

MARTA LOPES LIMA

Avaliação do potencial carcinogênico do Megazol, agente anti-chagásico, e obtenção de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo Megazol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

MARTA LOPES LIMA

**Avaliação do potencial carcinogênico
do Megazol, agente anti-chagásico, e
obtenção de nanopartículas de poli(ϵ -
caprolactona) contendo Megazol**

Dissertação para o exame de
qualificação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Dr^a. Cristina Northfleet de Albuquerque

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lima, Marta Lopes.

Avaliação do potencial carcinogênico do Megazol, agente anti-chagásico, e obtenção de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo Megazol / Marta Lopes Lima. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Cristina Northfleet de Albuquerque.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Nanotecnologia-Farmacêutica.

Versão do título para o inglês: Genotoxic evaluation of megazol, antichagasic agent and obtaining nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone) containing megazol.

Descritores: 1. Megazol 2. Nanopartículas 3. Poli(ϵ -caprolactona) 4. Crossing-over mitótico 5. Aspergillus nidulans 6. Doença de Chagas I. Albuquerque, Cristina Northfleet de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0126/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marta Lopes Lima.

Título da Dissertação: Avaliação do potencial carcinogênico do Megazol, agente anti-chagásico, e obtenção de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo Megazol.

Orientador(a): Cristina Northfleet de Albuquerque.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A mulher que em nenhum momento mediu esforços
para a realização dos meus sonhos, ao meu
exemplo de caráter, dedicação e fé
Obrigada Mãe!!!

Agradecimentos

Ao Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial para a Pós-Doutora Claudinéia Aparecida Soares, sem seu auxílio esta pesquisa não teria sido finalizada. Obrigada, pelas horas perdidas de discussões e trabalho árduo, especialmente finais de semana.

A Pós-Doutora Nádia Araci Bou-Chacra e graduanda Juliana Conte pelo auxílio no preparo das nanopartículas.

Ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Doenças Negligenciadas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo uso dos equipamentos.

Ao laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial a Dr^a Vladi Olga Consiglieri e Dr. Guilherme Tavares pelo auxílio no desenvolvimento do método analítico aqui empregado.

A toda família Zucchi pelo apoio, incentivo e hospitalidade. Em especial a Tânia Zucchi pelo inestimável auxílio e convivência. Seu comprometimento e princípios científicos inspiram novos pesquisadores.

A Dr^a. Cristina Northfleed de Albuquerque, pelo apoio, confiança, compreensão.

Aos Doutores Osvaldo Augusto Sant'Anna, Marco Stephano, e Eliana Nakano pelas sugestões e críticas apresentadas no exame de qualificação.

Aos meus pais, Aparecida Bernardino e José de Barros, e ao meu segundo pai, Nelson Bernardino, obrigada pela paciência, compreensão e amparo nos momentos difíceis dessa caminhada. Amo vocês.

Ao meu grande amor, Rafael Ferraz Alvez, pela compreensão, companheirismo e apoio. Sem você eu não conseguiria!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior-Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Mônica Amaral, funcionária da Biblioteca do ICB-USP, pela sensibilidade, rapidez e orientação segura na normalização e correção das referências de acordo com a Norma ABNT.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

É graça divina começar bem. graça maior persistir
na caminhada certa. Mas a graça das graças é
não desistir nunca.

Dom Hélder Câmara.

Resumo

LIMA, M. L. **Avaliação do potencial carcinogênico do Megazol, agente anti-chagásico, e obtenção de nanopartículas de poli(ε-caprolactona) contendo Megazol.** 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Megazol (1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol) (MZ) tem sido descrito como um composto efetivo contra *Tripanossoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Contudo, este composto mostrou efeitos mutagênicos e baixa solubilidade em sistemas aquosos. O primeiro objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial carcinogênico de três doses de MZ através do teste de Índice de Homozigotização (HI). Este teste mostra alterações nas frequências de *crossing-over* mitótico eventualmente envolvidas com genes heterozigotos auxotróficos em linhagens de *Aspergillus nidulans*. O teste HI mostrou alterações nas frequências de *crossing-over* mitótico quando o tratamento com MZ foi aplicado. O segundo objetivo foi o preparo de nanopartículas de poli(ε-caprolactona) contendo MZ a partir do método de nanoprecipitação. O tamanho das nanopartículas obtidas foi de $280 \pm 1,34$ nm e polidispersão de $0,13 \pm 0,003$ nm. A análise de Microscopia Eletrônica (MEV) revelou nanopartículas de superfície lisa e esférica. Uma eficiência de encapsulação de 24% foi alcançada para as nanopartículas de MZ.

Palavras chave: Doença de Chagas. Megazol. Nanopartículas. Poli(ε-caprolactona). *Crossing-over* mitótico. *Aspergillus nidulans*.

Abstract

LIMA, M. L. **Genotoxic evaluation of megazol, antichagasic agent and obtaining nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone) containing megazol.** 2011. 118 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Megazol (1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol) (MZ) has been describe as a effective compound against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chaga's disease. Nevertheless this compound has showed mutagenic effects and lower solubility in aqueous systems. The one aim of this research was evaluate the carcinogenic potential of three doses of megazol (MZ) through of homozygation index assay (HI). This short-term assay shows alterations in mitotic crossing-over frequencies eventually involving heterozygous auxotrophic genes in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. The HI assay showed to mitotic *crossing-over* alteration in their frequency when the MZ was present. While the second aim was prepare poly- ϵ -caprolactone nanoparticles by nanoprecipitation method loaded with MZ. The particle size of the prepared nanoparticles was the $280\pm 1,34$ nm and polydispersity was $0,13\pm 0,003$. Scanning electron microscopy (SEM) analyze reveled a smooth surface and spherical. The encapsulation efficiency about 24% was achieved to MZ nanoparticles.

Key words: Chagas' Disease. Megazol. Nanoparticles. Poli(ϵ -caprolactone). Mitotic *Crossing-over*. *Aspergillus nidulans*.

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Distribuição de casos de infecção por *Tripanossoma cruzi*, baseado em estimativas oficiais 2006-2009.....21
- Figura 2.** Estrutura do MZ.....24
- Figura 3.** Via biorredutiva de compostos aromáticos. *S.O.D* – superóxido dismutase; *T.R* – triponationa redutase.....28
- Figura 4.** Ciclo de vida de *A. nidulans*.....36
- Figura 5.** Substratos estruturais para recombinação em células de mamíferos. A. Clássica quebra dupla fita no DNA levam a formação de dois produtos finais que podem iniciar recombinação. B. Quebra de fita única persistente que pode colapsar a forquilha de replicação. C. A forquilha de replicação pode encontrar barreiras no molde de DNA que paralisam a forquilha. Sob tais condições a forquilha de replicação pode reverter e formar um intermediário com estrutura de “pé de galinha” que serve como substrato para a recombinação.....39
- Figura 6.** *Crossing-over* mitótico em diplóide eucarioto e seleção contra os diplóides recombinantes homozigotos para genes recessivos auxotróficos.....42
- Figura 7.** Morfologia das linhagens haplóides.....45
- Figura 8.** A. Distribuição dos marcadores nutricionais da linhagem haplóide UT448. B. Distribuição dos marcadores nutricionais da linhagem haplóide UT184. Os círculos representam os centrômeros.....46
- Figura 9.** Mapa genético da linhagem diplóide *Dp (II-I)//184*. I a VIII representam os 8 grupos de ligação das linhagens diplóides; os círculos representam os centrômeros. As posições dos *loci* estão relativamente apresentadas. Os marcadores genéticos apresentados na parte superior de cada cromossomo são da linhagem parental *Dp (II-I)*, e aqueles apresentados sob as linhas representando os cromossomos, são da outra linhagem parental, UT184. Os marcadores genéticos *uvc* e *det*, no cromossomo I, são resultados de rearranjos no DNA, depois da inserção de um segmento duplicado transposto do cromossomo II para o I.....47
- Figura 10.** Morfologia das linhagens diplóides obtidas. A. Linhagem UT448//UT184. B. Linhagem *Dp(II-I)//UT184*.....49
- Figura 11.** Setores diplóides provavelmente recombinantes obtidos a partir da linhagem diplóide *Dp(II-I)//UT184*.....50
- Figura 12.** Placas Mestras (MC) contendo 24 colônias em posições definidas, padrão 5x5, ao lado direito, controle *Dp(II-I)*.....50
- Figura 13.** Média dos HIs do diplóide *Dp(II-I)//UT184 A. nidulans* tratado com MZ.....51
- Figura 14.** Micrografias MEV da morfologia externa e interna de micropartículas PLLA/PLGA.....58
- Figura 15.** Estrutura molecular do polímero poli(ϵ -caprolactona).....66

Figura 16. Mecanismos físicos do processo de liofilização.....	72
Figura 17. Fotomicrografias de varredura eletrônicas das nanopartículas de PCL na ausência de MZ e na presença de sacarose como crioprotetor.....	75
Figura 18. Espectro de Absorção do MZ no ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}}=358\text{nm}$) em meio 1% DMSO/água:ACN (1:1) e em meio 1% DMSO/PBS:ACN (1:1).....	77
Figura 19. Espectro de Absorção do MZ no ultravioleta de 1ª derivada em meio 1% DMSO/água desmineralizada:ACN (1:1) e em meio 1% DMSO/PBS:ACN (1:1).....	78
Figura 20. Ponto de Anulação em 345 nm. Mistura física contendo MZ, 5% ou 10% de NB do volume final da solução.....	79
Figura 21. A. Espectros de ordem zero de soluções de MZ sobrepostos em diferentes concentrações em solvente ACN:1%DMSO/PBS (7:3). B. Espectros de derivada primeira de soluções de MZ sobrepostos em diferentes concentrações em solvente ACN:1%DMSO/PBS (7:3).....	80
Figura 22. Curva Analítica obtida a partir da medida de derivada primeira de soluções de MZ com concentrações variando de 1 a 12 $\mu\text{g/mL}$. Amplitude = 345nm. ACN:1%DMSO/PBS (7:3) como branco.....	81

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparações e contrastes entre o teste do HI com outros testes de genotoxicidade.....	55
Tabela 2 - Materiais utilizados na pesquisa	61
Tabela 3 – Tamanho da partícula	69
Tabela 4 - Resultados Precisão e Exatidão	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

% - por cem

°C – graus celcius

µg/mL micrograma por mililitro

µL – microlitro

µM – micromol

2n – diplóide

4n – tetraplóide

AU – Absorbância

BZ – Benznidazol

CA – coeficiente angular

cGy – centi-Gray

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV – coeficiente de variação

d.p – desvio padrão

dAU/dλ – deriva da Absorbância em função da derivada do comprimento de onda

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

Dp(II-I) – Linhagem haplóide de *Aspergillus nidulans*

Dp(II-I)//UT184 Linhagem diplóide de *Apergillus nidulans*

E – exatidão

ED – Espectrofotometria de Derivadas

EE – eficiência de encapsulação

EHL – equilíbrio hidrofílico-lipofílico

ESR – estudo de ressonância de spin eletrônico

FDA – “Food and Drug Administration”

g – gramas

g/L – gramas por litro

h – horas

HI – Índice de Homozigotização

Km² – quilômetros quadrados

kV – kilovoltagem

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

M – Molar

mbar - milésimos de bar

MC – meio completo

MEV – microscopia eletrônica de varredura

mg/kg – miligrama por quilo

mL mililitro

MM – meio mínimo

mm.h⁻¹ – milímetros por hora

MNNG – *N*-Metil-Nitro-*N'*-nitrosoguanadina

MZ – Megazol

n – haplóide

NB – nanopartículas Brancas

NF – Nifurtimox

nm – nanômetros

p/p – peso por peso

P450 – Citocromo P450

PAHO– Pan American Health Organization

PBS – tampão fosfato

PCL – poli(ϵ -caprolactona)

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial de Hidrogênio

PLA – polilactato

PLGA – poli(lactídeo-co-glicolídeo)

PM – placa mestre

r.p.m – rotação por minuto

RE – resolução

SM – meio seletivo

SNTF – Sistema Nanoparticulado Transportador de Fármacos

TA100 - Linhagem *Salmonella typhimurium*

TA102 – Linhagem *Salmonella typhimurium*

TA98 - Linhagem *Salmonella typhimurium*

UT184 - Linhagem haplóide de *Aspergillus nidulans*

UT448 – Linhagem haplóide de *Aspergillus nidulans*

UT448//UT184

UV-Vis – ultravioleta-visível

v/v – volume por volume

WHO – World Health Organization

λ – comprimento de onda

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
	CAPÍTULO I – O MEGAZOL E A DOENÇA DE CHAGAS	20
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1.1	Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana	21
1.1.2	Quimioterapia da Doença de Chagas	23
1.1.3	Megazol (MZ).....	24
1.1.4	Atividade Biológica do MZ.....	24
1.1.5	Mecanismo de ação do MZ	27
1.1.6	Genotoxicidade do Megazol	30
	CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO MEGAZOL	33
2.1	INTRODUÇÃO	34
2.1.1	Ciclo de Vida do Fungo Filamentoso <i>Aspergillus nidulans</i>	34
2.1.2	Ciclo Parassexual.....	36
2.1.3	Recombinação Meiótica x Mitótica	38
2.1.4	<i>A. nidulans</i> como modelo biológico para detecção de <i>crossing-over</i> mitótico	40
2.1.5	Teste Índice de Homozigotização (HI) (Pires; Zucchi, 1994).....	41
2.2	OBJETIVOS	44
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.3.1	Genótipos das linhagens haplóides e diplóides do fungo filamentoso <i>A. nidulans</i> , para o teste do HI	44
2.3.2	Meios de cultura e soluções.....	46
2.3.3	Preparação de suspensão de conídios	46
2.3.4	Obtenção do heterocário e do Diplóide Heterozigoto	47
2.3.5	Exposição dos Diplóides de <i>A. nidulans</i> ao MZ e Controle.....	48
2.3.6	Análise mitótica	48
2.3.7	Análises estatísticas	48
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
2.5	CONCLUSÕES	55
	CAPÍTULO III - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO MEGAZOL	56

3.1 INTRODUÇÃO	57
3.1.1 Sistema Nanoparticulados para o Transporte de Fármacos (SNTF) ...	57
3.2 OBJETIVOS	60
3.2.1 Objetivos Específicos	60
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.3.1 Material	60
3.3.1.1 Molécula de Estudo	60
3.3.1.2 Reagentes	60
3.3.1.3 Equipamentos.....	61
3.3.2 Métodos	61
3.3.2.1 Obtenção das Nanopartículas de PCL contendo MZ	61
3.3.2.2 Determinação do diâmetro médio e polidispersão das nanopartículas de PCL contendo MZ	62
3.3.2.3 Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
3.3.2.4 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria derivada de 1ª ordem em UV para quantificação do MZ em nanopartículas PCL	63
3.3.2.4.1 Solução Padrão MZ em água Desmineralizada ou Tampão Fosfato PBS .	63
3.3.2.4.2 Solução de MZ amostral 10 µg/mL.....	63
3.3.2.4.3 Solução de Nanopartículas Brancas (NB) de PCL	64
3.3.2.4.4 Solução Mistura Física: MZ + NB	64
3.3.2.4.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação das Nanopartículas de PCL contendo MZ	64
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
3.4.1 Obtenção das Nanopartículas	65
3.4.2 Determinação do diâmetro, polidispersão das nanopartículas de PCL contendo MZ	69
3.4.3 Análise morfológica	71
3.4.4 Liofilização	71
3.4.5 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	74
3.4.6 Determinação da porcentagem de associação do MZ as nanopartículas de PCL	75
3.4.6.1 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria derivada de 1ª ordem em UV para quantificação do MZ em nanopartículas de (PCL)	76
3.4.6.1.1 Especificidade	76
3.4.6.1.2 Método de Ponto de Anulação	78

3.4.6.1.3 <i>Linearidade</i>	80
3.4.6.1.4 <i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	81
3.4.6.1.5 <i>Precisão e Exatidão</i>	82
3.4.6.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação das nanopartículas	83
3.5 CONCLUSÕES	86
4 DISCUSSÃO GERAL	87
5 CONCLUSÃO GERAL	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE – QUADRADOS LATINOS	103

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana continua a representar um dos mais sérios problemas médico-sanitários da América Latina.

A quimioterapia desta doença é restrita e somente duas substâncias são prescritas para uso clínico: nifurtimox e benznidazol. Ambas promovem efeitos colaterais devido à prolongada administração, não são efetivas contra o estágio crônico da doença e diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* resistentes já foram identificadas. Diante desta problemática, novos agentes efetivos contra o parasita *T. cruzi* são de necessidade urgente.

Em 1968, o Megazol (MZ) foi sintetizado, e desde então um amplo espectro de atividade foi identificado para esta molécula, incluindo efetividade contra diferentes linhagens de *T. cruzi*. No entanto, seu desenvolvimento como um potencial agente farmacológico foi desestimulado devido à verificação de ação genotóxica em células procarióticas.

O grande potencial de ação do MZ principalmente contra o parasita *T. cruzi* justificam a continuação dos estudos desta molécula.

Atualmente, novas abordagens terapêuticas estão disponíveis com base na Nanobiotecnologia. Os sistemas de transportes de fármacos nanoparticulados permitem o carregamento e liberação controlada do fármaco encapsulado evitando picos plasmáticos e diminuindo assim a toxicidade deste. Além disso, a superfície da nanopartícula pode ser funcionalizada visando o direcionamento para o sítio patológico.

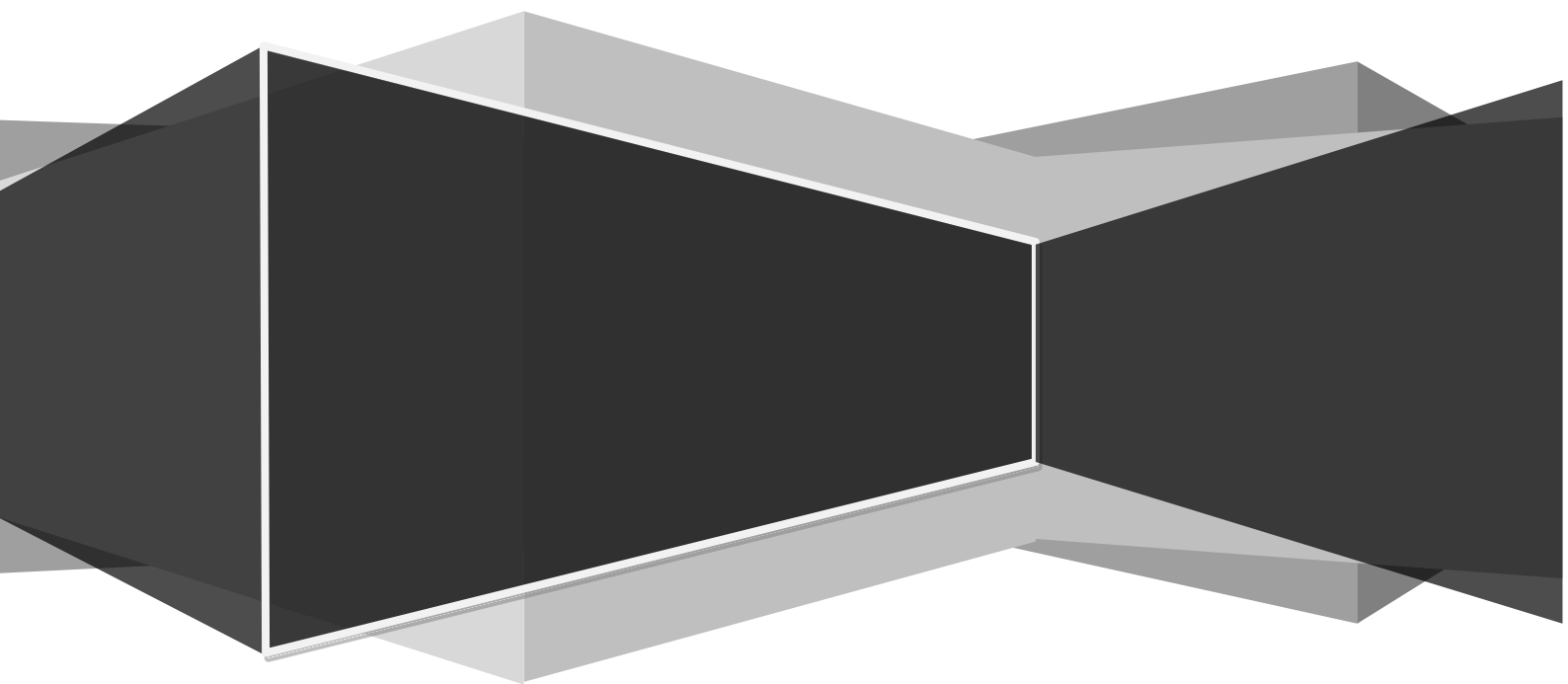
Assim, o nanoencapsulamento do MZ permite uma modificação de sua administração convencional de modo que sua toxicidade pode ser diminuída, e este fator limitante ao seu desenvolvimento clínico pode ser superado. Neste contexto, o presente projeto de pesquisa visou o desenvolvimento e caracterização de um sistema nanoparticulado coloidal contendo MZ para fins de modificação farmacocinética e toxicológica. O potencial carcinogênico da molécula MZ também foi determinado por meio do teste conhecido como Índice de Homozigotização (HI), capaz de detectar doses submutagênicas de agentes genotóxicos,

Finalmente, a ausência de uma terapia efetiva contra a Doença de Chagas justifica a continuação dos estudos da molécula MZ efetiva, principalmente, contra o

agente etiológico desta doença. A Nanotecnologia aplicada à Farmacologia permite uma abordagem terapêutica diferenciada que pode ser explorada para ressurgir compostos comprovadamente efetivos, porém abandonados devido a questões como, por exemplo, toxicidade.

CAPÍTULO I

O MEGAZOL E A DOENÇA DE CHAGAS



1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana

A Doença de Chagas faz parte das seis doenças endêmicas parasitárias reconhecidas como prioritárias pela World Health Organization (WHO), representando um grande problema de saúde pública ligado ao subdesenvolvimento (WHO, 2002). Endêmica em 21 países da América Latina, sua ampla distribuição geográfica inicia-se no Norte do México e estende-se até a Argentina e cerca de um quarto desta população está em risco (URBINA, 1999).

Até então considerada uma problemática de países subdesenvolvidos, em 2009, a WHO (WHO, 2011) apresentou um novo quadro de distribuição geográfica que mostra a globalização da doença trazendo a patologia para um quadro de preocupação mundial (Figura 1).

