, **d)** 4º dia de teste.



A partir das FIGURAS 20, 21 e 22 podemos observar que os microrganismos aumentam de tamanho e tornam-se mais filamentosos com o aumento da concentração do agente antineoplásico na suspensão bacteriana. Nos dois primeiros dias de teste os microrganismos aumentam de tamanho e tornam-se mais filamentosos, tal efeito pode ser observado mais claramente no segundo dia de teste. No terceiro e quarto dia os microrganismos adquirem tamanhos menores e a quantidade de células filamentosas diminui.

As TABELAS 4, 5 e 6 mostram as quantidades de células filamentosas e não filamentosas presentes nas suspensões preparadas, essas contagens foram realizadas em câmara de *Neubauer*, tais tabelas contém ainda os

tempos dos eventos descritos pela letra “E” na FIGURA 19 para as diferentes concentrações de drogas utilizadas.

Tabela 4: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 5 µL de cisplatina

		Contagem de células (UFC/mL)	Tempo do evento (h)
1º dia	Filamentosas	$7,4 \times 10^5$	19
	Não Filamentosas	$4,2 \times 10^5$	
2º dia	Filamentosas	$3,1 \times 10^6$	17
	Não Filamentosas	$3,1 \times 10^5$	
3º dia	Filamentosas	$8,0 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$3,5 \times 10^6$	
4º dia	Filamentosas	$7,4 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$3,7 \times 10^6$	

Tabela 5: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 10 µL de cisplatina

		Contagem de células (UFC/mL)	Tempo do evento (h)
1º dia	Filamentosas	$8,6 \times 10^5$	21
	Não Filamentosas	$3,6 \times 10^5$	
2º dia	Filamentosas	$5,4 \times 10^6$	15
	Não Filamentosas	$2,6 \times 10^5$	
3º dia	Filamentosas	$5,9 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$5,0 \times 10^6$	
4º dia	Filamentosas	$5,7 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$5,2 \times 10^6$	

Tabela 6: Contagem microbiana e tempo do evento para testes com 20 µL de cisplatina

		Contagem de células (UFC/mL)	Tempo do evento (h)
1º dia	Filamentosas	$9,7 \times 10^5$	21
	Não Filamentosas	$2,3 \times 10^5$	
2º dia	Filamentosas	$6,6 \times 10^6$	19
	Não Filamentosas	$1,2 \times 10^5$	
3º dia	Filamentosas	$4,5 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$6,8 \times 10^6$	
4º dia	Filamentosas	$4,6 \times 10^4$	22
	Não Filamentosas	$6,9 \times 10^6$	

Podemos observar que nos dois primeiros dias de teste a contagem de células não filamentosas diminui enquanto que o número de células filamentosas aumenta, isso mostra que a droga está atuando nas células de *Zymomomas molibis* impedindo a sua divisão celular. Esse impedimento ocorre mais efetivamente com o aumento da concentração do antineoplásico no segundo dia de teste, nesta etapa são obtidos maiores valores de absorvância, devido aumento de células filamentosas, em um menor tempo do evento.

No terceiro e quarto dia de teste ocorre o inverso, ou seja, o número de células não filamentosas aumenta e a quantidade de células filamentosas diminui. Este fato pode ser devido a adaptação do microrganismo a droga, onde o microrganismo passa a sofrer resistência e se adaptar a droga testada voltando a sofrer divisão celular. Para se obter respostas mais conclusivas, a análise turbidimétrica requer maiores tempos do evento.

Para analisar até que ponto o agente antineoplásico é capaz de impedir a divisão celular foram realizados testes de resistência do microrganismo a diferentes concentrações do agente antineoplásico cisplatina. O cálculo para o tempo de resistência é dado pela equação 5 e os valores obtidos estão descritos na TABELA 7.

$$t_r = t_1 + t_2 \quad (5)$$

Onde:

t_r = Tempo de resistência

t_1 = Tempo do evento 1

t_2 = Tempo do evento 2

Tabela 7: Tempo para aquisição da resistência por concentração de antineoplásico (CDDP).

Concentração do agente antineoplásico (μL)	Tempo de resistência (h)
5	36
10	36
20	40

O agente antineoplásico impede que as células entrem em mitose por 36 h nas concentrações de 5 e 10 μL de cisplatina e por 40 h na concentração de 20 μL , após esse tempo o microrganismo volta a sofrer divisão celular.