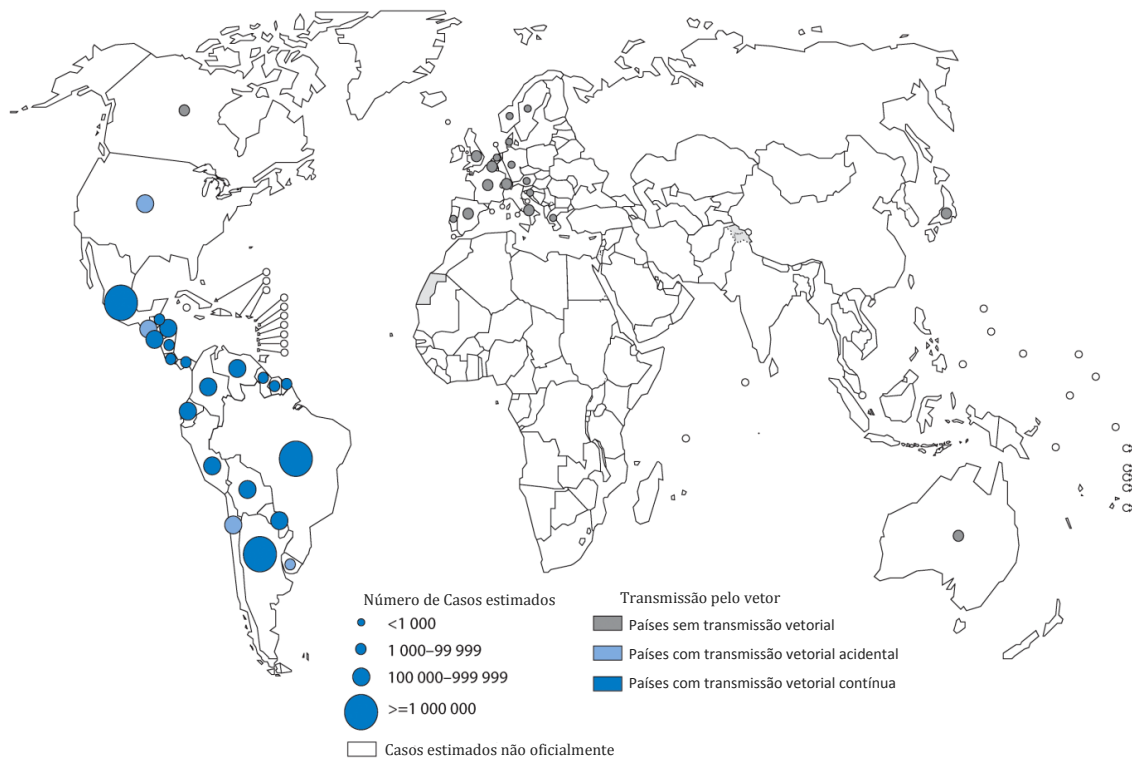


Figura 1. Distribuição de casos de infecção por *Tripanossoma cruzi*, baseado em estimativas oficiais 2006-2009.
Fonte: WHO (2011).

Seu agente etiológico é o *Trypanossoma cruzi*, um protozoa hemiflagelado (família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*) (HOARE; WALLACE, 1966) que apresenta ciclo biológico do tipo heteroxênico, o qual envolve uma fase de multiplicação extracelular do parasita no invertebrado vetor (insetos hematófagos triatomíneos) e uma fase de multiplicação intracelular do parasita no hospedeiro vertebrado (mamíferos incluindo o homem) em uma série de estágios diferenciais. A transmissão da doença ocorre principalmente pelo inseto vetor (80 a 90%), transfusão sanguínea (5 a 20%) e rotas congênitas (0,5 a 8%) (DIAS, 2000).

A importância médico-social da doença no Brasil é grande, significando perdas anuais acima de R\$ 80 milhões em custos médico-hospitalares (DIAS; JATENE, 1992). Em 2006, Pan American Health Organization (PAHO, 2010) estimou que R\$ 1,3 milhões em salários e produtividade industrial são perdidos anualmente devido à enfermidade dos trabalhadores. Em 2000, a Doença de Chagas alcançou uma área de 3,5 milhões de Km², deixando sob risco cerca de 35 milhões de pessoas e vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados que evoluíram para cardiopatia chagásica crônica (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

Em junho de 2006, a PAHO e a WHO certificaram que o Brasil havia eliminado a transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor (*Triatoma infestans*), transfusão de sangue e produtos do sangue (DIAS, 2006). Apesar dos esforços de países como Brasil, Uruguai, Chile e Argentina a eliminação do vetor em outros países da América Latina tem sido difícil devido ao ciclo de vida silvestre do parasita em várias regiões, aos múltiplos mecanismos de transmissão, a escassa ou nenhuma aparência clínica da maioria dos casos agudos, a grande diversidade de vetores com diferentes comportamentos, e principalmente determinantes econômicos e sociais expressos na precariedade das condições de vida da população afetada (SILVEIRA, 2007).

A Tripanossomíase Americana, 100 anos após sua descoberta, continua a representar um dos mais sérios problemas médico-sanitários da América Latina devido à ausência de tratamento com agentes terapêuticos efetivos que possam ser administrados em larga escala e livre de efeitos colaterais. Ademais nenhuma imunoprevenção é disponível.

Apesar dos avanços no controle da transmissão em alguns países latino-americanos, um importante residual epidemiológico de incidência e morbidade ainda existe e permanece sem tratamento eficaz. Poucas são as drogas utilizadas na quimioterapia da Doença de Chagas e efeitos colaterais estão presentes.

1.1.2. Quimioterapia da Doença de Chagas

A quimioterapia da doença de Chagas ainda é um campo de pesquisa muito amplo com somente duas substâncias indicadas para uso clínico: benznidazol (BZ) e nifurtimox (NF) (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

Estas drogas são capazes de curar pelo menos 50% das infecções recentes e não são efetivas contra o estágio crônico da doença (CERISOLA, 1969; CANÇADO; BRENER, 1979; BRENER, 1979; SCHMUÑIS et al., 1980). Os resultados do tratamento das infecções agudas não tem sido homogêneos nos diferentes países, provavelmente devido à diferente sensibilidade das drogas as diferentes linhagens de *T. cruzi* (CERISOLA, 1969; FERREIRA, 1990). Ambas as drogas, NF e BZ, têm efeitos colaterais devido à prolongada administração (BRENER, 1979; CANÇADO; BRENER, 1979; CASTRO; DIAZ, 1988). Além disso, cepas brasileiras de *T. cruzi* são resistentes ao NF. Efeitos mutagênicos em testes *in vivo* e *in vitro* também foram confirmados (GORLA, 1987; CASTRO; DIAZ, 1988; FERREIRA et al., 1988ab).

Em 1968, dentro de um programa de pesquisa da American Cyanamid sobre os 5-nitroimidazóis foram sintetizadas substâncias dentre as quais o 1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (Megazol) que apresentou um largo espectro de ação biológica frente a diversas bactérias gram+ e gram-, bem como fungos e parasitas (BERKELHAMER; ASATO, 1968; BURDEN; RACETTE, 1968; 1969). A saber, os nitroimidazóis, assim como os nitrofuranos e nitrotiadiazoles, são os três principais grupos que compreendem os nitroheterocíclicos, compostos estes com uma ampla variedade de aplicações desde conservantes alimentares até antibióticos (GRUNBERG; TITSWORTH, 1973; MITAL, 2009). Dodd e Stillman (1944) foram os primeiros a despertar o interesse nestes compostos quando reportaram que a adição do grupo nitro na posição 5 do anel imidazol conferia propriedades antibacterianas e antiprotozoárias a molécula.

Levando-se em consideração a resistência desenvolvida pelas diferentes linhagens de *T. cruzi* e os efeitos colaterais de BZ e NF, o MZ pode representar uma alternativa na terapia da Doença de Chagas uma vez que é ativo contra o parasita *T. cruzi*.

1.1.3. Megazol (MZ)

Sintetizado na década de 60, MZ (Figura 2) é um sólido cristalino amarelo forte, que apresenta ponto de fusão de 270-275 °C (MAYA et al., 2003), sendo insolúvel em água, pouco solúvel em acetona e dimetilformamida e solúvel em tetrahidrofurano e dimetilsulfóxido (DMSO) (ARANTES, 2007).

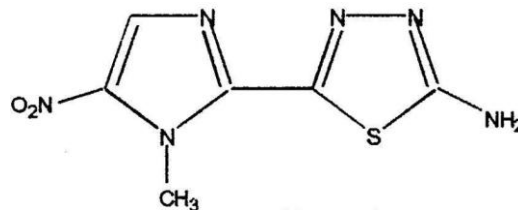


Figura 2. Estrutura química do MZ

1.1.4. Atividade Biológica do MZ

Verificou-se eficaz contra diversas infecções bacterianas e protozoárias em pintos, camundongos, hamsters e ratos (BACHMANN et al., 1968; BURDEN; SCHUMACHER; KELLY, 1969; LAYTON et al., 1968; REDIN; KUCK; FORBES, 1968; CARVAJAL et al., 1969¹ apud ALBUQUERQUE, 1995; BURDEN; RACETTE,

¹ BACHMANN, H. J.; SHIRK, R. J.; LAYTON, H. W.; KEMP, G. A. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agents. IV. Activity in mice and chicks. **Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda)**, v. 8, p. 524-527, 1968.

BURDEN, E. J.; SCHUMACHER, E.; KELLY, M. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. VII. Action against subcutaneous *Trichomonas vaginalis* infections in mice. In: HOBBY, G. L. (Ed.), **Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda)** – 1968. Bethesda, M.D.: American Society for Microbiology, 1969. p. 538–540.

LAYTON, H. W.; BACHMANN, H. J.; KEMP, G. A.; GALE, G. O.; KISER, J. S. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. V. Therapy of an experimental *Salmonella choleraesuis* infection in swine. **Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda)**, v. 8, p. 528-533, 1968.

REDIN, G. S.; KUCK, N. A.; FORBES, M. Megazol. Presented at Eighth Interscience Conference on **Antimicrob. Agents Chemother.** New York City. Oct, 21, 1968.

CARVAJAL, S.; PIDACKS, S.; STEINMANN, H.; MAXON, H.; WOZNIK, A. 2-Amino-5(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. VIII. Antiamoebic activity *in vivo* of the hydrochloride salt. In: HOBBY, G. L. (Ed.). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1968**, American Society for Microbiology, Bethesda, MD. 1969. p. 541–544.

1968). Dentro do amplo espectro de ação encontrado para o MZ uma atenção especial foi dada a sua atividade antiprotozoária como *T. cruzi* e *T. brucei*.

Em 1968, Burden e Racette, constataram que dose única, tanto via oral quanto via intraperitoneal, de 20-40 mg/kg prolongou a sobrevivência de ratos, camundongos ou *hamsters* infectados experimentalmente com cepas de *T. equiperdum*, causador de uma doença em eqüinos conhecida como “Durina”. Reportaram que uma dose oral única de 100 mg/kg reduz a parasitemia de camundongos infectados com *Leishmania donovani* em 80% e doses maiores são ainda mais efetivas (400 mg/kg reduz em 99%). Ainda neste estudo, camundongos sobreviveram a uma infecção potencialmente letal de *T. cruzi* pela administração via dieta, por 7 dias, de 25-65 mg/kg/dia de MZ.

Lages-Silva, Filardi e Brenner (1990) trataram camundongos, os quais apresentavam pico de parasitemia da linhagem Y de *T. cruzi*, com dose única de 500 mg/kg, rota oral, com as drogas NF, BZ e MZ a fim de comparar a capacidade de indução à fagocitose dos parasitas por macrófagos e a atividade tripanocida entre estas drogas. Neste estudo determinou-se que a fagocitose *in vitro* da forma sanguínea do parasita *T. cruzi* por macrófagos de camundongos e a destruição intracelular do parasita é significativamente maior pelo tratamento com MZ. Este resultado corroborou dados anteriormente reportados por Filardi e Brener (1982)² (apud LAGES-SILVA; FILARDI; BRENER, 1990), no qual o MZ mostrou-se também muito mais efetivo contra este parasita do que o NF e o BZ. Neste estudo de Filardi e Brener (1982) o MZ curou uma alta porcentagem de infecções induzidas por linhagens de *T. cruzi* altamente resistentes ao NF e BZ.

De Castro e Meirelles (1987) investigaram o efeito do NF, BZ e MZ sobre formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e o efeito destes fármacos em cultura com células musculares cardíacas de camundongos com tripomastigotas sanguíneas *in vitro*. Verificou-se que a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi* em cultura foi inibida de modo dose-dependente pelas drogas. Após quatro dias de incubação o MZ e o NF foram mais potentes do que o BZ na inibição da proliferação (65,1; 62,8 e 39,5%, respectivamente). Em 24 horas, estes tratamentos

² FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, n. 3, p. 293–297, 1982.

levaram a várias alterações ultraestruturais nas diferentes formas testadas do parasita *T. cruzi*. De maneira geral, o MZ, assim como o NF e BZ, no intervalo de 6,3-20 μM foi potente no tratamento em cultura de células cardíacas infectadas, quando adicionado desde o início da interação célula/parasita ou após 1 ou 3 dias de infecção.

Maya et al. (2003) encontraram que a concentração máxima de 4,24 μM de MZ é suficiente para inibir 50% do crescimento em cultura de diferentes linhagens das formas epimastigotas de *T. cruzi*, neste estudo o MZ foi três vezes mais potente do que o NF.

A partir destes estudos em *T. cruzi*, o MZ foi testado contra *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da Doença do Sono ou Tripanossomíase Africana, mostrando-se ativo em camundongos e macacos (BOUTEILLE et al., 1995, 1999; ENANGA et al., 1998).

Em 1995, Bouteille e colaboradores estudaram a atividade do MZ contra infecções *T. brucei brucei* em camundongos. *In vitro*, o MZ exibiu um efeito tripanocida dez vezes mais efetivo do que a Suramina, fármaco amplamente utilizado na fase aguda da Tripanossomíase Africana. A concentração 100% efetiva mínima do MZ sobre o parasita foi de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. *In vivo*, uma única dose intraperitoneal ou oral de MZ a 20 mg/kg e 80 mg/kg, respectivamente, curou camundongos com infecção aguda, enquanto a Suramina não mostrou efeito protetor completo na dose de 20 mg/kg intraperitoneal.

O sinergismo do MZ com Melarsoprol e Suramina foi estudado. Jennings e colaboradores (1996) prepararam géis de hidroxipropilcelulose de MZ e Melarsoprol para aplicação tópica em camundongos infectados com *T. brucei brucei* com envolvimento do sistema nervoso central, o tratamento combinado destes géis em camundongos com tripanossomíase potencializou o efeito tripanocida dos compostos. Resumidamente, a aplicação única de gel melarsoprol combinado com MZ em tratamento de dois dias consecutivos mostrou taxa de cura satisfatória.

Em 1998, Enanga e colaboradores verificaram que a quimioterapia combinatória de Suramina (20 mg/kg) intraperitoneal seguida de quatro doses diárias de MZ (80 mg/kg) em camundongos infectados com *T. b. brucei* com comprometimento do sistema nervoso central em estágios avançados, rapidamente

removeu a parasitemia periférica e curou a patologia do sistema nervoso central dentro de 2 meses.

Bouteille et al. (1999) verificaram que o MZ na concentração de 100mg/kg, administrado oralmente em macacos *Cercopithecus aethiops* é ativo para infecções *T. brucei gambiense* sozinho e em combinação com a Suramina também foi ativo em quadros de infecção crônica neste primata. Enanga et al. (2000) incorporaram 100 mg/kg de MZ em bananas para administração oral neste mesmo modelo experimental de primata infectado com *T. b. gambiense*, todos os animais tratados apresentaram cura após o tratamento e foi confirmado que mesmo na ausência de Suramina o megazol atravessa a barreira hematoencefálica. Níveis no líquido cérebro-espinhal foram de 5,5-10,6% dos níveis do plasma, 12 horas após a administração, concentrações estas até dez vezes maiores aquela reportada por Bouteille et al. (1995) como a concentração mínima inibitória *in vitro* para *T. brucei*.

Boda et al. (2004) usaram um modelo experimental de ovelhas infectadas com *T. b. brucei* para testar a eficácia do MZ para fins veterinários, em resumo, as doses de 40 e 80 mg/kg de MZ curaram as ovelhas infectadas.

Finalmente, a atividade tripanocida do MZ é particularmente a de maior interesse uma vez que é eficaz em modelos experimentais em todas as fases da Tripanossomíase, mesmo em quadros de comprometimento avançado do sistema nervoso central. No entanto os mecanismos de ação desta molécula ainda não são completamente claros.

1.1.5. Mecanismo de ação do MZ

O tripanossoma *T. cruzi* é particularmente sensível ao estresse oxidativo uma vez que não apresenta sistema de defesa enzimático adequado contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, radicais livres relacionados ao H_2O_2 . Foi confirmada a ausência das enzimas catalase, glutathiona peroxidase e além disso, a glutathiona redutase é substituída por uma tripanotiona redutase, uma enzima específica dos tripanossomas. Desta maneira o sistema de defesa celular contra espécies reativas do metabolismo do oxigênio do *T. cruzi* é deficiente dado à importância destas enzimas na detoxificação de compostos tóxicos como o peróxido de hidrogênio (BOVERIS et al., 1980; HENDERSON; FAIRLAMB, 1987; FERREIRA;

MATSUBARA, 1997). Assim, fármacos capazes de induzir estresse oxidativo ou inibir uma das enzimas de detoxificação específica do parasita são de interesse farmacológico (VIODÉ et al., 1999).

De maneira geral, os nitrocompostos interferem com o metabolismo do oxigênio. O primeiro passo no metabolismo desses compostos é a sua redução para o radical nitro ânion correspondente ($-\text{NO}^{\bullet-}$). Sob condições anaeróbicas, estes radicais podem sofrer novas reduções produzindo derivado nitroso ($-\text{NO}$), hidroxilamina ($-\text{NHOH}$) e derivados de amina ($-\text{NH}_2$) (WARDMAN, 1985; MORENO; DOCAMPO, 1985; JOSEPHY; MASON, 1985). Em condições aeróbicas, o radical nitro ânion reage com o oxigênio para formar ânions superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que por sua vez são reduzidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase. Se o peróxido de hidrogênio não é metabolizado e se acumula pode gerar radicais livres (OH^{\bullet}), a espécie mais reativa dos intermediários gerados durante o metabolismo do oxigênio, este radical pode promover mutação do DNA, inativação de proteínas, enzimas e rompimento da membrana celular (Figura 3) (DOCAMPO; MORENO, 1984; CADENAS, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

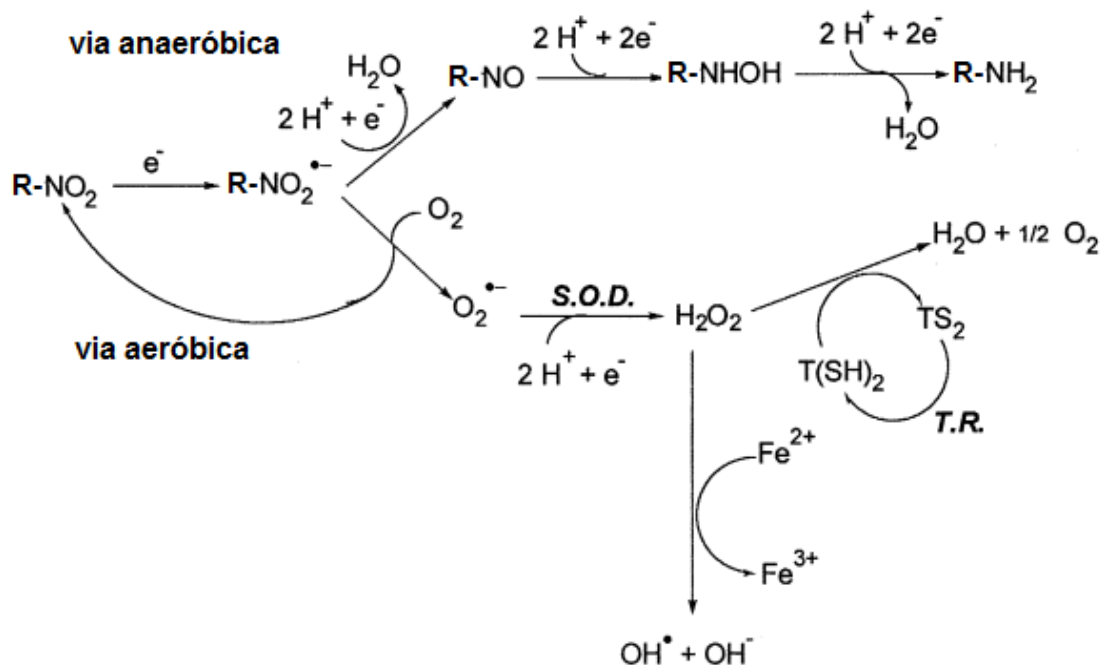


Figura 3. Via bioreduativa de compostos aromáticos. S.O.D – superóxido dismutase; T.R.- triponatonina redutase.

Fonte: Viodé et al. (1999)

Viodé et al. (1999) por meio de estudos de ressonância de spin eletrônico (ESR) determinaram que o MZ é reduzido pelos sistemas enzimáticos de *T. cruzi* e de mamíferos. Sob condições anaeróbicas, o MZ foi reduzido para seu radical ânion ($-\text{NO}^{\cdot-}$), ao passo que sob condições aeróbicas, confirmou-se a produção de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}). De acordo com os autores, não existe dúvida de que esta droga seja capaz de interferir no metabolismo do oxigênio do parasita, induzindo estresse oxidativo. Ainda neste estudo foi determinado que a atividade biológica do MZ não é dependente da inibição da enzima tripanotiona redutase do parasita.

Além do dano induzido pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio e superprodução de superóxido induzido pelo MZ, este pode também ter outros efeitos deletérios para o parasita. Viodé et al. (1999) consideraram a possibilidade de formação de peroxinitrito resultante da adição de um óxido nítrico no radical superóxido, uma espécie altamente danosa para o parasita, uma vez que o tripanossoma *T. cruzi* tem uma atividade óxido nítrico sintase no macrófago onde se desenvolve.

Bollo et al. (2001) também confirmaram, a partir de estudos voltamétricos cíclicos, a formação do radical nitro ânion do MZ.

Maya et al. (2003) mostraram que o MZ provocou uma progressiva diminuição do conteúdo tiol da linhagem Tulahuén de epimastigotas de *T. cruzi*, os testes indicaram que a perda de tióis reduzidos não foi devido a oxidação dos tióis e sim a conjugação destes com os metabólitos eletrofílicos do MZ. O MZ é convertido para suas formas nitrosas resultando em espécies eletrofílicas as quais são eficientes removedores de tiol, particularmente $\text{T}(\text{SH})_2$, o qual é essencial para a sobrevivência do tripanossoma.

De Castro e Meirelles (1990) investigaram a atividade do MZ sobre a biossíntese de macromoléculas de formas amastigotas linhagem Y de *T. cruzi*. O MZ inibiu a síntese protéica a qual foi mensurada pela incorporação de leucinas marcadas. Em relação a síntese de ácidos nucleicos, investigada pela mensuração de timidina e uridina marcadas, respectivamente para síntese de DNA e RNA, o MZ em 100 μM inibiu a síntese de DNA em 70% e parcialmente a síntese de RNA (23%). Desta maneira, De Castro e Meirelles atribuíram o mecanismo de ação

primário do MZ como sendo, principalmente, a diminuição da síntese protéica de formas amastigotas de *T. cruzi*.

Enfim, parece provável que o MZ atue em mais de um alvo em seu mecanismo de ação. Até o momento, os estudos delineiam pelo menos três processos pelo qual o MZ age contra o *T. cruzi*, bloqueio da biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos, toxicidade direta devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio, e remoção da tripanotiona reduzida um importante substrato da enzima tripanotiona redutase.

A despeito da notável atividade contra os tripanossomas, em 1986, devido a determinação do MZ como mutagênico a partir do teste de Ames maiores estudos a cerca desta molécula foram completamente interrompidos.

1.1.6. Genotoxicidade do Megazol

Em Ferreira e Ferreira (1986ab), em testes *Salmonella*/microsoma, o MZ foi mutagênico para as linhagens TA98 e TA102 e não para a linhagem TA100, indicando que sua atividade mutagênica é do tipo que causa “deslocamento do quadro de leitura”. A presença da mistura S9 não aumentou significativamente o número de mutantes por placa. Deste modo, concluíram que o MZ é um mutágeno direto que exerce seus efeitos genéticos sem mediação de enzimas de mamíferos.

O fato de o MZ possuir atividade mutagênica na linhagem TA102, linhagem esta capaz de detectar o efeito mutagênico de agentes oxidativos como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, levou os autores a concluir que pelo menos em parte, o efeito mutagênico do MZ poderia estar envolvido com a formação de radicais livres oxidantes.

Em 1998, Moraes e colaboradores estudaram a ativação mutagênica do MZ por enzimas bacterianas e de mamíferos. Os resultados mostram que nitroreduases tipo I "clássica" bacterianas, enzimas insensíveis ao oxigênio, são responsáveis pela ativação mutagênica do MZ e que as enzimas de mamíferos, novamente, parecem não estar envolvidas na ativação mutagênica do composto.

Poli et al. (2002) constataram que o MZ é genotóxico no ensaio do cometa realizado com leucócitos de ratos, camundongos e em células Vero independentemente da ativação metabólica extrínseca. Por outro lado, ensaios de

mutagenicidade realizados com culturas de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa D7), com e sem ativação endógena P450, não revelaram aumento da frequência de mutação e/ou recombinação.

Nessler et al. (2004) confirmaram o potencial genotóxico do MZ *in vivo* e *in vitro*. Nos experimentos *in vitro*, ensaio de micronúcleo em microescala com as células do linfoma de camundongo, o MZ exerceu uma clara atividade genotóxica. O MZ mostrou atividade clastogênica significativa em análises de linfócitos humanos em metáfase, com e sem ativação metabólica, e pode, portanto, ser considerado como um agente clastogênico em cultura de linfócitos humanos. No entanto, aberrações numéricas não foram observadas. Estes resultados sugerem um mecanismo de ação clastogênico, mas não aneugênico. Atividade genotóxica *in vivo* também foi detectada pelo ensaio de micronúcleo de medula óssea de ratos quando o MZ foi administrado oralmente.

Em 2005, Poça avaliou o efeito genotóxico e citotóxico do MZ analisando *in vitro* a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos metafásicos humanos em cultura, e *in vivo*, a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos após administração oral, dose única, de MZ. *In vitro*, no intervalo de concentração de $1,41 \cdot 10^{-4}$ - $5,63 \cdot 10^{-4}$ M, constatou-se que o MZ causou um efeito clastogênico concentração-dependente na frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos expostos em cultura. Em contraste ao potente e claro efeito clastogênico concentração-dependente determinado *in vitro*, no intervalo de concentração de 125-2000 mg/kg após tratamento dose única por via oral em camundongos, o efeito clastogênico do MZ *in vivo*, foi discreto e não exibiu uma relação de dose-dependência.

Nenhum dos estudos *in vivo* com roedores e primatas acima citados revelou citotoxicidade apreciável nos testes de curta duração. Apenas Darsaud et al. (2004) constaram que o MZ não foi bem tolerado em ratos pois a normalização do consumo de alimentos e ganho de peso corpóreo após o tratamento com MZ foi mais prolongada do que após o tratamento com Suramina.

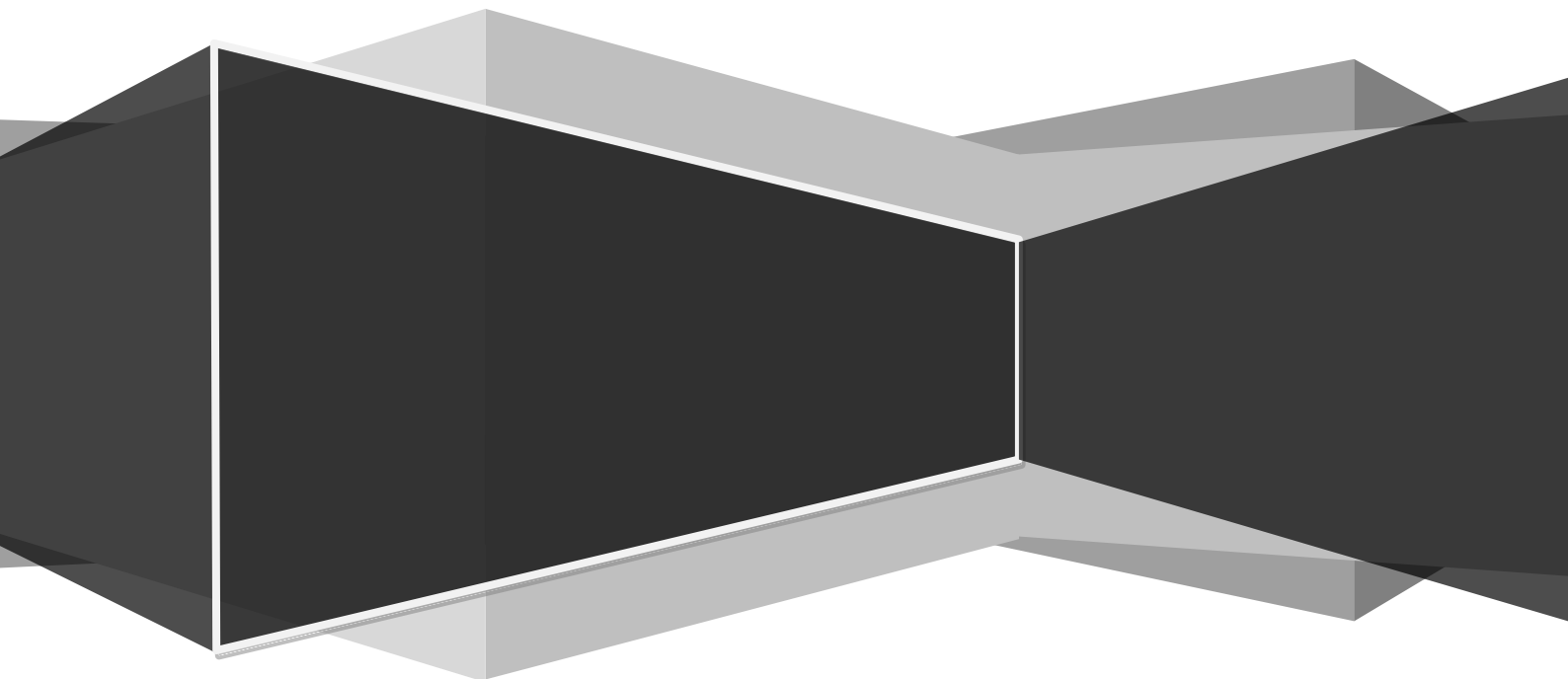
A mutagenicidade positiva para o MZ determinada pelo teste de Ames deve ser tratada com prudência principalmente tratando-se de uma droga com conteúdo nitro, uma vez que o teste de Ames emprega espécies de *Salmonella* com nitroredutases não usuais (WATANABE et al., 1998). A maioria dos nitroimidazoles é

mutagênica em bactérias e esta mutagenicidade tem sido atribuída a nitroredutases presentes nestes organismos capazes de reduzir estes compostos para intermediários tóxicos. No entanto, a eficiência clínica das drogas nitroheterocíclicas, em sua grande maioria, é devida a estes intermediários tóxicos. Tem sido argumentado que a baixa capacidade das células de mamíferos em nitroredução coloca os animais em um menor risco para os efeitos genotóxicos desses agentes. Entretanto, vários nitroheterocíclicos são mutagênicos em células de mamíferos e carcinógenos em roedores, de modo que a proteção oferecida pela menor capacidade nitroredutase de células de mamíferos pode não ser completa (LI; HEFLICH, 1991).

Neste contexto de genotoxicidade do MZ, um completo perfil necessita ser determinado para o entendimento deste quadro indesejável. Estudos mais extensivos para a caracterização do potencial citotóxico/mutagênico/carcinogênico do MZ só têm a acrescentar quanto a sua atividade.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO MEGAZOL



2.1. INTRODUÇÃO

A manipulação genética de organismos implica na habilidade direta de formação de novas combinações de traços em um indivíduo. Fungos foram entre os primeiros organismos a serem estudados cientificamente através da genética. Embora ervilhas e moscas fornecessem a evidência inicial para genes e grupos de ligações, alguns dos *insights* fundamentais da estrutura genética de organismos vieram de estudos pioneiros em sistemas de fungos (WHITEWAY; BACHEWICH, 2005).

Aspergillus nidulans é um fungo filamentoso que apresenta um sistema genético bem definido. Marcadores genéticos como cor de conídios, auxotrofia, resistência a drogas entre outros estão espalhados ao longo dos 8 cromossomos (*n*) (KÄFER, 1958). Características inerentes ao seu ciclo de vida, seu rápido crescimento em meios de composição simples fazem deste organismo uma ferramenta vital para estudos genéticos.

2.1.1. Ciclo de Vida do Fungo Filamentoso *Aspergillus nidulans*

O crescimento vegetativo em *A. nidulans*, inicia-se pela germinação de um esporo. Este pode ser derivado mitoticamente de estruturas chamadas conidióforos ou produzido meioticamente dentro de estruturas chamadas *ascus*.

A germinação do esporo leva a formação de hifas tubulares que crescem por extensão apical e ramificações para formar uma rede de células interconectadas chamada micélio. O micélio forma uma colônia radial simétrica que se expande indefinidamente em uma taxa constante de cerca de 0,5 mm.h⁻¹ a 37 °C. Funcionalmente as várias células dentro do micélio interagem para formar uma rede de hifas diferenciadas que executam diferentes funções na aquisição de nutrientes a partir do ambiente e, em determinado tempo, o desenvolvimento de estruturas reprodutivas.

Aproximadamente 16 horas após a germinação do esporo, a primeira evidência fenotípica da especialização hifal dentro da colônia torna-se prontamente aparente. Ao mesmo tempo em que ramificações aéreas hifais são formadas no centro da colônia algumas dessas ramificações subsequentemente diferenciam-se

em conidióforos, termo este aplicado a estruturas contendo esporos assexuais de *A. nidulans*. A formação do primeiro esporo assexual ou conídio (monocariótico) ocorre entre 6 e 8 horas de iniciado o crescimento aéreo. O ciclo assexuado pode ser reiniciado cerca de 24 horas após a germinação do esporo original. (ADAMS; WEISER; YU, 1998).

O término da reprodução assexual inicia-se no centro da colônia e é seguido pelo início de outro processo do desenvolvimento claramente reconhecível, a formação de esporos meióticos (ou sexuais).

O estágio envolve a formação de corpos frutificantes multicelulares, chamados cleistotécios, os quais são rodeados por células especializadas chamadas de células de Hülle. Dentro do cleistotécio, fusões nucleares originando núcleos diploides ($2n$) contendo 16 cromossomos ocorrem em hifas especializadas chamadas ascógenas. Estes núcleos diplóides sofrem meiose seguida de mitose formando 8 produtos haplóides binucleados, os ascósporos. Normalmente um único cleistotécio pode conter acima de meio milhão de ascósporos (COVE, 1977), fato que permite análises detalhadas dos eventos meióticos (BENNETT, 1985).

Como o conídio, a germinação do ascósporo resultada na regeneração de hifas vegetativas e reinício do ciclo de vida (Figura 4) (ADAMS; WEISER; YU, 1998; WHITEWAY; BACHEWICH, 2005).

A. nidulans é homotático, ou seja, auto-fértil e, diferentemente de outros fungos como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, não sofre qualquer “acasamento” *mating-type*. Entretanto, mesmo sendo homotático, são possíveis cruzamentos entre linhagens *A. nidulans*, cujas mutações se complementem por meio da anastomose de hifas e formação de heterocário. Neste caso, núcleos diferentes coexistem em mesmo citoplasma e raramente, fusionam-se resultando em cleistotécios híbridos. Este evento caracteriza o ciclo parassexual descoberto em *A. nidulans*, onde coexiste com o ciclo sexual padrão (ROPER, 1966).

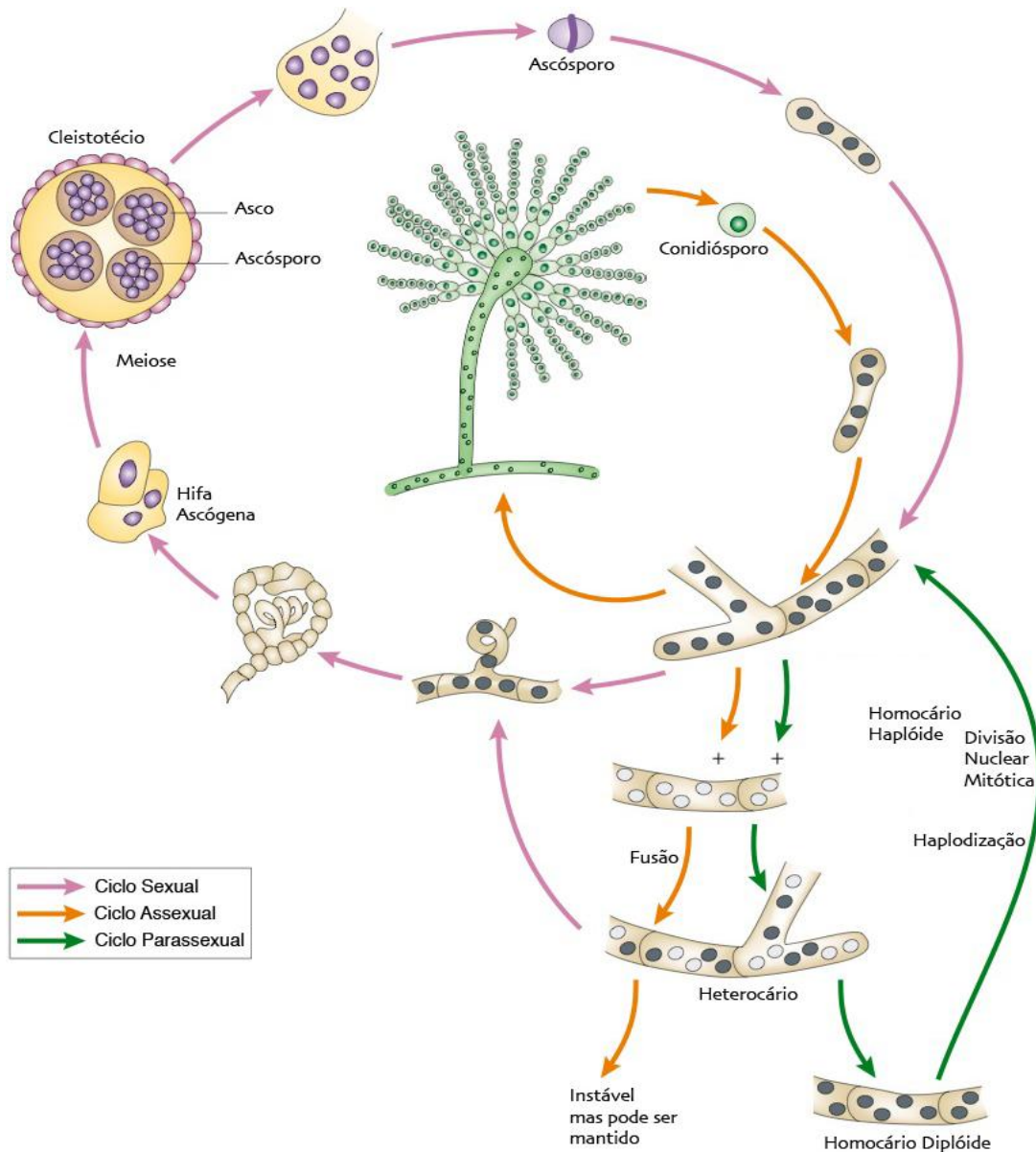


Figura 4. Ciclos de vida de *A. nidulans*.
Fonte: Casselton e Zolan (2002).

2.1.2. Ciclo Parassexual

O ciclo parassexual é caracterizado pela recombinação sem meiose. Tem sido encontrado comum a muitos fungos como *Aspergillus niger*, *A. rugulosus*, *A. fumigatus*, *A. sojae*, *Penicillium chrysogenum*, *P. italicum* entre muitos outros. Contudo, nem todos foram discutidos em detalhes como para *A. nidulans* (ROPER, 1966).

Três são os passos essenciais do ciclo parassexual, a heterocariose seguida de cariogamia, e segregação e recombinação em mitose (ROPER, 1966). Neste

ciclo a recombinação genética pode ocorrer dentro do crescimento vegetativo da hifa independentemente da meiose (WHITEWAY; BACHEWICH, 2005).

A ocorrência de fusões nucleares sem estruturas especializadas é um evento raro, porém uma excelente ferramenta genética (ZUCCHI; PIRES, 1997). Inicialmente, o processo parassexual ocorre após heterocariose, que é a coexistência de núcleos geneticamente diferentes em um mesmo citoplasma. No heterocário ocorrem raras fusões nucleares (1×10^{-7}) sem necessidade de estruturas especializadas, originando núcleos diplóides heterozigotos ($2n=16$ cromossomos). A produção de conídios diplóides recombinantes ocorre por mitoses dos núcleos diplóides. Estes diplóides que são mitoticamente instáveis devem ser haploidizados por aneuploidias sucessivas, perdendo cromossomos ao acaso até atingirem o estado haplóide estável ($n=8$ cromossomos). Estas perdas cromossômicas podem ser espontâneas ou induzidas através de drogas, tais como benomil, benlate e para-fluorofenilalanina (ZUCCHI; PIRES, 1997; BENNETT, 1985; WHITEWAY; BACHEWICH, 2005). O produto haplóide resultante pode ser analisado para evidências de *crossing-over* mitótico.

A fusão entre núcleos de diferentes constituições genótípicas é a fase mais importante deste ciclo, uma vez que, isso confere algumas vantagens da sexualidade. Como a haploidização independe do *crossing-over*, genes não-ligados, segregam independentemente e genes ligados somente em raras ocasiões o farão, isto como uma função da distância do mapa e frequência de recombinação. Durante a haploidização cromossomos inteiros segregam juntos. Isto torna a haploidização uma ferramenta poderosa para o mapeamento de genes nos grupos de ligação (CLUTTERBUCK, 1992).

Em 2003, Bennett e Johnson, evidenciaram o ciclo parassexual em *Candida albicans*, patógeno tradicionalmente classificado como diplóide que não apresenta fase sexual conhecida envolvendo meiose. Linhagens tetraploides ($4n$) em *C. albicans*, produzidas pelo cruzamento de duas linhagens diplóides, podem reduzir novamente para o estado diplóide por meio de perdas cromossômicas. Portanto, a perda cromossômica pode fornecer uma via alternativa a meiose e levar ao rearranjo do material genético produzindo indivíduos recombinantes (BENNETT; JOHNSON, 2003).

Assim, o ciclo parassexual confere características únicas aos fungos filamentosos que são vantajosas do ponto de vista genético, como o mapeamento de genes em grupos de ligação, variabilidade gênica e principalmente *crossing-over* mitótico.

2.1.3. Recombinação Meiótica x Mitótica

A revelação de que células somáticas também apresentavam *crossing-over*, ou rearranjo gênico para produzir novas combinações, não ocorreu até alguns anos após a descoberta da recombinação meiótica em 1936, quando Stern³ (apud ANDERSEN; SEKELSKY, 2010) propôs recombinação entre cromossomos homólogos para explicar mosaicismos em *Drosophila melanogaster*.

Ambas as recombinações são fundamentais para a manutenção de genomas estáveis, no entanto, existem diferenças essenciais no perfil e execução de cada uma delas (ANDERSEN; SEKELSKY, 2010).

As recombinações mitóticas e meióticas diferem-se fundamentalmente em propósito. A recombinação meiótica é ativamente promovida e regulada porque é crucial para a precisão da segregação cromossômica e variabilidade gênica. O *crossing-over* meiótico cria ligação física (quiasmas) entre os cromossomos homólogos, facilitando assim o seu alinhamento na placa metafásica e sua posterior disjunção na anáfase da meiose I. Em contraste, a recombinação mitótica é usada no reparo homólogo de danos espontâneos ou induzidos no DNA (ANDERSEN; SEKELSKY, 2010).

Diferentes tipos de danos infringidos no DNA como quebras duplas na fita, paralisação ou bloqueio da forquilha de replicação assim como arranjos mais complexos como a formação de estruturas chamadas “pés de galinhas” (**Figura 5C**) podem acionar preferencialmente a via de reparo celular por recombinação mitótica (HELLEYDAY, 2003; ANDERSEN; SEKELSKY, 2010).

³ STERN, C. Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 21, p. 625–730, 1936.

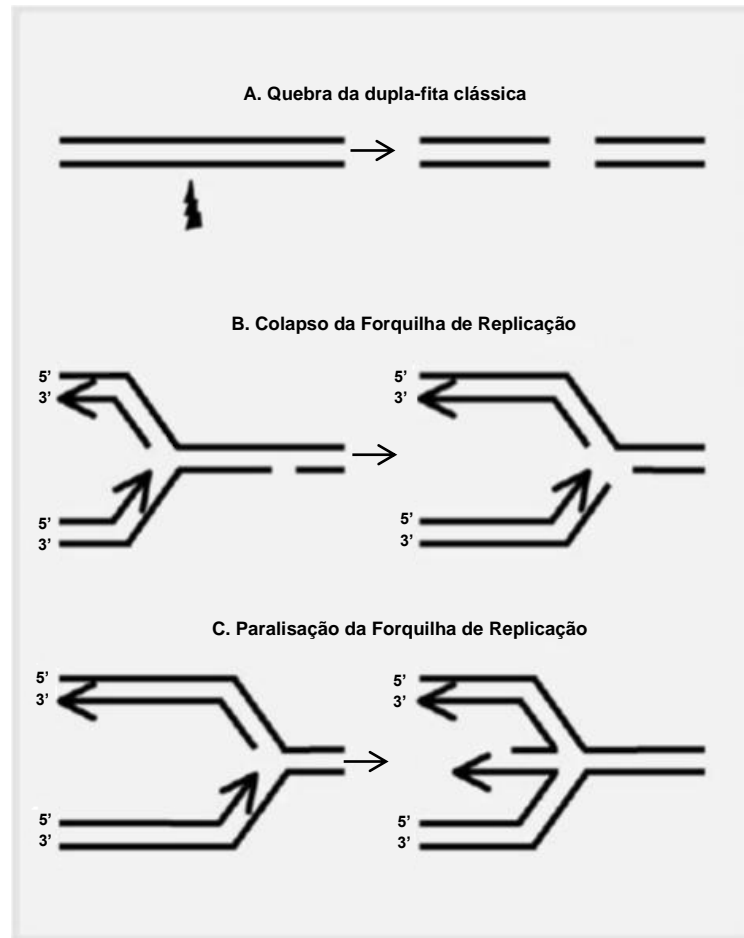


Figura 5. Substratos estruturais para recombinação em células de mamíferos. **A.** Clássica quebra dupla fita no DNA levam a formação de dois produtos finais que podem iniciar recombinação. **B.** Quebra de fita única persistente que pode colapsar a forquilha de replicação. **C.** A forquilha de replicação pode encontrar barreiras no molde de DNA que paralisam a forquilha. Sob tais condições a forquilha de replicação pode reverter e formar um intermediário com estrutura de “pé de galinha” que serve como substrato para a recombinação. Fonte: HELLEYDAY, 2003.

Esta via de reparo por recombinação homóloga faz uso de diversos mecanismos na tentativa de reparo do dano, contudo, os produtos resultantes deste reparo são sempre potencialmente prejudiciais a célula. O *crossing-over* mitótico é um destes mecanismos, entretanto, devido ao potencial para consequências negativas tais como por exemplo, o uso de cromossomos homólogos como molde na síntese da fita em reparo ao invés de cromátides-irmãs aumenta a probabilidade de erro devido a distância física entre os cromossomos e homozigotização (perda da heterozigose) de alelos recessivos que podem ser deletérios. A perda de

heterosigose pode inativar genes supressores tumorais e subsequentemente resultar em câncer (HELLEDAY, 2003). Vários são os estudos que indicam a recombinação homóloga como um dos principais processos da alteração genética na geração e progressão de um câncer. Altas frequências de recombinação homóloga geram instabilidade no genoma e maior é a probabilidade de desenvolvimento de cânceres, deste modo, o mecanismo de *crossing-over* mitótico pode ser tratado como um parâmetro indireto na inferência do potencial de carcinogênese de um agente físico ou químico (BISHOP; SCHIESTL, 2002).