As investigações acerca da cinética de crescimento e resistência adquirida pelo microrganismo com o uso da droga cisplatina mostraram resultados satisfatórios e com isso podemos concluir que tal composto platínico foi capaz de impedir a divisão celular sendo considerado um agente antineoplásico eficaz no tratamento de cânceros.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que:

- O sistema proposto apresentou-se robusto e prático na condução dos experimentos, trabalhando com eficiência e reprodutível durante 24 horas.
- Foi possível obter as respostas turbidimétricas para os microrganismos estudados através do sistema fluxo-batelada.
- O sistema fluxo-batelada proporcionou resultados de acordo com o esperado, porém o mesmo deve ser utilizado em amostras com pouca suspensão microbiana para obtenção de melhor resposta analítica.
- Foi possível avaliar a escala temporal para o desencadeamento do fenômeno de resistência frente ao antineoplásico (CDDP) por parte da bactéria *Zymomonas mobilis*, a qual foi submetida a diferentes concentrações de cisplatina.
- Tomando-se como modelo celular a bactéria *Zymomonas mobilis* e como padrão antineoplásico a CDDP, foi possível verificar o surgimento da expressão fenotípica da resistência, em uma escala temporal, o que se evidenciou também pela inversão de população de células não-filamentosas em detrimento das filamentosas, mesmo na presença de um poderoso antimetabólico.
- A metodologia desenvolvida para evidenciar o desencadeamento do fenômeno de resistência frente à CDDP, em uma escala cronológica, mostrou-se versátil, uma vez que não exige aparatos de alto custo como a análise de expressão gênica por *microarray*.
- Ainda com relação à metodologia para evidenciar o desencadeamento do fenômeno de resistência frente à CDDP, a mesma pode ser aplicada para elucidar, também em uma escala temporal, o surgimento do fenômeno de resistência à multidrogas (MDR – *MultiDrug Resistance*),

utilizando-se para isto, a aplicação direta das mais diversas drogas ao microrganismo, o qual expressará um fenótipo de resistência, para uma escala de tempo dependente de um número sucessivo de gerações cujas as modificações genótípicas foram desencadeadas pelo contato exaustivo com o composto (droga) em questão.

PERSPECTIVAS

- Tornar o sistema fluxo-batelada mais automatizado.
- Ajustar o programa LabView para controle do tempo de leitura.
- Criar uma nova câmara de reação que permita leituras eficazes de absorbância x tempo com um volume de reagente menor que 20 % da sua capacidade total.
- Realizar diluições controladas automaticamente para dispersar a quantidade de biomassa produzida pelo microrganismo.
- Ajustar o sistema fluxo-batelada para que o mesmo seja capaz de realizar leituras de absorbância x tempo em períodos maiores que 24 h de análise.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, L. F. D. A flow-batch analyser with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, Recife, v. 73, n. 5, p. 906-912, 2007.

ANDERDEN, 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

BARRETO, I. S. A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. **Talanta**, João Pessoa, p. 111-115, 2012.

BOULTON, C.; QUAIN, D. *Brewing Yeast and Fermentation*. 1. ed. [S.l.]: **Blackwell science Ltda**, 2001.

BURTIS, C.; R, E. A.; DAVID, E. B. *Tietz Fundamentos da Química Clínica*. 6. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008.

CALATAYUD, J. M.; GARCÍA M, J. V. On-line solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 12, p. 428–436, 1993.

CERDÀ, V.; FERRER, L.; AVIVAR, J.; CERDA, A. *Flow analysis a practical guide*. [S.l.]: **Elsevier**, v. 1, 2014.

DINIZ, P. H. G. D.; ALMEIDA, L. F. H.; ARAÚJO, M. C. U. Flow-batch analysis. **Trends and analytical chemistry**, João Pessoa, v. 35, p. 39-49, 2012.

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.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

FRANDEN, M. A.; PIENKOS, P. T e ZHANG, M. Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**. v.144, p. 259-267, 2009.

GAVA, A. J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo: **Nobel**, p. 58 , 1984.

GILLET, P. J.; GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In: ZHOU, J. Multi-Drug Resistance in Cancer, Methods in Molecular Biology. [S.l.]: **Springer**, v. 596, 2010.

GUNASEKARAN, P.; RAJ, K. C. Ethanol fermentation technology: *Zymomonas mobilis*. Current Science, v. 77, p. 156–168, 1999

KIKUCHI, I. S.; PINTO, T. D. J. A. Implicações clínicas de drogas antineoplásicas mutagênicas. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, p. 201-205, 2005.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The yeasts, a taxonomic study, Amsterdam: **Elsevier**, 4. ed, p. 111-121, 1997.