Uma vez que o *crossing-over* mitótico é comparativamente raro e de maior dificuldade de detecção, a caracterização deste processo tem sido defasada (LAFAVE; SEKELSKY, 2009). Contudo, em eucariotos inferiores, como o fungo filamentosso *A. nidulans*, já foram detectadas alterações na expressão de genes, concomitantemente com alterações nas frequências de *crossing-over* mitótico entre genes ligados (ZUCCHI et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

2.1.4. *A. nidulans* como modelo biológico para detecção de *crossing-over* mitótico

A *crossing-over* mitótico é um processo que participa de numerosos eventos biológicos importantes como mecanismos de reparo do DNA (KUNZ; HAYNES, 1981), doenças genéticas humanas, e risco de câncer (CAIRNS, 1981; SCHIESTL, 1989).

A detecção do *crossing-over* mitótico, frequentemente associado com a perda da heterozigose (YOUNG et al., 2006), é especialmente importante devido a seu envolvimento na sequência de eventos que levam a tumorigênese (WANG et al., 1988; IMREH et al., 2003). Blackburn et al. (2004) mostraram o *crossing-over* mitótico como um evento chave no estabelecimento da perda da heterozigose em um sistema modelo de tumor mamário em ratos. Cavanne et al. (1993) evidenciaram que em células tumorais de pacientes com retinoblastoma o *crossing-over* mitótico induziu a homozigose permitindo expressão do alelo mutante do locus *Rb-1* do cromossomo 13.

Desta forma, a perda de heterozigosidade ou homozigotização induzida pelo *crossing-over* mitótico ocupa posição de destaque no processo de carcinogênese.

A. nidulans, um organismo geneticamente bem caracterizado, foi determinado como o organismo ideal para fornecer informações quanto ao *crossing-over* mitótico e seus aspectos relacionados. À ocorrência de células diplóides, recombinação mitótica e haploidização durante o ciclo sexual e parassexual (ROPER, 1952) deste fungo produz células haplóides que expressam rearranjos mitóticos ocorridos durante a fase diplóide. Neste contexto, Pires e Zucchi (1994) desenvolveram um teste usando *A. nidulans* como organismo modelo para a detecção da frequência de *crossing-over* mitótico.

2.1.5. Teste Índice de Homozigotização (HI) (Pires; Zucchi, 1994)

O teste do HI é sensível para detecção de eventos de *crossing-over* mitótico e é aplicado para detecção de efeitos genotóxicos provocados por diferentes agentes: físicos (radiação) (STOLL et al., 2008), químicos (fármacos) (SALVADOR et al., 2008) e biológicos (ácidos nucleicos exógenos) (PIRES; ZUCCHI, 1998).

Este sistema usa duas linhagens diplóides de *A. nidulans*, heterozigóticas para dez marcadores genéticos. Um dos diplóides, UT448//UT184, é bem conhecido por sua estabilidade e comportamento normal durante processos de: recombinação, reparo do DNA; e a outra linhagem diplóide, *Dp* (II-I)//UT184, também é bem conhecida geneticamente e carrega os mesmos marcadores genéticos heterozigóticos que a primeira, exceto para presença de uma duplicação *Dp* (II-I) em um dos componentes haplóides, transposta do cromossomo II para o cromossomo I, não reciprocamente.

A frequência de *crossing-over* mitótico é determinada através do cálculo do Índice de Homozigotização (HI). Sabe-se que agentes genotóxicos induzem lesões no DNA de diplóides heterozigotos para vários genes de requerimentos nutricionais que, se não reparadas imediatamente, podem aumentar as frequências de *crossing-over* mitótico entre os genes auxotróficos heterozigotos (+/-) e o centrômero. Em animais, os efeitos destes eventos podem ser detectados pelo aumento da frequência de desenvolvimento de tumores.

Quando o tratamento genotóxico é feito em MM, os diplóides recombinantes, homozigotos -/- não poderão se desenvolver. Assim dos quatro tipos de diplóides que poderão resultar de um *crossing-over* mitótico entre um marcador genético e o

centrômero, ou seja: +/+, +/-, -/+ e -/-, apenas três deles poderão se desenvolver em MM. Deste modo, somente aqueles conídios diplóides recombinantes +/+, +/- e -/+ formaram colônias em MM (Figura 6).

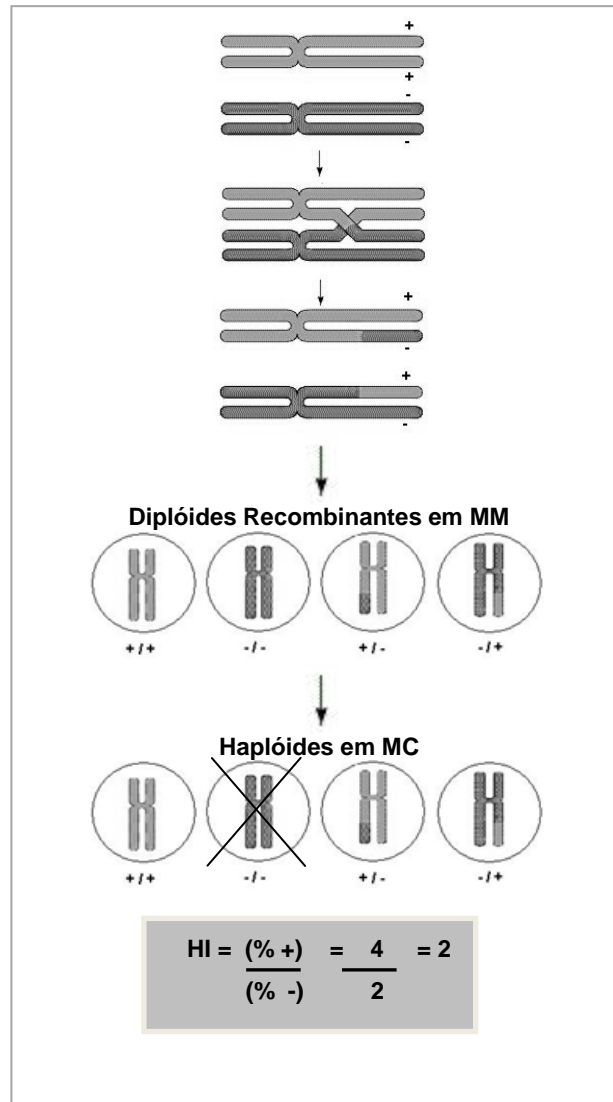


Figura 6. *Crossing-over* Mitótico em Diplóide Eucariótico e Seleção Contra os Diplóides Recombinantes Homozigotos para Genes Recessivos Auxotróficos.
Fonte: Zucchi (2005).

Conseqüentemente esta seleção contra os mutantes recessivos homozigotos promove distorções na taxa de segregação para 4(+) : 2(-) ao invés do esperado 4(+) : 4(-). A razão entre as taxas de segregantes haplóides prototróficos (+) e segregantes haplóides auxotróficos (-) determina o HI.

Assim quando nenhum evento de *crossing-over* ocorre a taxa de segregantes haplóides esperada é 4(+) : 4(-), logo o HI = 4/4=1. Deste modo valores de HI próximos de 1,0 indicam a não ocorrência de *crossing-over* ou que o gene focalizado

não está sendo selecionado contra em MM. Este é o caso dos marcadores de cores de conídio *w* e/ou *cha*, marcadores estes que servirão como indicadores da eficiência do método.

No caso da ocorrência de um *crossing-over* para qualquer marcador da uma célula diplóide heterozigota selecionada em MM, o HI é 2,0 ($HI = 4/2 = 2$) (PIRES; ZUCCHI, 1994). Valores maiores do que 2,0 indicam a ocorrência de eventos de *crossing-over* mitótico (para um dado marcador) em um grande número de células diplóides. Assim o índice de homozigotização (HI) é uma forma indireta de avaliar a frequência de *crossing-over* mitótico induzido pelo agente estudado. Quanto maior for o potencial genotóxico do agente usado no tratamento dos diplóides, maiores serão os HIs.

Becker et al. (2003) determinaram por meio do índice de homozigotização (HI) (PIRES; ZUCCHI, 1994) que o brometo de etídio, um inibidor por intercalação da topoisomerase II, *in vivo*, é potencialmente capaz de induzir *crossing-over* mitótico em diplóides *A. nidulans*.

A lactona sesquiterpênica cinaropicrina e uma saponina (stigmast-7en-3 β -ol-glucopyranoside) apresentaram significativo aumento no HI ao passo que o esteróide estigmasterol não apresentou tal efeito (SALVADOR et al., 2008).

Apesar da considerável acumulação de conhecimento dos efeitos tóxicos da ingestão e inalação de Mercúrio, especialmente em humanos, pouco se sabe sobre os efeitos genotóxicos do mercúrio. Após uma exposição de apenas 15 minutos ao vapor de mercúrio o teste HI acusou um aumento de 3,05 vezes mais *crossing-over* mitótico em uma das linhagens testadoras (SOUSA et al., 2009). A exposição, mesmo em doses sub-mutagênicas de conídios a uma atmosfera saturada de vapor de benzeno por 20 segundos foi suficiente para aumentar significativamente as frequências de *crossing-over* mitótico (ZUCCHI et al., 2005).

A irradiação de baixas doses de raios X (1-5 cGy), em doses usadas em clínicas dentárias, mesmo que baixas, promoveram aumento das frequências de *crossing-over* mitótico.

Assim, o teste o HI pode ser usado como um bioensaio para a avaliação rápida e eficiente do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos, como radiação e fármacos, por exemplo.

As primeiras indicações de que o aumento da incidência de doenças graves, como o câncer, estava relacionado à exposição aguda a certas substâncias químicas, apareceram na década de 70. Posteriormente, diversas análises foram conduzidas para vários compostos químicos e o processo de carcinogênese tornou-se objeto de experimentação (ZUCCHI, 2005).

Como mencionado anteriormente eventos de recombinação podem ser um indicador muito mais sensível aos efeitos biológicos de carcinogénos do que mutações de ponto, neste contexto, a complementação dos estudos genotóxicos da molécula MZ, uma molécula candidata a fármaco contra a Doença de Chagas, faz-se importante dado seu interesse farmacológico.

2.2. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial genotóxico da molécula MZ por meio do teste HI.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Genótipos das linhagens haplóides e diplóides do fungo filamentososo *A. nidulans*, para o teste do HI

Linhagens haplóides de *A. nidulans* (Eidam) Winter, são originárias de Glasgow e obtidas a partir de estoques de Utrecht, Holanda. Todas as linhagens usadas nesta pesquisa foram da coleção pessoal da Dr^a. Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi (USP).

UT448: *wA2* (II): conídios brancos; *riboA1*, *pabaA124*, *bioA1* (I): requerimentos para riboflavina, ácido paraminobenzóico e biotina; *AcrA1* (II): resistente a acriflavina (Figura 7A).

UT184: Conídios "chartreuse", *chaA1* (VIII); *piroA4* (IV); *sB3* (VI); *nicB8* (VII); *riboB2* (VIII): requerimentos para piridoxina, tiosulfato de sódio, nicotinamida e riboflavina; *gal A1* (III), *facA303* (V); *lacA1* (VI); incapaz de utilizar galactose, acetado e lactose como única fonte de carbono; *sulA1* (I); *AcrA1* (II): resistente a sulfanilamida e acriflavina (Figura 7B).

Dp (II-I): wA_2 (II): conídios brancos; *riboA1*, *paba124*; *bioA1* (I); requerimentos para riboflavina, ácido paraminobenzóico e biotina; *AcrA1* (II): resistente a acriflavina; *uvs* (II): sensível a luz UV; *Dp* (II-I) duplicação de um segmento de cromossomo II transposto para o I, inserido no intervalo *paba-y* (Figura 7C).

A Figura 8 mostra o esquema genético das linhagens haplóides UT448, UT184.

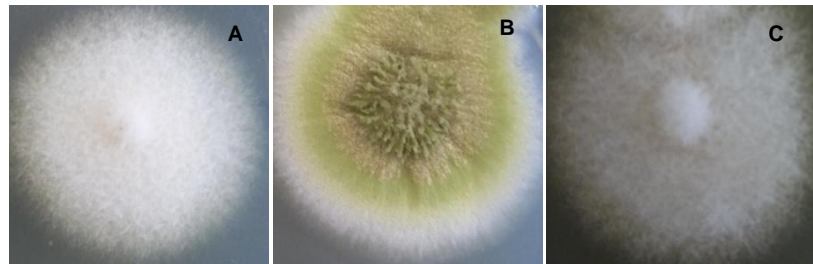


Figura 7. Morfologia das linhagens haplóides⁴.

⁴ A cor dos conídios em *A. nidulans* depende dos pigmentos produzidos pelo ascóporo maduro e envolve a expressão de pelo menos dois genes: *yA* e *wA*. O produto de *yA* é a lacase, que transforma o pigmento amarelo precursor em pigmento verde (y^+). O gene *wA* codifica uma policetônico sintase; mutações nesse gene resultam em linhagens de esporos brancos (MAYORGA; TIMBERLAKE, 1992). A cor dos conídios depende do alelo w^+ presente no cromossomo II. Conídios verdes dependem da presença do alelo y^+ , no cromossomo I. Desse modo, genótipos y^+w^+ , y^+w , yw^+ , yw resultam em conídios com fenótipos verde, branco, amarelo e branco, respectivamente (TILBURN et al., 1990; TIMBERLAKE; MARSHALL, 1988).

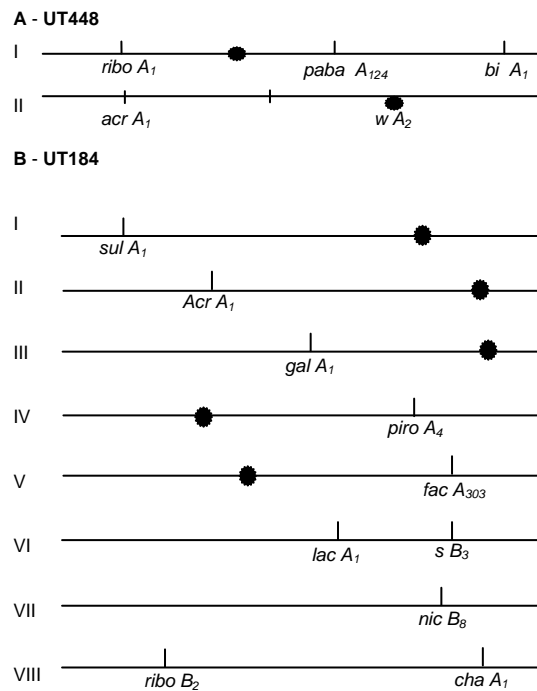


Figura 8. **A.** Distribuição dos marcadores nutricionais da linhagem haplóide UT448. **B.** Distribuição dos marcadores nutricionais da linhagem haplóide UT184. Os círculos representam os centrômeros.

2.3.2. Meios de cultura e soluções

Meio completo (MC) e meio mínimo (MM) foram descritos por Zucchi (1990 ab), com base em Van de Vate e Jansen, 1978. Meio seletivo (MS) constou de MM suplementado de acordo com os requerimentos das linhagens usadas. Meio sólido continha 1,5% de ágar.

Os conídios das linhagens usadas foram inoculados e cresceram em MC ágar semi-sólido (12 g/L), a 37 °C e mantidos a 4 °C, para estoques das linhagens.

MM líquido acrescido de 2% de MC líquido foi utilizado nos cruzamentos.

2.3.3. Preparação de suspensão de conídios

Conídios das linhagens UT448, UT184 e *Dp* (II-I) foram coletados das colônias crescidas em MC, lavando-se a superfície duas vezes com 10,0 mL de salina Tween 80 (0,01%) e raspando-se suavemente com bastão de vidro. A

suspensão foi filtrada através de um filtro de algodão de vidro. Todos estes passos foram feitos sob condições de esterilidade. O filtrado foi então centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, transferido para frascos com rolhas e sonicados por 15 minutos. A suspensão de conídios foi mantida a 7 °C durante todo o período de estudo enquanto os outros passos foram executados.

2.3.4. Obtenção do heterocário e do Diplóide Heterozigoto

10^7 conídios das linhagens haplóides, com requerimentos nutricionais complementares, foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de MM + 2,0% de MC líquido. Depois de 72 h a 37 °C, formou-se na superfície do líquido uma película densa que corresponde a uma massa micelial heterocariótica.

O heterocário dos cruzamentos foi recolhido do tubo com alça de platina, e posicionado na superfície de uma placa com MM que foi incubada, a 37 °C por 6 dias. Após este período foram observadas áreas de crescimento vigoroso dentro das regiões heterocarióticas. Estas áreas correspondem ao diplóide heterozigoto que consegue crescer bem em MM, uma vez que as auxotrofias envolvidas no cruzamento são complementares. Amostras desses conídios foram transferidas novamente para MM para purificação do diplóide. A figura 8 mostra o mapa genético da linhagem *Dp* (II-I)//UT184.

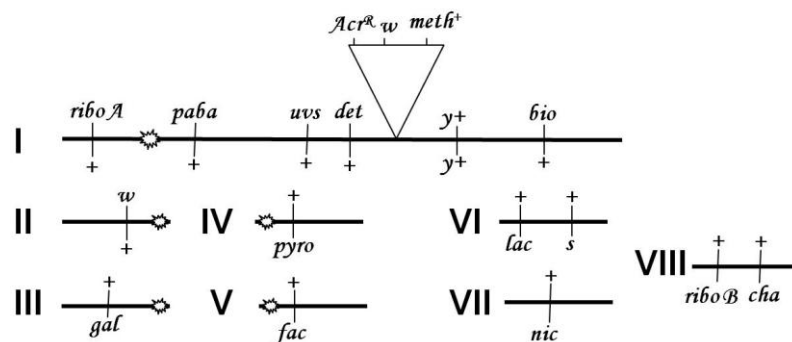


Figura 9. Mapa genético da linhagem diplóide *Dp* (II-I)//184. I a VIII representam os 8 grupos de ligação das linhagens diplóides; os círculos representam os centrômeros. As posições dos *loci* estão relativamente apresentadas. Os marcadores genéticos apresentados na parte superior de cada cromossomo são da linhagem parental *Dp* (II-I), e aqueles apresentados sob as linhas representando os cromossomos, são da outra linhagem parental, UT184. Os marcadores genéticos *uvc* e *det*, no cromossomo I, são resultados de rearranjos no DNA, depois da inserção de um segmento duplicado transposto do cromossomo II para o I.

2.3.5. Exposição dos Diplóides de *A. nidulans* ao MZ e Controle

Das linhagens diplóides obtidas apenas a *Dp* (II-I)//UT184 foi inoculada na superfície de ágar sólido MM contendo 0,1 % DMSO (v/v) para controle negativo, MZ e incubado a 37 °C durante 7 dias. Para exposição do diplóide este foi inoculado no centro de placas com MM + MZ na concentração de 2, 4 e 8 µg/mL e incubado a 37 °C durante 7 dias.

2.3.6. Análise mitótica

Setores diplóides *Dp* (II-I)//UT184 tratado com MZ e DMSO, provavelmente recombinantes, foram obtidos e purificados para MM. Cada setor foi então haploidizado de maneira induzida em MC + *p*FA (0,5 mg/mL), incubação a 37 °C por 7 dias. Os setores obtidos deste tratamento foram transferidos para uma das 25 posições definidas da “placa mestra” (PM) contendo MC. Depois de três dias de incubação a 37 °C, estas colônias foram replicadas, com um replicador multifio, para placas de análise contendo meio seletivo (SM), MM + 1 µg/mL de riboflavina; 0,7 µg/mL de ácido *p*-aminobenzóico; 0,02 µg/mL de biotina; 0,5 µg/mL de piridoxina, 1,0 µg/mL nicotinamida e 1,24 mg/mL de tiosulfato de sódio, sempre suplementado de todos os requerimentos nutricionais, exceto um deles. As placas SM foram incubadas a 37 °C e as leituras foram feitas após 24 e 48 horas de incubação. A partir dos resultados das placas SM, foram obtidas as listas dos genótipos das colônias haplóides.

2.3.7. Análises estatísticas

Os HIs fornecidos pela linhagem, após exposição ao MZ e controle, depois da haploidização, resultam em distorções não esperadas de segregantes. Os resultados das análises mitóticas e seus índices de homozigotização foram dispostos no formato de Quadrado Latino (tabelas 1-5, Apêndice). O programa Placas (elaborado pelo Dr. César Bonatto – Dept.º Física – UFPB) gerou os quadrados latinos apresentados.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//184 (Figura 10) foram obtido por anastomose de hifas e fusão de núcleos geneticamente diferentes, fenômeno conhecido como heterocariose, como citado no item 2.3.4. Os 2% de MC permite uma pequena germinação dos conídios (*start*) levando a anastomose das hifas de linhagens de constituições genéticas diferentes, seguido de fusão de alguns ($1/10^7$) dos conídios haplóides gerando o diplóide. A principal característica de *A. nidulans* diplóide é sua cor verde escuro em MM.

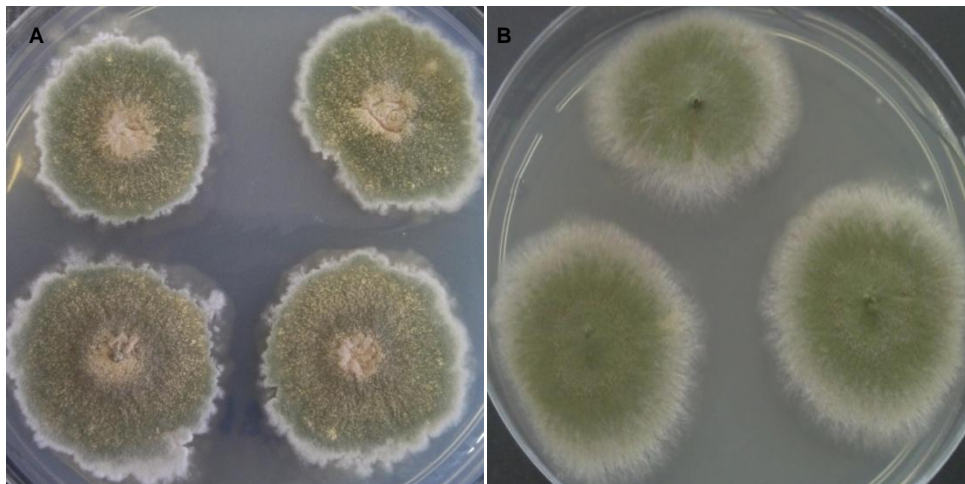


Figura 10. Morfologia das linhagens diplóides obtidas. **A.** Linhagem 448//184. **B** Linhagem *Dp* (II-I)//184.

A análise mitótica, através do ciclo parassexual, visa fornecer informações sobre a segregação dos diferentes cromossomos durante a haploidização. Ela também pode evidenciar alterações nas frequências de *crossing-over* mitótico, bem como qualquer anormalidade na segregação dos diferentes grupos de ligação, durante a haploidização.

A linhagem diplóide *Dp*(II/I)//UT184 é geneticamente instável, além da instabilidade decorrente da diploidia, a transposição de um segmento duplicado do cromossomo II para o I faz dela ainda mais instável e somente o mecanismo de reparo recombinacional é atuante. Portanto ao longo de seu crescimento vegetativo

é natural o aparecimento de setores diplóides visivelmente distintos e possivelmente recombinantes. A adição de MZ e DMSO ao MM obriga a linhagem a se desenvolver exposta a ação destes químicos. A formação destes setores diplóides (Figura 11) na massa micelial é decorrente provavelmente de eventos genéticos como, mutações, perda de cromossomos e processos recombinogênicos.

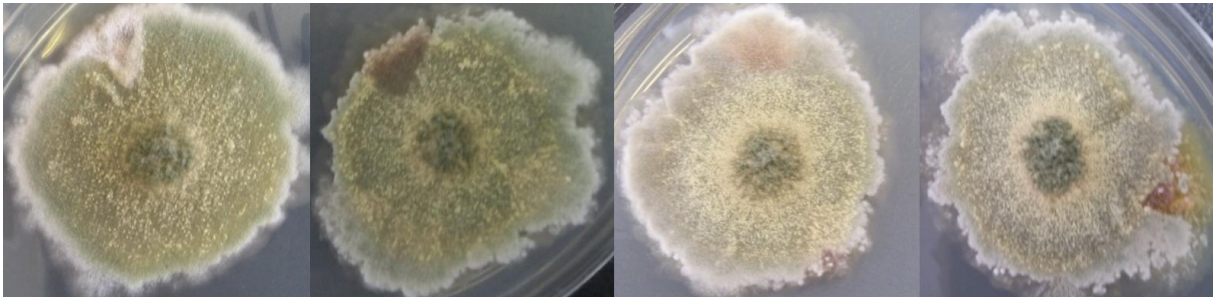


Figura 11. Setores diplóides provavelmente recombinantes obtidos a partir da linhagem diplóide *Dp* (II-I)//UT184 na presença de MZ.

A purificação destes setores diplóides e haploidização, espontânea ou induzida em MC+pFA (0,5 mg/mL), forneceu setores haplóides estáveis recombinados. Estes setores haplóides foram então inoculados em PMs (Figura 12) e então em SM para determinação dos padrões de segregação cromossômica a partir dos vários marcadores nutricionais presentes ao longo dos oito cromossomos de *A. nidulans*.

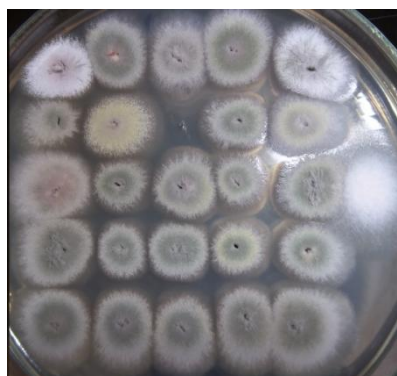


Figura 12. Placas Mestras (MC) contendo 24 colônias em posições definidas, padrão 5x5. Ao lado direito, controle *Dp* (II-I).

Para o mapeamento de cada setor haplóide obtido, placas seletivas com todos os requerimentos nutricionais menos um deles foram preparadas e as placas mestras replicadas. Assim na placa seletiva que apresenta todos os requerimentos menos nicotinamida, por exemplo, aqueles setores que não conseguiram sobreviver são aqueles que não apresentam o gene para produção de nicotinamida e assim por diante. A disposição do mapeamento genético em forma de quadrados latinos (APÊNDICE) permitiu a verificação dos padrões de segregação de cada marcador nutricional e cálculo do HI.

A figura 13 apresenta as médias de HIs obtidas para cada tratamento.

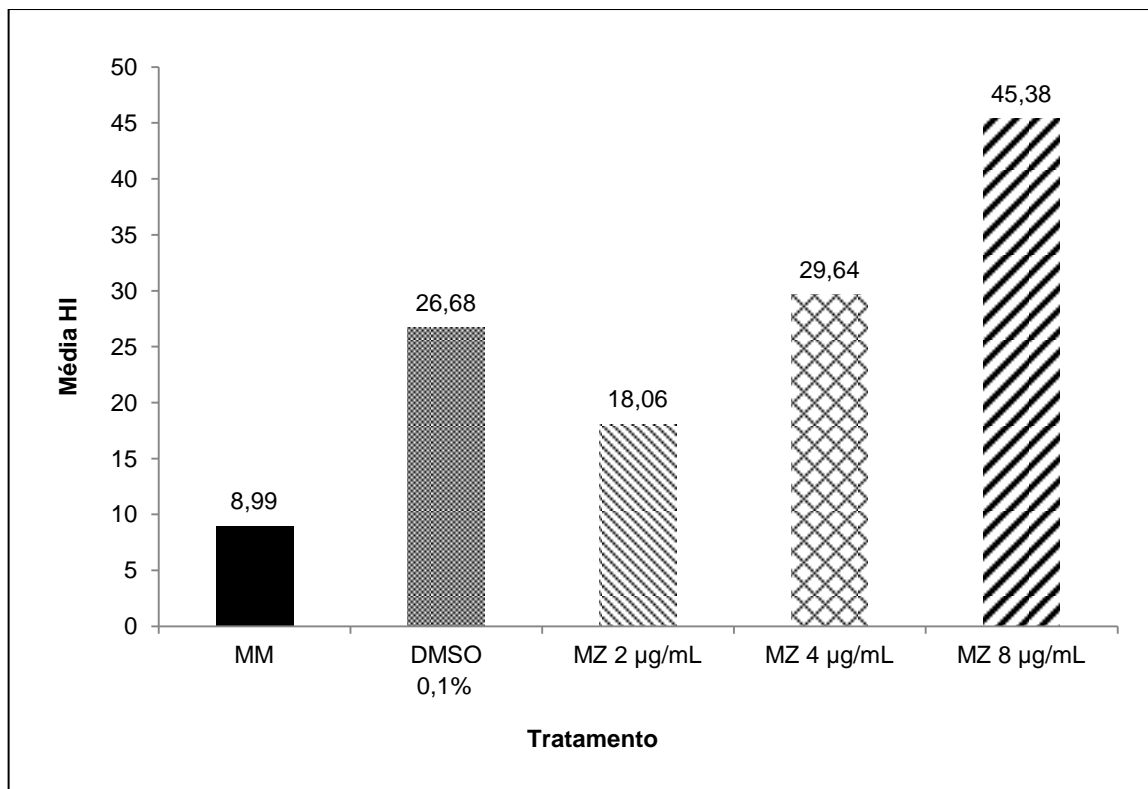


Figura 13. Médias dos HIs do diplóide *Dp* (II-I)/UT184 *A. nidulans* tratado com MZ.

Exceto pelo reparo recombinacional, a linhagem diplóide *Dp*(II-I)//UT184 é deficiente em todos os mecanismos conhecidos de reparo do DNA, assim é esperado distorções nas taxas de segregação alélicas decorrentes das lesões recombinogênicas espontâneas durante as replicações normais do DNA, assim a ocorrência de *crossing-over* mitótico e seleção contra os alelos mutantes (-) é

esperada mesmo sem qualquer tratamento genotóxico. Esta sensibilidade da linhagem pode ser bem demonstrada pela média de HI em MM de 8,99.

O MZ é uma molécula lipofílica praticamente insolúvel em água e, portanto necessita de solvente apropriado para sua dissolução. O dimetilsulfóxido (DMSO) é o principal solvente do MZ e uma vez que foi usado no preparo das soluções este foi analisado mitoticamente como controle negativo do MZ. A partir da análise de 148 colônias e 10 marcadores genéticos (o marcador *pyro* não foi incluído nas análises estatísticas devido a um erro no preparo do SM) a média das taxas de segregação para o DMSO foi de 26,68. Surpreendentemente, o DMSO apresentou um considerável aumento na frequência de *crossing-over* mitótico.

O DMSO é um excipiente comumente usado como controle negativo para vários teste de avaliação mutagênica como Ames, Cometa, Aberrações Cromossômicas, Micronúcleo. Recente Aye et al. (2010) definiu o DMSO como um agente comprovadamente não mutagênico e seguro para células humanos, órgãos ou embriões, entretanto, os resultados desta pesquisa determinam uma maior cautela quanto a esta afirmação pois o DMSO foi genotóxico mesmo em baixa concentração.

O termo genotóxico refere-se a agentes que interagem com o DNA e/ou componentes celulares que regulam a fidelidade do genoma tais como aparato de fuso, topoisomerasas, sistema de reparo e DNA polimerases e incluem efeitos adversos na informação genética, independente do mecanismo pelo qual que a alteração é induzida. Estes efeitos danosos podem ser medidos diretamente ou indiretamente e não estão necessariamente associados com mutagenicidade. Genotoxicidade é, portanto, um termo mais amplo para mutagênese que se refere à capacidade para a indução de mutações (EASTMOND et al., 2009). Portanto apesar de não mutagênico o DMSO é genotóxico e faz referência a premissa de que todo mutágeno é um carcinogéno, mas nem todo carcinogéno é um mutágeno.

O tratamento com MZ com 2 e 4 µg/mL apresentaram frequências de *crossing-over* mitótico de 18,06 e 29,64, respectivamente. Devido à alta frequência de *crossing-over* mitótico produzida pelo DMSO pode-se julgar que o HI destas doses de MZ é decorrente do efeito genotóxico do DMSO e somente a partir da dose de 8 µg/mL o MZ demonstra claro efeito genotóxico.

Até o momento, o MZ foi determinado como mutagênico em baixas doses (0,1 µg/mL) pelo Teste de Ames, (FERREIRA; FERREIRA, 1986ab), citotóxico em doses de 20 µg/mL para levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa D7), e 4 µg/mL foi a primeira dose significativamente ($P > 0,001$) genotóxica acusada pelo Teste Cometa (POLI et al., 2002). A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se adicionar o potencial genotóxico/carcinogênico a esta molécula.

Agentes endógenos e exógenos podem promover dano ao DNA e as respostas celulares podem aparecer de acordo com a atividade das várias vias de reparo do DNA resultando no aumento das taxas de mutação e *crossing-over* mitótico (BELJANSKI et al., 2004). Uma vez que tais respostas biológicas indicam dano ao DNA elas podem ser úteis na detecção de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (HOLLSTEIN et al., 1979; ZEIGER, 1998).

Dentro de uma bateria de testes validados para avaliação genotóxica, o Teste Mutação Reversa em *Salmonella typhimurium* ou Teste de Ames (*Salmonella*/Microsoma) o qual avalia a frequência de mutações reversas induzidas pelo composto em células bacterianas em cultura, é o método de avaliação de mutação gênica mais conhecido e aceito internacionalmente (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Contudo, células bacterianas apesar da obtenção de populações numerosas, taxa de crescimento rápida, baixo custo e manutenção prática apresentam algumas desvantagens em sua utilização como organismo para detecção de genotoxicidade. As respostas celulares para algumas moléculas são diferentes em procariotos e eucariotos e isto limita sua aplicação na avaliação toxicológica e *screening* de fármacos para organismos superiores. Células de fungo, entretanto, podem eliminar todas as desvantagens oferecidas pelo aparato bacteriano e adicionalmente, podem fornecer informações mais relevantes diretamente aplicáveis a outros organismos eucariotos (BARONION, 2004). Ademais, Schiestl et al. (1994) afirmou que a recombinação pode ser um indicador muito mais sensível aos efeitos biológicos da carcinogênese do que as mutações de ponto.

A linhagem diplóide heterozigota para 16 genes (alguns ligados ou não) *Dp (II-1)//UT184* foi selecionada como organismo eucariótico modelo para avaliação do potencial genotóxico/recombinogênico da molécula MZ, agente anti-chagásico.

Genes simples segregam em taxas esperadas de 1(+): 1(-), padrão normal de segregação mendeliana. A ocorrência de *crossing-over* entre o marcador nutricional genético e o centrômero é um evento raro e pode levar a homozigotização dos alelos em heterozigose.

No teste HI, as pressões seletivas impostas contra os haplóides portadores de auxotrofias, ou seja, recombinantes obtidos a partir de *crossing-over* mitótico decorrente do dano imposto pelo tratamento em questão, permitem a inferência das frequências alteradas de *crossing-over* mitótico para os 11 marcadores distribuídos ao longo dos 16 cromossomos ($2n$) de *A. nidulans*. Quanto maior a frequência de *crossing-over* mitótico maior o potencial carcinogênico/recombinogênico do agente testado. O aumento das frequências de *crossing-over* mitótico decorrente do tratamento com MZ foi comparável ao aumento das frequências de *crossing-over* mitótico do tratamento de 25 µg/mL da lactona sesquiterpênica cinaropicrina e uma saponina (stigmast-7en-3β-ol-glucopyranoside) (SALVADOR, 2008). Estudos da genotoxicidade de vapores de benzeno e mercúrio mostraram uma alteração das frequências de *crossing-over* mitótico menores aquelas encontradas pelo tratamento com MZ situando o potencial carcinogênico encontrado para o MZ a dois agentes conhecidamente tóxicos.

A tabela 1 compara o teste HI com alguns outros corriqueiramente empregados em análises genotóxicas e pontua sua importância exploratória uma vez que poucos testes avaliam o parâmetro carcinogenicidade.

Tabela 1 - Comparações e contrastes entre o teste do HI com outros testes de genotoxicidade.

Teste Tipo	Alvo do teste	Tipo de Amostra	Usa animais?	Execução fácil e rápida	Determina carcinogenicidade?
Cometa	Dano e reparo no DNA	Células	Sim	Sim	Não
Ames	Mutagenicidade no gene <i>his</i> ⁻	<i>Salmonella typhimurium</i> (<i>his</i> ⁻)	Não	Sim	Não
Mutatox	Agente Genotóxico	<i>Vibre fechei</i>	Sim	Sim	Não
MutaMouse	Mutagenicidade no gene <i>lac</i>	Muta Mouse	Sim	Não	Não
Focos em fígado de rato	Focos hepáticos alterados	Fígado de rato	Sim	Não	Sim
HI	Freqüência de recombinação mitótica alterada	Diplóide heterozigoto <i>Aspergillus nidulans</i>	Não	Sim	Sim

Fonte: Zucchi, 2005

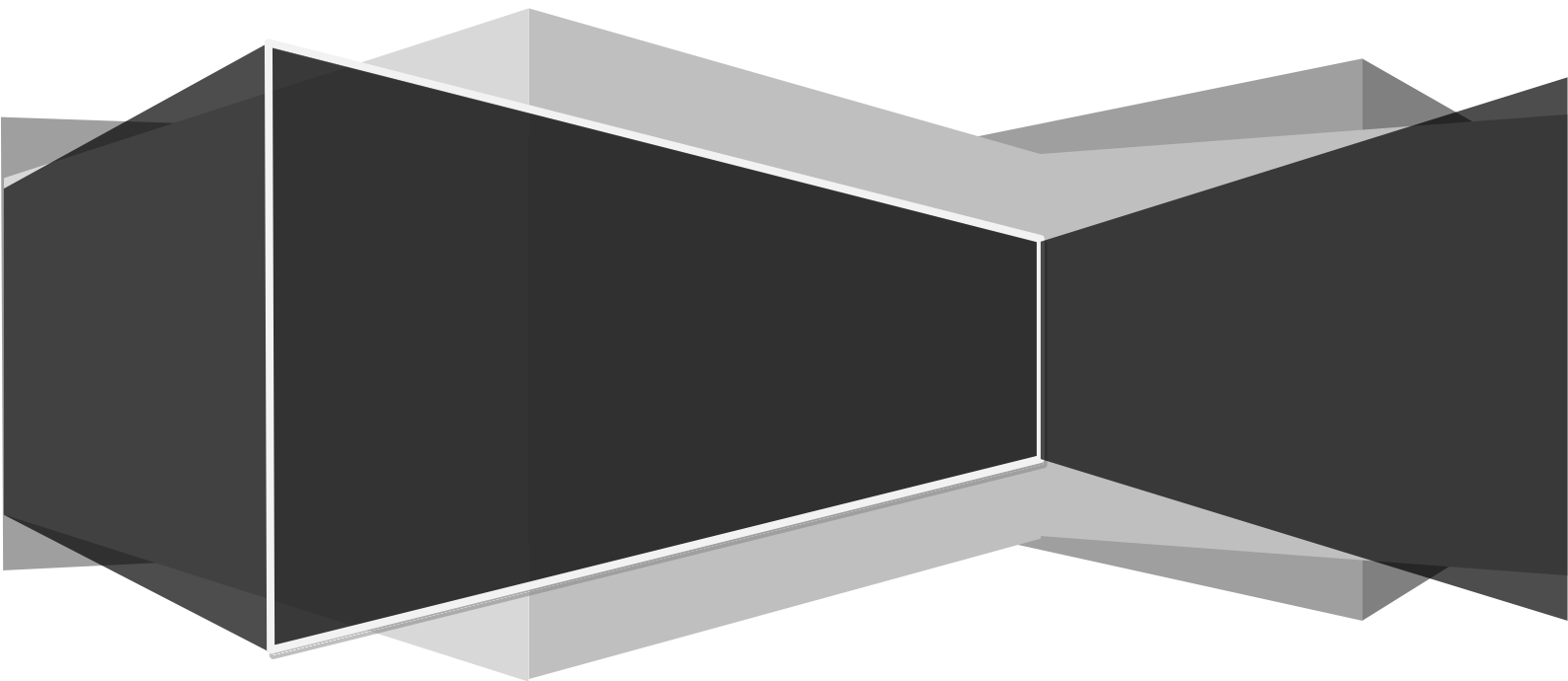
2.5. CONCLUSÕES

A alta freqüência de reparo dos danos infringidos ao DNA por meio da via de reparo por recombinação homóloga está intimamente ligada à iniciação e a progressão de cânceres. O *crossing-over* mitótico é dos mecanismos desta via raramente utilizado para o reparo devido à grande potencialidade para conseqüências negativas a célula. Neste contexto, a inferência da freqüência de *crossing-over* mitótico foi a medida indireta selecionada para determinar a potencialidade dos efeitos genotóxicos e possivelmente carciongênicos do MZ e o DMSO em *A. nidulans*, um eucarioto inferior.

Surpreendentemente, o DMSO, solvente corriqueiramente usando como controle negativo em vários testes de mutagênese, apresentou altas taxas de *crossing-over* mitótico. Para o tratamento com MZ uma resposta aparentemente dose-dependente pode ser visualizada. O efeito genotóxico das doses 2 e 4 µg/mL foi considerado uma conseqüência do efeito genotóxico do DMSO e apenas a dose de 8 µg/mL de MZ demonstra o claro efeito genotóxico deste.

CAPÍTULO III

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) CONTENDO MEGAZOL



3.1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de novos fármacos, numerosos compostos são desenhados e sintetizados e muitos candidatos com alta atividade biológica, porém, baixa solubilidade e efeitos colaterais são identificados. A fim de uma aplicação clínica destes compostos uma técnica para solubilização e controle da biodistribuição destes é necessária (ISHIHARA et al., 2008).

Neste contexto, a aplicação de micelas poliméricas no transporte de fármacos, principalmente hidrofóbicos, vem ganhando espaço no desenvolvimento tecnológico farmacêutico.

3.1.1 Sistema Nanoparticulados para o Transporte de Fármacos (SNTF)

Sistemas coloidais nanoparticulados para transporte de fármacos com diferentes composições, *designer* estrutural e propriedades biológicas têm sido extensivamente investigados e um número destes já se encontra em fase de estudos pré-clínicos ou disponíveis no mercado (DUNCAN, 2003). Nos últimos anos, várias companhias farmacêuticas ganharam aprovação da Food and Drug Administration (FDA) para uso e desenvolvimento de fármacos baseadas em nanotecnologia (BHAVSAR et al., 2006; DUNCAN, 2003).

Entre as vantagens que os nanosistemas podem oferecer destacam-se (i) a proteção do fármaco contra possíveis instabilidades no organismo, como a degradação do fármaco na administração, (ii) o aumento da eficácia terapêutica, (iii) a liberação progressiva e controlada do fármaco, (iv) a diminuição da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima, (v) o direcionamento do fármaco para alvos específicos, (vi) a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrófilas quanto lipófilas, (vii) e a diminuição da dose terapêutica e da frequência de administrações com conseqüente aumento da adesão do doente a terapêutica (PIMENTEL et al., 2007).

A funcionalização da superfície dos nanotransportadores pode conferir várias vantagens como habilitar o reconhecimento e a ligação em tecidos e células-alvo via ligante específico e habilitar uma resposta como a liberação do fármaco encapsulado a partir de um estímulo, agir especificamente na membrana celular sob

o estímulo anormal de pH ou temperatura característico do local patológico, habilitar a penetração dentro das células e escape da degradação lisossomal para um transporte eficiente de fármacos intracelulares (TORCHILIN, 2006). Assim, várias são as estratégias disponíveis que podem melhorar drasticamente a eficiência dos SNTF dependendo da aplicação desejada.

Entre todos os nanosistemas, lipossomos e nanopartículas poliméricas são mais amplamente usados como sistemas de transporte de fármacos (SAPRA; TYAGI; ALLEN, 2005).

As nanopartículas poliméricas têm um enorme potencial para o transporte de agentes farmacológicos. O termo nanopartículas inclui nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem na composição e organização estrutural. Nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (Figura 14) onde o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por sua vez as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003).

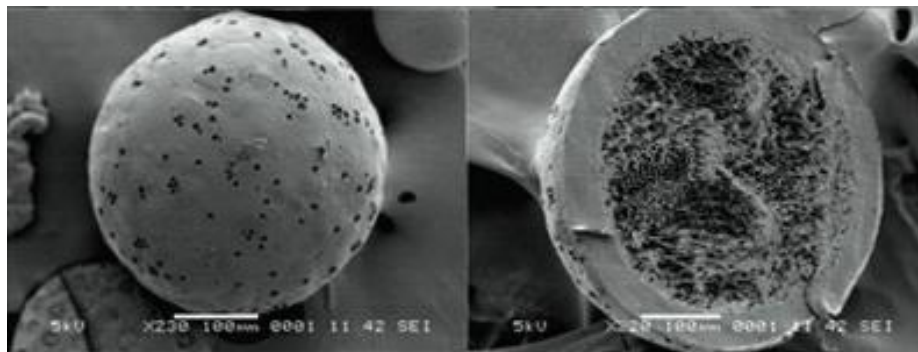


Figura 14. Micrografias MEV da morfologia externa e interna de micropartículas PLLA/PLGA.
Fonte: Lee et al. (2011)

A escolha do polímero adequado promove proteção e liberação controlada do agente bioativo transportado de maneira a manter os níveis plasmáticos deste em concentrações relativamente constantes. Assim há a melhora na terapêutica e declínio dos efeitos colaterais.

Os polímeros utilizados nas nanopartículas podem ser classificados como naturais ou sintéticos e biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Os polímeros sintéticos têm a vantagem de propriedades químicas e físicas bem definidas que resultam em um comportamento biológico relativamente esperado (CHAKRAVARTHI, 2006). As cadeias poliméricas ramificadas ou lineares podem funcionar como um bioativo (um fármaco polimérico) ou, alternativamente, e mais normalmente, como um componente estrutural inerte do sistema nanoparticulado (DUNCAN, 2003). Os polímeros biodegradáveis são biocompatíveis e degradáveis, isto é, *in vivo* degradam em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não criam nenhuma resposta inflamatória. Por sua vez, os polímeros não-biodegradáveis não são metabolizados e se acumulam no organismo incitando respostas de defesa.

Para fins terapêuticos, os polímeros devem ser biodegradáveis e biocompatíveis, ou seja, devem ser metabolizados em produtos fisiologicamente inertes que serão eliminados pelo corpo e não devem incitar reação imune ou inflamatória, respectivamente (CHAKRAVARTHI, 2006).

Vários são os polímeros que têm sido utilizados no desenvolvimento de nanosistemas transportadores de fármacos como o poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), polilactato (PLA), polianidrilos, poli- ϵ -caprolactona (PCL), alginatos, celulose, quitosana entre muitos outros. Devido à grande quantidade de polímeros aprovados para uso clínico, a escolha do mais adequado e do método de produção das nanopartículas dependerá das características do fármaco a ser encapsulado e da finalidade de aplicação como a rota de administração e o local patológico de deposição (DUNCAN, 2003).

Fármacos com baixa solubilidade em água, como o MZ, apresentam sérios problemas restritivos como menor biodisponibilidade e dificuldade de formulação. Por outro lado, a hidrofobicidade é uma característica intrínseca da molécula que confere propriedades biológicas como, para o MZ, a penetração passiva de membranas celulares o que é de extrema importância no alcance de alvos intracelulares (TORCHILIN, 2006; BARRET et al., 2000).