LAPA, L.; LIMA, F. L. F. C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, v. 396, p. 91-97, 1999.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update. **Eur. J. Cancer**, v. 34, p. 1522–1534, 1996.

LEITE, J.E.C. **Resistência a compostos anti-tumor e seus alvos biológicos: abordagens pós-genômicas em *Saccharomyces cerevisiae***. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2010. 3f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2010.

LAWLER, D. M. Spectrophotometry / Turbidimetry and Nephelometry. In: WORSFOLD, P. J. . T. A. A. P. C. F. Encyclopedia of Analytical Science. 2. ed. Birmingham: **Elsevier**, v. 10, p. 344-351, 2005.

LIN, Y e TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 69, p. 627-642, 2006.

LINDER, V.D ; WILLEM, E. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. **Pure and applied chemistry**, v. 66, n. 12, p. 2493-2500, 1994.

MADIGAN, M. T. ; MARTINKO, J. M. ; DUNLAP, P. V. ; CLARK, D. V. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., p.538, 2010.

MATUO, R.; SOUSA, F. G.; SOARES, D. G.; BONATTO, D.; SAFFI, J.; ESCARGUEIL, A. K, HENRIQUES, J.A. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 70, p. 491–502, 2012.

MCDOWAL, R. D. The Management of Laboratory Information. Chemometrics in Environmental Chemistry. **Springer Verlag**, Heidelberg, p. 259-295, 1995.

MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A, P.; GINÉ, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA - CE): Desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. **Revista virtual de química**, Niterói, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

OSMAN, Y. A.; INGRAM, L. O. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. **Journal of Bacteriology**, v. 164, p. 173–80, 1985.

OLSZEWSKI, U.; HAMILTON, G. A better platinum-based anticancer drug yet to come? **Anticancer Agents Med. Chem.** v. 10, p. 293–301, 2010.

PASSARGE, E. **Genética**. Porto Alegre, p. 456, 2004.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, p. 675-729, 2000.

RICART, I. S.; MATEO, J. V. G. **Desarrollo de nuevos métodos em flujo continuo (multiconmutación y multubombeo) aplicados a la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia directa y fotoinducida**. Valência: Univerdidad CEU-Cardenal Herrera, 2015. 105f. Tese

(Doutorado em farmácia), Departamento de farmácia, Universidad CEU-Cardenal Herrera, 2015.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Flow injection analysis in the undregreade laboratory. **The chemical educator**, v. 4, n. 5, 1999.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Analytical chemistry**, v. 78, p. 145, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow Injection Analysis**. Segunda. ed. [S.l.]: John Wiley e Sons, v. 62, 1988.

SCHENK, P. W. ; BROK, M. ; BOERSMA, A. W. ; BRANDSMA, J. A. ; DEN DULK, H. ; BURGER, H. ; STOTER, G. ; BROUWER, J. ; NOOTER, K. Anticancer Drug Resistance Induced by Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 Gene: a Novel Component Involved in Cisplatin- and Doxorubicin- Provoked Cell Kill. **Molecular Pharmacology**, U.S.A, v. 64, n. 2, p. 259-263, 2003.

SHENE, C. e Bravo, S. Zymomonas mobilis CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to etanol and sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 323-328, 2001.

SILVA JUNIOR, R. C. D. Acervo digital unesp. **Universidade Estadual Paulista**, 13 Agosto 2014. Disponível em: <<http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/164125>>. Acesso em: 19 Junho 2015.

SILVEIRA, G.; TARLEY, C. R. T. Determinação turbidimétrica do antidepressivo amitriptilina em sistema fia explorando a formação do par iônico com lauril sulfato de sódio. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, 2008.

SOUSA, G.F. **Identificação de alvos moleculares associados à resistência e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. 16f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

SANTOS, D.S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

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. *Microbiologia*, Porto Alegre, n. 10, 2012.

VALCÁRCEL, M.; LUQUE, C, M. D. *Automatic methods of analysis*. Córdoba: **Elsevier**, v. 9, 1988.

VIIKARI, L.; KORHOLA, M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 6, p. 471–476, 1986.

WANG, D; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 307–320, 2005.

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. 25, p. 8097–8340, 2010.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C.; TOWNSHEND, A.; WORSFOLD, P.; . *Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection*. 1ª. ed. [S.l.]: **Elsevier**, 2012.