O transporte de fármacos com esta natureza hidrofóbica pode ser realizado via nanopartículas poliméricas a fim de usufruir de suas vantagens frente às formulações convencionais. Dentre os benefícios oferecidos pelo SNTF, a

diminuição da toxicidade decorrente de uma liberação controlada do composto bioativo de modo a evitar picos de concentração máxima e/ou a liberação sítio específica, permitem a retomada de estudos acerca de moléculas de baixa solubilidade e cito/genotoxicidade como o MZ.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi obter nanopartículas poliméricas de PCL contendo MZ, de tamanho médio inferior a 500 nm, morfologicamente esféricas e com alta eficiência de encapsulação do MZ para posteriores estudos biológicos deste sistema.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Preparação de nanopartículas de PCL contendo MZ;
- Desenvolvimento de método analítico para quantificação de MZ associado às nanopartículas;
- Caracterização físico-química das nanopartículas;

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material

3.3.1.1 Molécula de Estudo

A molécula sob estudo é 1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol, conhecida como MZ, foi sintetizada no Laboratório de Síntese e Otimização de Fármacos do Departamento de Tecnologia de Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo pela Dr^a. Cristina Northfleet de Albuquerque.

3.3.1.2 Reagentes

Todos os reagentes usados nesta pesquisa estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 2 - Materiais utilizados na pesquisa

Materiais	Fabricante	Especificações
Poly(ϵ -caprolactone)	Sigma-Aldrich, Estrasburgo, França	PM 60kDa
Mygliol® 810	Brasquim, Porto Alegre, Brasil	-
Span® 60	Delaware, Porto Alegre, Brasil	E.H.L = 4,7
Tween® 80	Delaware, Porto Alegre, Brasil	E.H.L. = 15,0
Acetona P.A	Synth	PM = 58,08
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth	CAS. 67-68-5
Acetonitrila	Carbo Erba	CAS. 75-05-8

3.3.1.3 Equipamentos

- Agitador Magnético Quimis
- Balança analítica modelo AUW-D Shimadzu®
- Centrífuga 5424 R Eppendorf®
- Espectrofotômetro Hewlett Packard-HP®, modelo 8453 munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a computador.
- Liofilizador Medizinischer Apparatebau 336 osterode/harz - Ehvisa - Volkswagenwerk
- Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta-600 (FEI, Eindhoven, Netherlands) e sistema de metalização Bal-Tec MED-020
- Rotavapor® R-3/Vacuum Pump V-700 BUCHI
- Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK)

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Obtenção das Nanopartículas de PCL contendo MZ

Para a obtenção das nanopartículas contendo MZ foi utilizado o método de nanoprecipitação descrito por Fessi et al. (1989).

A 40°C, PCL (Sigma-Aldrich, Estrasburgo, França) (0,318 g), triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (1,003 g) (Mygliol®, Brasquim, Porto Alegre, Brasil) e monoestearato de sorbitan (0,237 g) (Span 60®, Delaware, Porto Alegre, Brasil) foram solubilizados em acetona P.A (Synth) (81 mL). Em um frasco béquer separado, polissorbato 80 (0,225 g) (Tween 80®, Delaware, Porto Alegre, Brasil) foi adicionado em 159 mL de água. Sob agitação de 400 rpm, e com auxílio de um funil Eppendorf® para o controle da velocidade de versão, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa. Após 10 minutos de agitação da suspensão a acetona foi eliminada e a fase aquosa concentrada sob pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório a 40°C (Rotavapor® R-3/Vacuum Pump V-700 BUCHI). O volume final foi ajustado para 30 mL.

Desta maneira, suspensões de nanopartículas brancas, ou seja, sem a adição do MZ, foram obtidas na concentração de 10 µg/ml de polímero PCL. As amostras contendo MZ foram preparadas pela adição deste (3 mL de solução 1%DMSO/PBS 10 µg/ml) na fase orgânica antes da nanoprecipitação.

3.3.2.2 Determinação do diâmetro médio e polidispersão das nanopartículas de PCL contendo MZ

O diâmetro das partículas em suspensão e o índice de polidispersão foram determinados por espalhamento de luz dinâmica diluindo-se as amostras em água desmineralizada e observando-se a luz espalhada em ângulo de 90 °C. O tamanho das partículas foi determinado empregando equipamento Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram medidas em suspensão, após a preparação.

3.3.2.3 Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras (1 mL) de nanopartículas brancas e nanopartículas contendo MZ anterior ao congelamento (-20 °C) foram previamente tratadas com glicose (concentração final 20%) conforme metodologia descrita por Saez et al., 2000. As

amostras congeladas foram liofilizadas em liofilizador mediznischer apparatebau 336 osterode/harz - ehvisa - volkswagenwerk por 48 h.

As nanopartículas liofilizadas foram fixadas em *stubs* com fita dupla-face de carbono e cobertas com uma camada de 10 nm de platina usando sistema de metalização Bal-Tec MED-020. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta-600 (FEI, Eindhoven, Netherlands) utilizando voltagem de 5 kV.

3.3.2.4 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria derivada de 1ª ordem em UV para quantificação do MZ em nanopartículas PCL

A quantificação do MZ associado às nanopartículas foi atingida utilizando-se o método espectrofotométrico de derivadas no ultravioleta (UV) (PASCHOAL et al., 2003). Para o desenvolvimento deste método os parâmetros especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão foram obtidos.

Segue abaixo as soluções preparadas para desenvolvimento do método.

3.3.2.4.1 Solução Padrão MZ em água Desmineralizada ou Tampão Fosfato PBS

Foram pesados cerca de 1 mg de MZ, substância química de referência, e transferidos quantitativamente para dois balões volumétricos de 10 mL. Adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), completou-se o volume com água desmineralizada ou tampão fosfato PBS (pH 7,4) e homogeneizou-se. Desta maneira obtiveram-se duas soluções padrão de MZ a 100 µg/ml: uma em água desmineralizada e outra em tampão fosfato PBS (pH 7,4). A partir destas, outras soluções de MZ foram preparadas por meio de diluições.

3.3.2.4.2 Solução de MZ amostral 10 µg/mL

Foram transferidos volumetricamente 2,5 mL das soluções padrão de MZ acima citadas para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com 1% DMSO/água desmineralizada: Acetonitrila (ACN) (1:1) ou 1% DMSO/PBS:ACN (1:1) e, obtendo-se duas solução de concentração final de 10 µg/mL de MZ: uma em meio água desmineralizada e outra em tampão fosfato PBS (pH 7,4).

3.3.2.4.3 Solução de Nanopartículas Brancas (NB) de PCL

Pipetou-se volumetricamente 1,25 mL da suspensão de NB, ou seja, sem adição do MZ, e transferiu-se para 2 balões volumétricos de 25 mL. Completou-se o volume do primeiro com 1% DMSO/água desmineralizada:ACN (1:1) e do segundo com 1% DMSO/PBS:ACN (1:1) . Retirou-se 5 mL de cada balão e centrifugou-se a 14.000 rpm, por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a leitura espectrofotométrica.

3.3.2.4.4 Solução Mistura Física: MZ + NB

Pipetou-se volumetricamente 2,5 mL das soluções padrão de MZ para balões volumétricos de 25 mL. Pipetou-se volumetricamente 1,25 mL da suspensão de NB de PCL e transferiu-se para os referidos balões. Completou-se o volume de 25 mL dos balões com solvente 1% DMSO/água desmineralizada:ACN (1:1) ou 1% DMSO/PBS:ACN (1:1) obtendo-se duas soluções contendo: MZ 10 µg/mL (Água desmineralizada ou PBS) + NB. Retirou-se 5 mL de cada solução e centrifugou-se a 14.000 rpm, por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

3.3.2.4.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação das Nanopartículas de PCL contendo MZ

A concentração total do MZ no sistema foi determinada pela dissolução das nanopartículas em ACN. A concentração de MZ livre, ou seja, não associado às

nanopartículas, foi determinada no ultrafiltrado obtido a partir de dispositivo ultrafiltração/centrifugação (Microcon® - 10.000 Mw, Millipore, USA). A quantidade de MZ associada às nanopartículas foi determinada pelo parâmetro eficiência de encapsulação (EE), calculado da seguinte maneira (SINGH; MUTHU, 2007):

Equação 1

$$EE = \frac{\text{concentração de (MZ total - MZ livre)}}{\text{concentração teórica de MZ}} \times 100\%$$

As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Obtenção das Nanopartículas

Diferentes métodos podem ser utilizados para o preparo de sistemas de liberação de fármacos submicrométricos. De maneira geral, estes métodos podem ser classificados em duas categorias, polimerização *in situ* ou precipitação de polímero pré-formado, ambos produzindo suspensões coloidais aquosas (SCHAFFAZICK; GUTERRES; POHLMANN, 2003). Na polimerização *in situ* a formação de monômeros e oligômeros residuais permitem reações cruzadas com o fármaco e impedem o controle da massa molecular do polímero obtido e da liberação do fármaco.

No método de nanoprecipitação ou deposição de polímero interfacial (FESSI et al., 1989) a adição de uma solução solvente-óleo na fase aquosa resulta na emulsificação espontânea em nano-gotículas da fase oleosa, devido a algum tipo de instabilidade interfacial, conhecida como efeito Marangoni, originada da rápida difusão do solvente através da interface diminuindo a tensão interfacial (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008). O polímero que é insolúvel tanto em água quanto no núcleo oleoso é dissolvido na interface destes dois componentes imiscíveis, onde se deposita formando o invólucro das nanocápsulas. O exato mecanismo de formação

das nanocápsulas ainda não é compreendido por completo, contudo, pode ser explicado em termos de turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas instáveis, envolvendo fluxo, difusão e processos de superfície (FESSI et al., 1989).

Muitos são os fatores que podem afetar a estabilidade e as características dos sistemas coloidais obtidos. De maneira geral, a suspensão não tende a separação porque a lenta sedimentação das partículas submicrométricas é contrabalançada pelas tendências de difusão e convecção, entretanto, a agregação é possível (GUTERRES et al., 1995). Neste caso, a agregação transforma as nanopartículas em complexos micrométricos/macrométricos e primariamente todos os efeitos dependentes do tamanho reduzido são, então, perdidos.

Dentre os poliésteres aprovados pelo FDA, a poli(ϵ -caprolactona), PCL, (Figura 15) possui propriedades únicas tais como biocompatibilidade melhorada, maior hidrofobicidade e biodegradação em produtos finais neutros que não alteram o balanço do pH no meio de degradação.

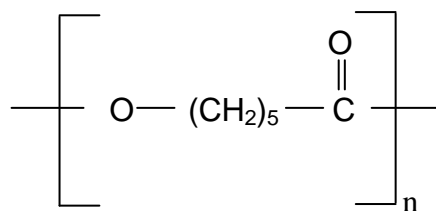


Figura 15. Estrutura molecular do polímero poli(ϵ -caprolactona).
Fonte: Domingues et al., 2008.

PCL é um polímero semi-cristalino que apresenta temperatura de transição vítrea de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ponto de fusão que varia entre $59\text{-}64\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo da natureza cristalina do PCL. O peso molecular médio de amostras de PCL varia de 10.000-42.500 e é classificado de acordo o peso molecular (M_n). A PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano em temperatura ambiente. Apresenta baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etil, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico.

A degradação da PCL em comparação ao ácido poliglicólico e outros polímeros é lenta e adequada para liberação *long-term* que se estendem por

períodos maiores que um ano. Sua degradação é autocatalizada, onde grupos terminais de ácidos carboxílicos liberados catalisam a hidrólise/clivagem de grupos ésteres (SINHA et al., 2004).

Nenhuma perda de peso é observada na fase inicial do processo de biodegradação. A segunda fase do processo de biodegradação tem sido atribuída a excisão de cadeias de baixo peso molecular produzindo pequenos fragmentos que se difundem para fora da estrutura polimérica e rompem a massa polimérica produzindo pequenas partículas com probabilidade de fagocitose aumentada. A diminuição da taxa de cadeias clivadas esta associado com um aumento da cristalinidade uma vez que a clivagem ocorre na região amorfa do polímero (SINHA et al., 2004).

Dadas as características físico-químicas deste poliéster biodegradável, como alta permeabilidade para uma ampla variedade de agentes terapêuticos e estabilidade física devido a sua estrutura altamente cristalina, a PCL tem sido usada extensivamente no preparo de sistemas de liberação de fármacos nanoparticulado *long-term* (SINHA et al., 2004).

Estudos de Espalhamento de Raio-X a baixo angulo (SAXS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) permitiram o entendimento da organização molecular das nanocápsulas. Independentemente da concentração de PCL, 0-10 µg/mL, o surfactante lipofílico, monoesterado de sorbitan (Span 60®) encontra-se dissolvido no óleo Myglol® 810 e o polímero apresenta regiões de cristalinidade (CRUZ et al., 2006).

Formulações de nanopartículas poliméricas de PCL apresentaram vantagens no que diz respeito à estabilidade ao longo do tempo sobre outros polímeros como ácido metacrílico e metacrilato de metila (Eudragit S90®) (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Em 2007, Singh e Muthu preparam e caracterizaram nanopartículas contendo risperidona, um antipsicótico atípico usado no tratamento de desordens psicóticas. Neste sistema, a partir das várias formulações preparadas, observou-se que o aumento na concentração de PCL nas nanosuspensões aumenta o tamanho das nanopartículas, aumenta a encapsulação do fármaco e resultada em uma liberação mais lenta desta, ao passo que as menores nanopartículas obtidas (pela menor concentração de PCL) obtiveram maiores taxas de liberação.

Fisicamente, nanopartículas são estabilizadas por repulsão eletrostática ou estérica dependendo da natureza do surfactante, além disso, estes são necessários para obtenção de gotas de óleo menores e mais estáveis. Desta maneira o surfactante pode afetar propriedades físico-químicas das nanopartículas tais como tamanho e encapsulamento (MOSQUEIRA et al., 2000⁵ apud SCHAFFAZICK et al., 2006). Contudo, Schaffazick et al. (2006) não encontraram diferenças significativas no tamanho das nanocápsulas e na eficiência de encapsulação em nanopartículas de PCL contendo melatonina a partir de diferentes surfactantes, Span 60® e Span 80®.

O último fator, e não menos importante, capaz de alterar as características físico-químicas da suspensão obtida é o óleo empregado. Schaffazick et al. (2002) mostraram que o benzoato de benzila dissolve, após 4 horas, completamente os filmes de PCL, assim os sistemas coloidais obtidos utilizando-se estes componentes não seriam formados por nanocápsulas e sim, por micelas poliméricas. Por outro lado, o óleo Mygliol 810® não foi capaz de alterar a massa dos filmes de PCL e, portanto, nesta formulação há formação de nanocápsulas.

Estudos a cerca de nanoemulsões revelaram que o tamanho da gota oleosa diminui quando a viscosidade do óleo utilizado aumenta, entretanto a alta viscosidade do óleo não é uma condição suficiente para se obter emulsões com gotas de menor tamanho (BOUCHEMAL et al., 2004). Guterres et al. (1995) encontraram que o tamanho das partículas preparadas a partir de Miglyol 810® é menor do que aquelas preparadas com benzoato de benzila.

Em um estudo de otimização do preparo de nanopartículas de PLA contendo diclofenaco foi determinado que a menor concentração de surfactante capaz de assegurar estabilidade foi de 0,75% de surfactante lipofílico combinado com a mesma proporção de surfactante hidrofílico, e o conteúdo ótimo de Miglyol 819® foi de 3,33% da formulação (GUTERRES et al., 1995).

Em última instância, o solvente usado na formulação deve ser inerte e possuir quase total miscibilidade em água, além de aplicável a todos as técnicas de preparo. O álcool, por exemplo, cria reações secundárias entre os componentes do álcool

⁵ MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

(-OH) e diferentes monômeros (ácido clorídrico –CO-Cl ou diisocianatos (-N=C=O) usados para síntese de nanocápsulas. Neste ponto a acetona é o solvente mais apropriado (BOUCHEMAL et al., 2004).

O grande número de polímeros, surfactantes e óleos disponíveis para o preparo de sistemas coloidais aquosos nanoparticulados possibilitam o preparo de sistemas com características físico-químicas bastantes distintas. Por este motivo, sua formulação deve ser racionalizada para os devidos fins de aplicação da suspensão, como vias de administração, tempo de liberação, tamanho, entre outros.

A formulação aplicada para o preparo das nanopartículas de MZ neste projeto visou à obtenção de um sistema de liberação de fármaco de longa duração, a partir de nanocápsulas, onde o MZ estivesse solubilizado no núcleo oleoso ou adsorvido ao polímero na superfície da partícula. A composição quali-quantitativa teve como propósito uma alta eficiência de encapsulação do MZ e estabilidade da suspensão. A suspensão obtida apresentou aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão (efeito Tyndall) bem como suspensões anteriormente reportadas na literatura para sistemas nanocapsulares (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2002, 2006). Contudo, foi observada a presença de pequenos grupos nas paredes do frasco de acondicionamento. As suspensões obtidas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

3.4.2 Determinação do diâmetro e polidispersão das nanopartículas de PCL contendo MZ

O tamanho da partícula é um importante parâmetro com efeito direto na estabilidade, absorção celular, liberação do fármaco e biodistribuição.

O diâmetro médio e a polidispersão das nanopartículas carregadas com MZ estão apresentados na Tabela 3. As curvas de distribuição de tamanho da partícula foram unimodais.

Tabela 3 – Tamanho da partícula

Suspensão Nanoparticulada	Diâmetro Médio (nm) média±d.p*	Polidispersão média±d.p*
----------------------------------	---	-------------------------------------

Nanopartículas carregadas com MZ	280,0±1,34	0,130±0,003
----------------------------------	------------	-------------

*n =3

De maneira geral, as suspensões de nanopartículas obtidas por diferentes métodos apresentam distribuição unimodal e baixo índice de polidispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A suspensão coloidal carregada com MZ apresentou-se monodispersa com diâmetro médio das nanopartículas de 280 nm com uma polidispersão de 0,13 nm. Estes resultados obtidos a partir de análise por espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons) apresentam o típico tamanho médio para nanopartículas obtidas pelo método de preparo por polimerização de polímero pré-formado PCL (SINGH; MUTHU, 2007; MUTHU; SINGH, 2008; SHAFFAZICK et al., 2002, 2006; RAFFIN et al., 2003).

De acordo com a literatura recente, três são os fatores considerados essenciais na determinação do tamanho da nanopartícula: a concentração do polímero na fase orgânica (SINGH; MUTHU, 2007), a polaridade dos solventes e a relação fase interna/externa (ZILI; SFAR; FESSI, 2005).

Cruz et al. (2006) obtiveram nanopartículas de PCL carregadas com indometacina a partir da mesma formulação apresentada no item 3.3.2.1. Para a concentração de 10 mg/mL de polímero PCL obtiveram nanopartículas de tamanho médio 288 ± 13 nm e uma polidispersão menor do 0,12. Estes resultados corroboram os aqui obtidos para nanopartículas contendo MZ. Comparativamente, os fármacos encapsulados, indometacina e MZ, não promoveram significativa influência no tamanho médio das nanopartículas preparadas por esta formulação, talvez o caráter hidrofóbico de ambos os fármacos explique este comportamento.

Na obtenção de uma suspensão coloidal nanoparticulada contendo risperidona, um anti-psicótico altamente hidrofóbico Singh e Muthu (2007) obtiveram uma suspensões de nanopartículas de PCL (12 mg/mL) de tamanho médio de $96,7 \pm 12,4$ nm. A grande discrepância do tamanho médio das nanopartículas deste estudo deve-se ao surfactante hidrofílico (Pluronic® F68), o qual apresenta maior equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL=29, a 25 °C) comparado ao Tween® 80 (EHL=15 a 25 °C) usado na obtenção de nanopartículas de MZ. De acordo com Bouchemal et al. (2004) a média de tamanho da partícula diminui quando o valor do EHL do sistema coloidal aumenta.

Para uma maior caracterização do tamanho médio, forma e superfície das nanopartículas carregadas com MZ, análises de microscopia eletrônica de varredura foi desenvolvidas.

3.4.3 Análise morfológica

O estado sólido da suspensão coloidal de nanopartículas foi obtido pelo procedimento de liofilização.

3.4.4 Liofilização

A presença de crioprotetores durante a liofilização é indispensável (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Nanocápsulas liofilizadas na ausência de um crioprotetor e carregadas de indometacina apresentaram uma perda de 50% do conteúdo de indometacina após reidratação (GÜRSOY et al., 1989). Esses resultados foram atribuídos a mudanças na estrutura da parede das cápsulas ou ao estresse promovido pela cristalização da água seguido do rompimento das nanocápsulas e liberação de seu conteúdo (SCHAFFAZICK et al., 2003; GÜRSOY et al., 1989). A principal desvantagem desta técnica é a dificuldade tecnológica para seleção de crioprotetores e a possibilidade de ruptura dessas nanovesículas em baixas temperaturas (MULLER et al., 2000)

A proteção das suspensões de nanopartículas contra os vários estresses induzidos durante o processo de liofilização tem sido feita pela adição de excipientes tais como açúcares (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; SAEZ et al., 2000).

A aglomeração da suspensão de nanopartículas é evitada pela formação de uma massa sólida amorfa onde as partículas coloidais estão presas em um ambiente altamente viscoso e isoladas uma das outras (Figura 16) (CHEOW et al., 2001). Esta massa amorfa, decorrente da adição de agentes crioprotetores induz o empacotamento não regular das moléculas em uma massa vítrea intersticial, isto leva a diminuição da densidade quando comparado a massa mais ordenada formada apenas pelos cristais de gelo. Esta massa congelada crioprotetiva é mais fluida do que sólida e fornece, portanto, melhor proteção mecânica as

nanopartículas. Consequentemente a agregação ou qualquer alteração devido a pressão desenvolvida pelo crescimento dos cristais de gelo é evitada (CHEOW et al., 2001; SAEZ et al., 2000).

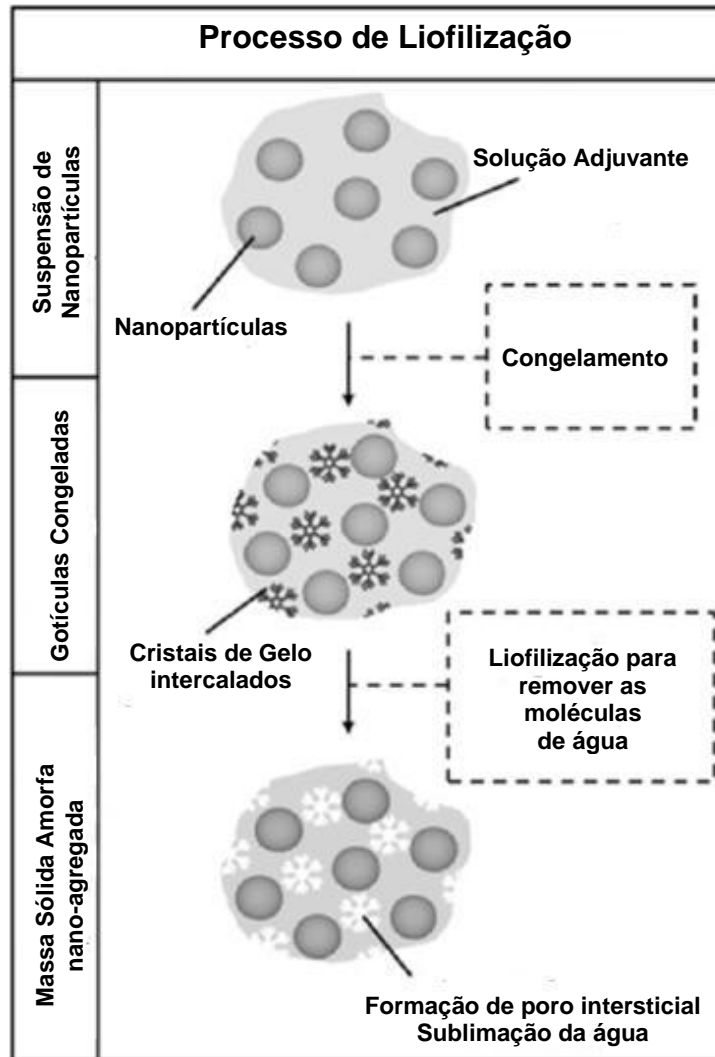


Figura 16. Mecanismos Físicos do processo de Liofilização.

Fonte: Cheow et al. (2001).

O rápido congelamento permite que as moléculas de água congelem em cristais de gelo que são intercalados entre os materiais suspensos ou dissolvidos consistindo de nanopartículas e adjuvantes. O congelamento é uma etapa crítica no processo de liofilização. Amostras congeladas em taxa lenta (refrigeração) ou rápida (nitrogênio líquido) levam ao crescimento de um número pequeno de grandes cristais de gelo ou a um número grande de pequenos cristais de gelo, respectivamente (SAEZ et al., 2000).

Os cristais de gelo são removidos via sublimação. A sublimação é realizada abaixo do ponto triplo da água (6 mbar, 0,01 °C) para evitar a fusão dos cristais de gelo para água líquida o que pode destruir a estrutura sólida dos nano-agregados (CHEOW et al., 2001).

Deste modo, no processo de liofilização de suspensões de nanopartículas açúcares precisam ser incluídos na formulação para funcionarem como agentes crioprotetores e facilitarem a re-dispersão dos nano-agregados de modo que as nanopartículas possam desenvolver suas funções terapêuticas primárias. A inclusão de açúcares como adjuvantes, evita que as nanopartículas formem coalescências irreversíveis sob o congelamento causado pelo estresse mecânico exercido pela formação de cristais de gelo. A presença desses adjuvantes leva a formação de “pontes de adjuvantes” que interconectam as nanopartículas evitando o contato direto inter-nanoagregados sob congelamento. Como resultado, a redispersibilidade aquosa dos nanoagregados é governada pela taxa de dissolução das “pontes de adjuvantes” ao invés das forças atrativas intrínsecas (exemplo van der Waals) (CHEOW et al., 2001).

No que diz respeito aos adjuvantes, existe uma considerável variação entre os sacarídeos e suas habilidades para estabilizar sistemas coloidais e em alguns casos não está completamente claro como eles protegem contra o estresse de cristalização da água durante o passo de liofilização (SAEZ et al., 2000).

A adição de sacarose, trealose ou glicose em concentrações menores do que 5% na suspensão de nanopartículas mantêm as propriedades dos sistemas independentemente do procedimento de resfriamento (lento ou rápido) ou do polímero utilizado. Contudo, tratando-se de nanopartículas de PCL, produtos aceitáveis após a reidratação, com nenhuma agregação macromolecular, apenas são alcançados na presença de glicose a 20%, como crioprotetor (SAEZ et al., 2000).

Ainda, segundo Quintanar-Guerrero et al. (1998) nenhum crioprotetor usado sozinho tem efeito suficiente para preservar a integridade de uma suspensão de nanopartículas e permitir re-dispersão com preservação do diâmetro médio das nanopartículas. Em particular, surfactante foi encontrado ser a chave para produção de nanopartículas com alta redispersibilidade e menor comportamento de agregação.

O processo de liofilização aplicado a suspensão de nanopartículas de PCL deste projeto foi conduzido a partir de um congelamento lento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e adição de glicose a 20% como agente crioprotetor. Uma vez que um surfactante hidrofílico está presente na formulação destas nanopartículas e seu um conteúdo residual é possível na suspensão final, este não foi adicionado para o processo de liofilização. Tem sido sugerido que o surfactante forma uma camada hidrofílica na superfície da nanopartícula que executa a principal função da re-dispersão após a liofilização (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Em nanopartículas de PLA foi verificado que conteúdos residuais de surfactante PVA acima de 9% (p/p) foram encontrados dependendo da concentração inicial do surfactante PVA no procedimento de preparo (ALLEMANN; DOELKER; GURNYR, 1993).

O procedimento de liofilização produziu uma massa amorfa com aspecto de bolos porosos, frágeis. Uma aparência tipicamente descrita na literatura. A sublimação intersticial produziu estruturas altamente porosas atribuídas a presença de vazios anteriormente ocupados pelos cristais de gelo. Após a ressuspensão em água do pó liofilizado o efeito Tyndall e ausência de grumos foram observados.

O pó liofilizado obtido foi conduzido para análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para caracterização morfológica.

3.4.5 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A partir da MEV (Figura 17) foi possível observar uma massa superficial de adjuvante (glicose) coberta por nanoestruturas esféricas de superfície lisa de diâmetro compatível às determinações da análise por espalhamento de luz dinâmico do item 3.3.2.2.

Micrografias muito semelhantes foram obtidas a partir de pós (nebulização/*spray-drying*) de suspensões coloidais de PCL contendo indometacina na presença do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) (RAFFIN et al., 2003; POHLMANN et al., 2002).

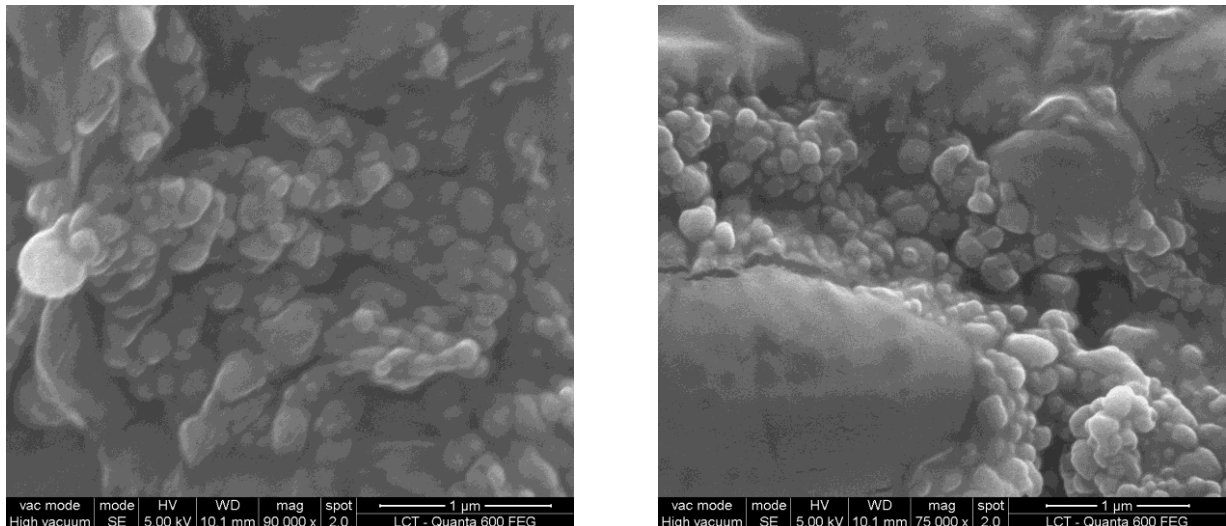


Figura 17. Fotomicrografias de varredura eletrônica das nanopartículas de PCL na ausência de MZ e na presença sacarose como crioprotetor.

3.4.6 Determinação da porcentagem de associação do MZ as nanopartículas de PCL

Dependendo do método de obtenção empregado no preparo das nanopartículas, o agente ativo pode estar dissolvido, encapsulado, adsorvido, ligado ou quimicamente acoplado nas matrizes poliméricas (MU; FENG, 2003). O tipo de interação físico-química dependerá, sobretudo, da polaridade do fármaco e do polímero empregados no sistema coloidal.

Neste contexto, as mais variadas interações fármaco/polímero e o tamanho reduzido das partículas fazem da determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas especialmente complexa, particularmente na separação da fração de fármaco associado a fração de fármaco não associado ao sistema (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o principal método de quantificação empregado nas análises de determinação de fármaco associado ao SNTF. Filtração através de seringa-filtro 0,45 µm seguida de quantificação por meio de espectrofotometria nas regiões do UV-Vis também são encontrados (SINGH; MUTHU, 2007; MUTHU; SINGH, 2008).

Na literatura recente, a espectrofotometria de derivadas (ED) vem recebendo cada vez mais atenção (KARPIŃSKA, 2002; DONATO et al., 2010) e constitui uma alternativa menos dispendiosa se comparada ao método de cromatografia líquida de alta eficiência (PASCHOAL et al., 2003). Prontamente, a determinação da quantidade de aciclovir associado à nanopartículas de quitosana (TAVARES et al., 2011) foi determinada por meio da técnica de ED.

Do mesmo modo, a determinação da porcentagem de associação do MZ as nanopartículas de PCL foi desenvolvida a partir do método ED.

3.4.6.1 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria derivada de 1ª ordem em UV para quantificação do MZ em nanopartículas de (PCL)

Por meio do Espectrofotômetro Hewlett Packard-HP®, modelo 8453 munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a computador, no intervalo de varredura de 300-500 nm, a partir de um delta lambda de 5 nm, espectros de derivada primeira foram obtidos. Aplicando-se o método de ponto de anulação, os parâmetros especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão foram avaliados.

3.4.6.1.1 Especificidade

O MZ é uma molécula parcialmente solúvel em água (BARRETT et al., 2000). O DMSO é o principal solvente utilizado na literatura no preparo de soluções do MZ. Contudo, o DMSO, apesar de amplamente usado como controle negativo em teste de mutagenicidade, como por exemplo, teste de Ames e Cometa, seu uso clínico é permitido em humanos apenas para a condição de cistite intersticial (FDA, 2011). Na ausência de um solvente mais adequado e aplicável a metodologia proposta neste trabalho, o uso do DMSO foi mantido, porém em condição mínima necessária a dissolução do MZ.

Dois meios foram preparados para avaliação do comportamento espectrofotométrico do MZ em solução, ambos contendo DMSO, a 1%, e água desmineralizada ou tampão PBS (pH 7,4).

Após o aparelho ter sido calibrado com 1% DMSO/água desmineralizada:ACN (1:1) ou 1% DMSO/PBS:Acetonitrila (1:1), realizou-se a varredura no intervalo de 300-500 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

A partir dos espectros obtidos (Figura 18) traçaram-se as derivadas de primeira ordem (Figura 19).

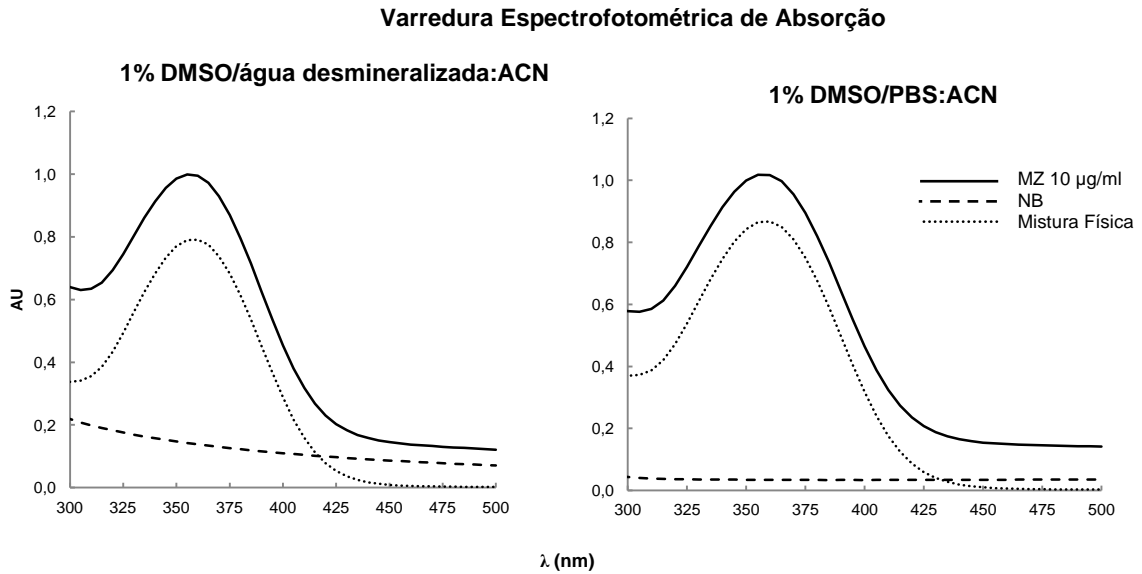


Figura 18. Espectro de Absorção do MZ no ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}}=358\text{nm}$) em meio 1% DMSO/água : ACN (1:1) e em meio 1% DMSO/PBS : ACN(1:1)

Espectro de Absorção de 1ª Derivada

1% DMSO/água desmineralizada:ACN

1% DMSO/PBS:ACN

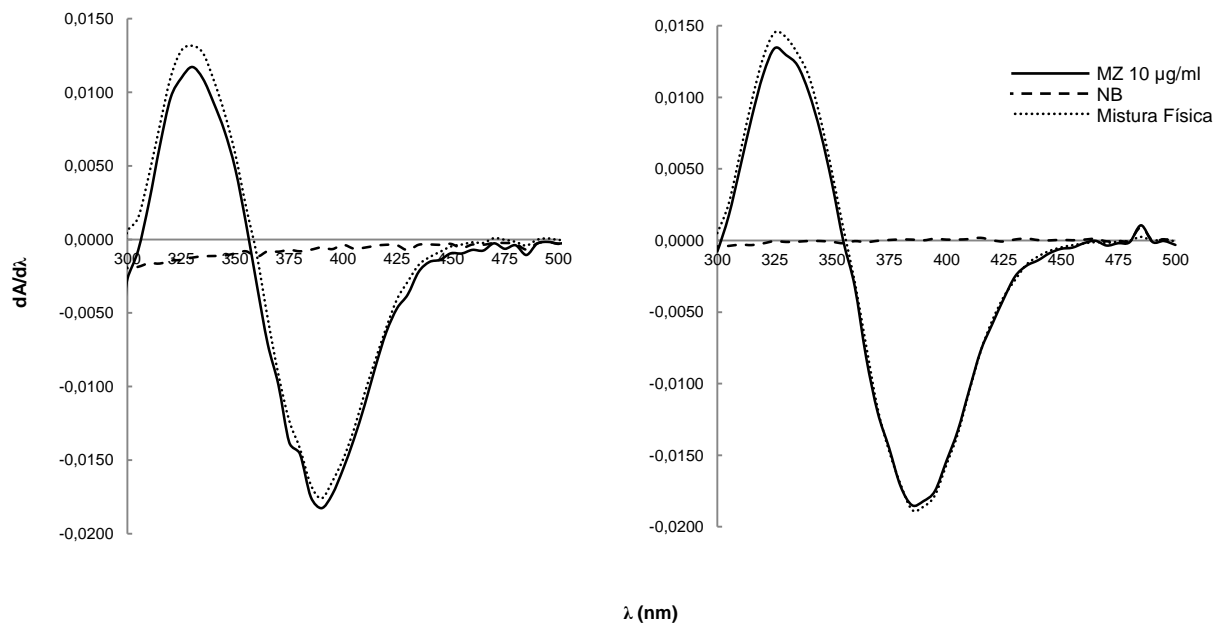


Figura 19. Espectro de Absorção do MZ no ultravioleta de 1ª derivada em meio 1% DMSO/água desmineralizada : ACN (1:1) e em meio 1% DMSO/PBS : ACN (1:1)

Em mesmas condições, as soluções preparadas em PBS obtiveram melhores resultados do que as soluções preparadas em água desmineralizada.

Os espectros de absorção de derivada primeira para as soluções preparadas em PBS apresentaram eficiência de recuperação de 100%, isto significa que 100% da concentração original de MZ pode ser detectada na presença de NB (placebo). A solução de NB apresentou espectro de primeira derivada de absorbância 0,0, o fato que sanciona a recuperação de 100%.

Desta maneira, o meio PBS foi selecionado para a continuidade do método analítico.

3.4.6.1.2 Método de Ponto de Anulação

Donato et al. (2010) definiram o método do ponto de anulação ou *zero crossing* como a medida do valor absoluto da amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda do ponto de anulação do outro componente.

No comprimento de onda de 345 nm houve a anulação da matriz polimérica de PCL, isto de modo independente da concentração de nanopartículas (5% ou 10%) no volume final da solução de mistura: MZ + NB (Figura 20). Portanto, no ponto de anulação (345 nm) infere-se o valor absoluto da amplitude de absorção de um componente da mistura, o MZ.

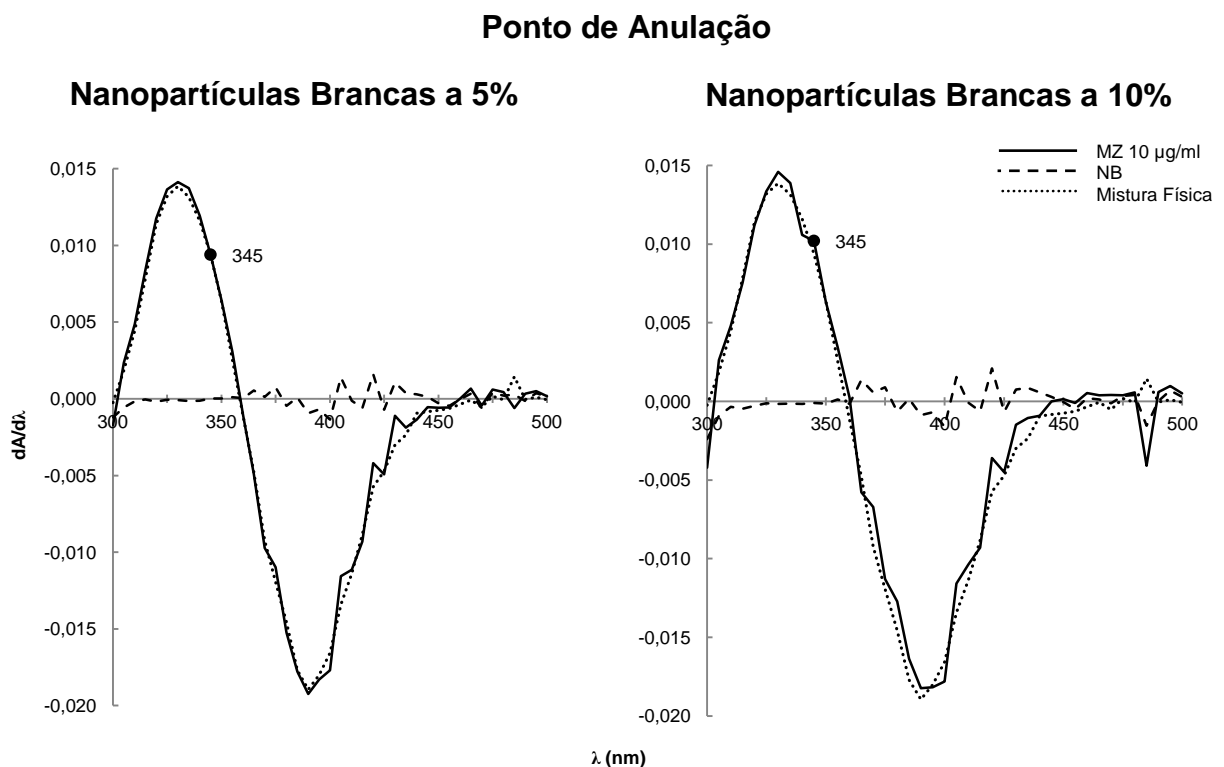


Figura 20. Ponto de Anulação em 345 nm. Mistura Física contendo MZ, 5% ou 10% de NB do volume final da solução.

3.4.6.1.3 Linearidade

Foram pesados cerca de 1 mg de MZ, substância química de referência, e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 100 μL de DMSO e completou-se o volume com tampão fosfato PBS (pH 7,4). Homogeneizou-se. Uma solução padrão de MZ a 100 $\mu\text{g/mL}$ em PBS foi obtida. A seguir foram preparadas diluições seriadas utilizando-se como solvente ACN:1%DMSO/PBS (7:3) para obter-se soluções cujas concentrações finais do MZ fossem: 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 7 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$. Após o aparelho ter sido calibrado com ACN:1%DMSO/PBS (7:3), realizou-se a varredura no intervalo de 300-500 nm. A partir do espectro de ordem zero (Figura 21A), traçaram-se as derivadas de 1ª ordem (Figura 21B). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método de mínimos quadrados (Figura 22). As medições foram feitas em triplicata.

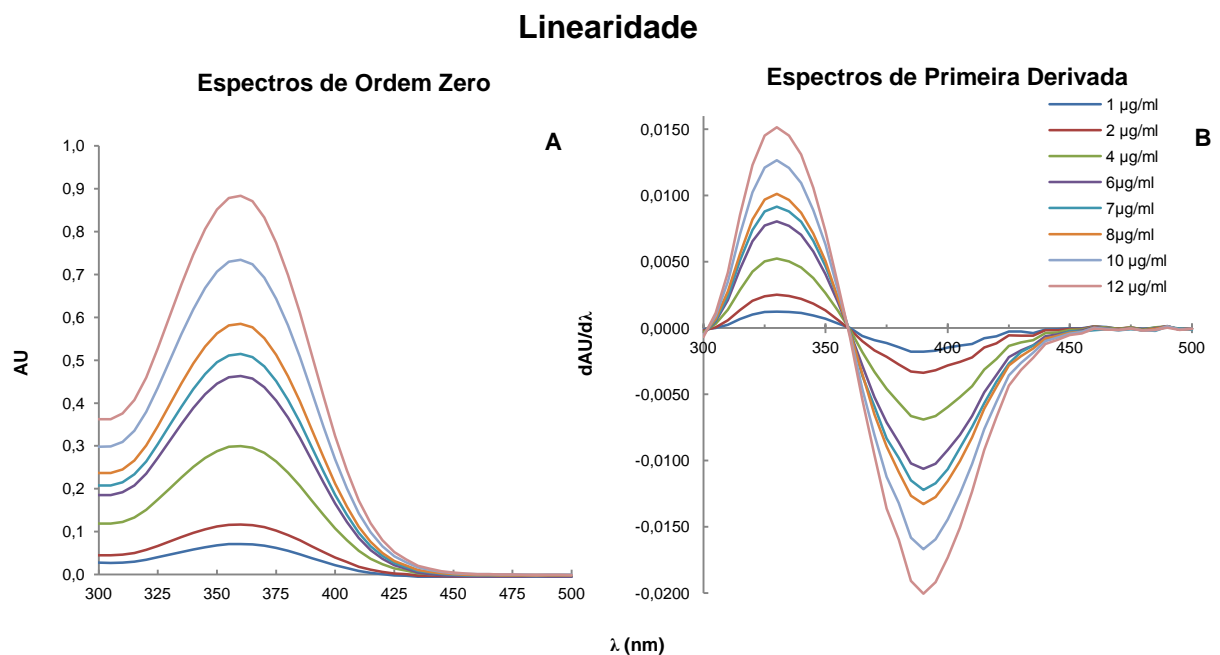


Figura 21. A. Espectros de ordem zero de soluções de MZ sobrepostos em diferentes concentrações em solvente ACN:1%DMSO/PBS (7:3). B. Espectros de derivada primeira de soluções de MZ sobrepostos em diferentes concentrações em solvente ACN:1%DMSO/PBS (7:3).

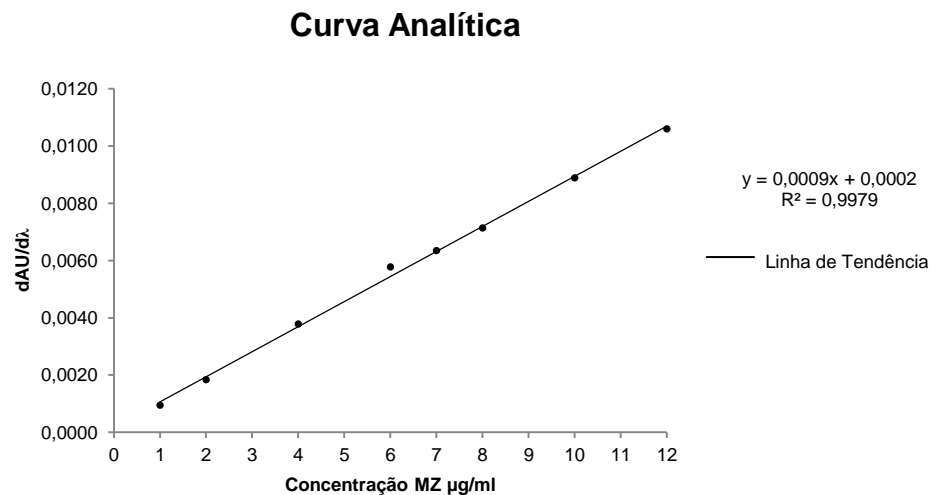


Figura 22. Curva Analítica obtida a partir da medida de derivada primeira de soluções de MZ com concentrações variando de 1 a 12 µg/mL. Amplitude = 345nm. ACN:1%DMSO/PBS (7:3) como branco.

3.4.6.1.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise capaz de ser detectado com grau de confiabilidade adequado, porém não quantificado com precisão e exatidão aceitáveis.

O limite de detecção foi calculado segundo a equação a seguir:

$$LD = \frac{d.p \times 3,3}{CA}$$

Equação 2

Onde: LD = limite de detecção; σ = desvio padrão médio, obtido por meio da curva analítica; CA = coeficiente angular da equação da reta.

O limite de quantificação é a menor concentração de substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$LQ = \frac{d.p \times 10}{CA}$$

Equação 3

Onde: LQ = limite de quantificação; σ = desvio padrão médio, obtido por meio da curva analítica; CA = coeficiente angular da equação da reta.

Aplicando as fórmulas indicadas, os limites de quantificação e de detecção foram calculados, com a obtenção dos seguintes valores:

Limite de Detecção = 0,66 $\mu\text{g/ml}$

Limite de Quantificação = 2,00 $\mu\text{g/ml}$

3.4.6.1.5 Precisão e Exatidão

Para determinação da precisão e exatidão intra-dia, três soluções de nanopartículas brancas foram contaminadas com 4 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$ de MZ. Posteriormente tais amostras foram tratadas com ACN:1%DMSO/PBS (7:3) na proporção de 1:6 e centrifugadas a 12.000 rpm por 30 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para a leitura no espectrofotômetro. Após o aparelho ter sido calibrado com ACN:1%DMSO/PBS (7:3), realizou-se a varredura no intervalo de 300-500 nm. A partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem e as leituras foram efetuadas em 345 nm. As leituras foram realizadas três vezes em um mesmo dia.

Para determinação da precisão e exatidão inter-dia, o mesmo procedimento foi realizado. No entanto as leituras foram feitas três vezes, por três dias consecutivos. Os resultados de precisão foram expressos através do coeficiente de variação (CV%), de acordo com a equação abaixo:

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100$$

Equação 4

Os resultados de exatidão foram expressos matematicamente a partir da seguinte equação:

$$E (\%) = \frac{\text{valor mensurado} \times 100}{\text{valor teórico}}$$

Equação 5

Tabela 4 - Resultados Precisão e Exatidão

Concentração Teórica (µg/ml)	Intra-dia			Inter-dia		
	Média ^a ±d.p.	CV (%)	E (%)	Média ^b ±d.p.	CV (%)	E (%)
4,0	3,89±0,00013	0,0035	97,25	3,96±0,00013	0,0033	99,24
6,0	6,07±0,00058	0,0082	101,17	6,12±0,0004	0,0065	102,13
8,0	8,09±0,00022	0,0027	101,15	8,09±0,00017	0,0021	101,23

^amédia referente a 3 determinações

^bmédia referente a 9 determinações

O método analítico aqui desenvolvido mostrou-se, específico, linear, preciso e exato para quantificação do MZ associado às nanopartículas de PCL apresentando-se, portanto, em conformidade a RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

3.4.6.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação das nanopartículas

Aplicando-se a equação 1 apresentada no item 3.3.2.4.5, a EE (%) encontrada para a formulação preparada nesta pesquisa foi de aproximadamente 24%.

Poovi et al. (2011) pontuaram que, normalmente a baixa EE deve-se a alta afinidade do fármaco e/ou do polímero aos solventes empregados na fase orgânica e/ou aquosa. A baixa afinidade do MZ aos solventes empregados (água e acetona) antepara o escape para qualquer um destes, inviabilizando, por conseguinte, esta hipótese.

Uma das possíveis explicações a respeito da baixa EE obtida para as nanopartículas de MZ encontra-se na relação quantidade de polímero para quantidade de MZ adicionado na formulação. Peng et al. (2007) citaram que a EE (%) aumentou devido a maior proporção de polímero em relação a quantidade de fármaco na formulação. Para o sistema nanoparticulado de MZ, uma maior proporção de MZ em relação a quantidade de polímero foi adicionada.

Não obstante, a hipótese que melhor explica a baixa EE das nanopartículas obtidas nesta pesquisa, assim como em Guterres et al. (1995), fundamenta-se no formação de cristais de MZ estabilizados pelo surfactante quando a concentração deste excede a solubilidade no núcleo oleoso das nanocápsulas. Uma vez que nenhum grupo macromolecular é visível e a distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas é baixa, estes cristais de baixo peso molecular, possivelmente, apresentam tamanho compatível ao das nanoestruturas.

A fim de fazer uso das propriedades superiores de vetorização de micelas poliméricas *in vivo*, é essencial a obtenção de sistemas altamente eficientes de carregamento (ISHIHARA et al., 2008). A baixa EE das nanopartículas de PCL contendo MZ obtidas tornam este sistema de transporte desvantajoso uma vez que 76% de MZ foi perdido no processo e uma grande quantidade de carreador poderia ser necessária para alcançar quantidades suficientes de fármaco no sítio alvo.

Sobretudo, fármacos que apresentam baixa biodistribuição, solubilidade em água e efeitos colaterais têm sido incorporados dentro de nanopartículas poliméricas usando a técnica de nanoprecipitação. Altas porcentagens de EE têm sido alcançadas para SNTF contendo indometacina 85-95% (CRUZ et al., 2006), diclofenaco 100% (POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2002, RAFFIN et al., 2003), penicilina G benzatina 85% (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000), camptotecina 97% (NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005), risperidona 85% (MUTHU; SINGH, 2008), replaglidina 97% (POOVI et al., 2011) entre outros. Por outro lado, outros compostos hidrofóbicos apresentaram baixa EE como ácido fólico 12,82% (RACHMAWATI et al., 2010), 5-Fluorouracil 25% (WANG et al., 2010), e praziquantel 10-30% (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

Variados estudos recentes neste campo de pesquisa nanotecnológico-farmacêutico comprovam que a incorporação de fármacos aos SNTF permite principalmente a prolonga dos efeitos ativos e a diminuição dos efeitos colaterais, além da substancial melhora na biodisponibilidade destes.

Muthu e Singh (2008) desenvolveram um sistema nanoparticulado de liberação prolongada de risperidona a partir de nanopartículas de PCL. Variando a concentração de polímero e diferentes surfactantes uma população de nanopartículas de 99-304 nm foi alcançada com 78-85% de eficiência de encapsulação. Os estudos *in vivo* demonstraram significativo efeito anti-psicótico prolongado e menores efeitos colaterais da risperidona.

Peng et al. (2008) obtiveram nanopartículas de PLGA carregadas com voriconazole, um antifúngico limitado por efeitos colaterais como nefrotoxicidade e hemólise. O carregamento polimérico reduziu a flutuação da concentração do fármaco no sangue e aumentou sua biodisponibilidade. A eficiência antifúngica entre as nanopartículas carregadas e o voriconazole livre mostrou que as primeiras obtiveram maior potencial fungicida *in vitro* do que o fármaco livre.

Zili et al. (2005) obtiveram aumento da taxa de liberação da griseofulvina, um antifúngico insolúvel em água, a partir de nanopartículas de PCL, fato que possivelmente refletir-se-á na eficiência para o tratamento de dermatomicoses.

O perfil farmacocinético plasmático da halofontrina foi modificado por meio de nanopartículas de PLA e PLA-PEG mantendo concentrações do fármaco por mais de 70 horas. A nanoencapsulação reduziu a cardiotoxicidade provocada pela halofontrina e foi adequada para o tratamento do quadro severo de infecção em ratos por *Plasmodium berghei*, agente causador da Malária (MOSQUEIRA et al., 2004).

É claro o enorme potencial de investigações e possibilidades neste campo de pesquisa. O grande número de polímeros, surfactantes, óleos, métodos de preparação, e formulações disponíveis fazem cada SNTF único. A concentração de polímero, o EHL do surfactante, a viscosidade do óleo têm efeito no tamanho das partículas obtidas. A proporção de fármaco para quantidade de polímero, a polaridade do polímero e do fármaco e os solventes empregados têm efeito direto na eficiência de encapsulação do sistema. A velocidade de versão da fase orgânica na fase aquosa e a agitação do sistema também influenciam nas características físico-químicas das nanopartículas obtidas.

3.5 CONCLUSÕES

Este estudo confirmou que o método de nanoprecipitação é adequado para obtenção de nanopartículas de PCL contendo MZ. Nanopartículas esféricas de superfície lisa, tamanho médio de $280\pm 1,34$ nm, polidispersão de $0,13\pm 0,003$ nm e eficiência de encapsulação de 24% de MZ foram obtidas. A baixa porcentagem de associação do MZ às nanopartículas de PCL alcançada sob estas condições sugerem que outras abordagens de formulação são necessárias a fim de aumentar o carregamento do agente.

4 DISCUSSÃO GERAL

O MZ foi inicialmente sintetizado por Berkelhammer e Asato, dentro de um programa de pesquisa sobre 5-nitroimidazóis desenvolvido no final dos anos 60 pela Indústria American Cyanamid (BERKELHAMMER; ASATO, 1968). Esta molécula demonstrou um largo espectro de ação biológica frente a diversos microorganismos gram+ e gram-, bem como fungos e parasitas (BURDEN; RACETTE, 1968). No entanto, esta pesquisa não foi levada a termo devido às potencialidades tóxicas do grupamento nitro presente nesta molécula fato que restringia o registro de novas moléculas pela FDA na época.

Nos anos 80, pesquisadores brasileiros da Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e do Centro René Rachou de Belo Horizonte, devido à grande incidência da Doença de Chagas no Brasil, realizaram um grande *screening* a procura de novos candidatos a fármaco para a Doença de Chagas. Dentre as substâncias estudadas, o MZ foi aquela que demonstrou maior interesse, pois em testes *in vivo* com ratos, mostrou um efeito curativo significativo, em uma única dose (GILBERT⁶, 1989 apud ALBUQUERQUE, 1995). A partir de então houve uma retomada dos estudos a cerca desta molécula. Os estudos do MZ realizados até o momento concentram-se, principalmente, em sua atividade biológica (ENANGA et al., 1999, 2000; BOUTEILLE et al., 1995, 1999), genotoxicidade (POLI et al., 2002; NESSLAY et al., 2004), mecanismo de ação (VIODÉ et al., 1999) e síntese de derivados a partir da estrutura química do MZ (CARVALHO et al., 2004, 2008; CHAUVIÈRE et al., 2003).

A ausência de uma quimioterapia satisfatória para a Doença de Chagas justifica a insistência no desenvolvimento desta molécula como um candidato a fármaco. Das duas drogas clinicamente prescritas para esta patologia apenas o BZ é prescrito no Brasil, devido à resistência adquirida pela cepa brasileira de *T. cruzi* ao NF (BRENNER, 2000).

A genotoxicidade da molécula MZ apresenta-se como o maior entrave no desenvolvimento como um candidato a fármaco. Em segundo plano, mas não menos problemático, a baixa solubilidade em água e a ausência de um solvente adequado para a solubilização do MZ fazem um paralelo de entrave ao desenvolvimento.

⁶ GUILBERT, B. (comunicação pessoal) em 1989

Adicionalmente, esta pesquisa foi capaz de detectar o potencial genotóxico do MZ a partir do parâmetro *crossing-over* mitótico em *A. nidulans*. O *crossing-over* mitótico é mecanismo de reparo preferencialmente utilizado na correção de certos tipos de danos infringidos ao material genético que apresenta grande potencialidade para consequências negativas à célula e está intimamente ligado à iniciação e à progressão de cânceres. Portanto foi utilizado com um indicador indireto da potencialidade carcinogênica da molécula MZ. Em decorrência da genotoxicidade pronunciada do DMSO, agente não mutagênico, mas potencialmente genotóxico, apenas a dose de 8 µg/mL de MZ demonstrou o claro efeito genotóxico deste.

Atualmente, novas tecnologias capazes de modificar a farmacocinética e influenciar a toxicidade de moléculas efetivas como o MZ vêm sendo desenvolvidas. A nanotecnologia ampliou as possibilidades estratégicas de formulação destas moléculas a partir dos sistemas nanotransportadores poliméricos.

Drogas encapsuladas ou aderidas a superfície de nanopartículas poliméricas exibem comportamento de transporte aumentado e têm mais vantagens comparado com as formas de dosagem convencionais. Muitas drogas confirmadamente eficazes que apresentam sua terapêutica limitada por fatores como baixa solubilidade e estabilidade, rápida remoção, meia-vida de circulação curta, baixa eficácia e efeitos colaterais cumulativos, têm agora uma nova oportunidade de desenvolvimento devido a nanotecnologia.

Visando uma modificação da formulação convencional e superação dos principais problemas, solubilidade e genotoxicidade, da molécula do MZ um SNTF foi desenvolvido. Nesta pesquisa obteve-se com sucesso nanopartículas esféricas de PCL carregadas com MZ. O desenvolvimento de método adequado de obtenção de nanopartículas poliméricas carregadas com MZ permitiu um fôlego renovado para maiores estudos a cerca desta molécula.

5 CONCLUSÃO GERAL

- O DMSO foi genotóxico na dose de 0,1% v/v
- Dose de 2 e 4 µg/mL de MZ exibiu genotoxicidade provavelmente decorrente da genotoxicidade do solvente DMSO.
- O MZ foi evidentemente genotóxico na dose de 8 µg/mL
- O método de nanoprecipitação ou deposição de polímero interfacial foi adequado para obtenção de nanopartículas de PCL contendo MZ
- Nanopartículas esféricas de superfície lisa, tamanho médio de $280 \pm 1,34$ nm, polidispersão de $0,13 \pm 0,003$ nm e eficiência de encapsulação de 24% de MZ foram obtidas.

Perspectivas Futuras

O carregamento de MZ incorporado a nanopartículas de PCL amplia as possibilidades de aplicação deste candidato a fármaco, cuja dificuldade de formulação e efeitos colaterais como cito/genotoxicidade impedem seu desenvolvimento. Outras abordagens de formulação, estudos de estabilidade do sistema obtido e perfil de liberação visando uma administração oral e/ou parental, assim como maior eficiência de carregamento, serão novas metas de nosso grupo de pesquisa.

Ademais, vários são os derivados de MZ sintetizados no Laboratório de Síntese e Otimização de Fármacos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP, os quais também apresentam interesse farmacológico.

O estudo das possíveis modificações dos efeitos tóxicos do MZ a partir do carregamento nanoparticulado é de sumo interesse de nosso grupo de pesquisa.

Finalmente, este projeto de pesquisa trouxe um enorme avanço científico para o MZ e seus derivados. A partir deste, novos sistemas nanoparticulados poderão ser desenvolvidos para maiores caracterizações e testes biológicos.

REFERÊNCIAS⁷

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 62, n. 1, p. 35–54, 1998.

ALBUQUERQUE, C. N. **Syntheses et études physico-chimiques d'analogues du Megazol, antiparasitaire du type nitroimidazole. Étude de leur mode d'action imidazole; étude de leur mode.** 1995. 208 f. Dissertação (Doutorado em Química Biológica) - Université de Toulouse III (Paul Sabatier), U.T. III, França, 1995.

ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNYR, R. Drug loaded poly(lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 39, p. 13-18, 1993.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ANDERSEN, S. L.; SEKELSKY, J. Meiotic versus mitotic recombination: Two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. **Bioessays**, 2010. doi 10.1002/bies.201000087

ARANTES, F. S. **Comparação das duas principais rotas de obtenção do megazol.** 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AYE, M.; A, DI GIORGIO, C.; DE MO, M.; BOTTA, A.; PERRIN, J.; COURBIERE, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 1905–1912, 2010.

BACHMANN, H. J.; SHIRK, R. J.; LAYTON, H. W.; KEMP, G. A. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agents. IV. Activity in mice and chicks. **Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda)**, v. 8, p. 524-527, 1968.

BARONIAN, K. H. R. The use of yeasts and moulds as sensing elements in biosensors. **Biosens. Bioelectron.**, v.19, n. 9, p. 953–962, 2004.

BARRETT, M. P.; FAIRLAMB, A. H.; ROUSSEAU, B.; CHAUVIERE, G.; PERIE, J. Uptake of the nitroimidazole drug megazol by African trypanosomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, n. 6, p. 615–620, 2000.

BECKER, T. C. A.; CHIUCHETTA, S. J. R.; BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M. A. A. Increase in mitotic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans* in response to ethidium bromide. **Genet. Mol. Biol.**, v. 26, n. 3, p. 381-385, 2003.

⁷ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELJANSKI, V.; MARZILLI, L. G.; DOETSCH, P. W. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. **Mol. Pharmacol.**, v. 65, n. 6, p. 1496-1506, 2004.

BENNETT, J. W. Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergillus*. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. **Biology of Industrial Microorganisms**. Stoneham, MA: Butterworths Publishers, 1985. p. 359-406.

BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 10, p. 2505-2515, 2003.

BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole. A new antimicrobial agent. **Science**, v. 162, n. 3858, p. 1146, 1968.

BHAVSAR, M. D.; SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Polymeric Nanoparticles for Delivery in the Gastro-Intestinal Tract. In: Torchilin, V.P. **Nanoparticulates as Drug Carriers**. London: Imperial College Press, 2006, p. 609-648.

BISHOP, A.J.R; SCHIESTL, R. H. Homologous recombination and its role in carcinogenesis. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2, n. 2, p. 75-85, 2002.

BLACKBURN, A. C.; MCLARY, S. C.; NAEEM, R.; LUSZCZ, J.; STOCKTON, D. W.; DONEHOWER, L. A.; MOHAMMED, M.; MAILHES, J. B.; SOFERR, T.; NABER, S. P.; OTIS, C. N.; JERRY, D. J. Loss of heterozygosity occurs via mitotic recombination in Trp53[±] mice and associates with mammary tumor susceptibility of the BALB/c strain. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5140–5147, 2004.

BODA, C.; ENANGA, B.; DUMET, H.; CHAUVIERE, G.; LABROUSSE, F.; COUQUET, C.; SAIVIN, S.; HOUIN, G.; PERIE, J.; DUMAS, M.; BOUTEILLE, B. Plasma kinetics and efficacy of oral megalzol treatment in *Trypanosoma brucei* infected sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 121, n. 3-4, p. 213–223, 2004.

BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; BONTÁ, M.; CHAUVIERE, G.; PÉRIÉ, J.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megalzol and some related nitroimidazole derivatives. **J. Electroanal. Chem.**, v. 511, n. 1-2, p. 46–54, 2001.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **Int. J. Pharm.**, n. 280, p. 241–251, 2004.

BOUTEILLE, B.; KEITA, M.; ENANGA, B.; MEZUI ME NDONG, J.; MILLET, P.; DUMAS, M. Experimental models for new chemotherapeutic approaches to human African trypanosomiasis. In: DUMAS, M.; BOUTEILLE, B.; BUGUET, A. (Ed.), **Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness**. Paris: Springer-Verlag, 1999. p. 289–300.

BOUTEILLE, B.; MARIEDARAGON, A.; CHAUVIERE, G.; DE ALBUQUERQUE, C. N.; ENANGA, B.; DARDE, M. L.; VALLAT, J. M.; PERIE, J.; DUMAS, M. Effect of megalol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. **Acta Trop.**, v. 60, n. 2, p. 73–80, 1995.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E. E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. F.; STOPPANI, A. O. M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 188, n. 3, p. 643-648, 1980.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Poder executivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 23 fev. 2011.

BRENER, Z. Present status of the chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western hemisphere. **Pharmacol. Ther.**, v. 7, n. 1, p. 71-90, 1979.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BURDEN, E. J.; RACETTE, E. 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4,-thiadiazole, a new antimicrobial agents IX. Action against hemoflagellate infections in laboratory animals. **Antimicrob. Agents. Ch.**, v. 7, p. 545-547, 1968.

BURDEN, E. J.; RACETTE, E. Action against *Trichomonas vaginalis* infection in mice. **Antimicrob. Agents. Ch.**, p. 538, 1969.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 110, p. 58–79, 1989.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. **Nature**, v. 289, p. 353-357, 1981.

CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Ed.) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 683-697, 2002.

CASTRO, J. A.; DÍAZ, T. E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against Trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed. Env. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 19–33, 1988.

CAVANE, W. K.; DRYJA, T. P.; PHILLIPS, R. A.; BENEDICT, W. F.; GODBOUT, R.; GALLIE, B. L.; MORPHREE, A. L.; STRONG, L. C.; WHITE, R. L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. **Nature**, v. 305, p. 779-784. 1983.

CERISOLA, J.A. Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 24, p. 54-59, 1969.

CHAKRAVARTHI, S. S.; ROBINSON, D. H.; DE, S. Nanoparticles Prepared Using Natural and Synthetic Polymers. In: TORCHILIN, V. P. **Nanoparticulates as Drug Carriers**. London: Imperial College Press, 2006. p. 1-8.

CHEOW, W. S.; NG, M. L. L.; KHO K.; HADINOTO, K. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: Effect of freeze-drying adjuvants. **Int. J. Pharm.**, v. 404, p. 289–300, 2011.

CLUTTERBUCK, A. J. Sexual and parasexual genetics of *Aspergillus* species. In: BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. (Ed.), **Aspergillus: Biology and Industrial Applications**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. v. 23. p. 3-18. (Biotechnology Series).

COVE, D.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: SMITH, J. E.; PATEMAN, J. A. **Genetics and Physiology of Aspergillus**. New York: Academic Press, 1977. p. 81-95.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; COSTA, T. D.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-Chemical Characterization and *In Vivo* Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 3154–3162, 2006.

DARSAUD, A.; CHEVRIER, C.; BOURDON, L.; DUMAS, M.; BUGUET, A.; BOUTEILLE, B. Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 9, n. 1, p. 83–91, 2004.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. Effect of Drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell "in vitro". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 2, p. 209-218, 1987.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivate upon trypanosome cruzi tissue culture amastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 95-99, 1990.

DIAS, J. C. P. Chagas disease: successes and challenges. Editorial. **Cad. S. Publ**, v. 22, p. 2021, 2006.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. (Ed.) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chaga**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DIAS, J. C. P.; JATENE, A. D. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 25, p. 6-8, 1992.

DOCAMPO R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *T. cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 223–238, 1984.

DODD, M. C.; STILLMAN, W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 82, n. 1, p. 11-18, 1944.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008

DONATO, E. M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 31, n. 2, p. 125-130, 2010.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 347–360, 2003.

EASTMOND, D. A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W. A.; CIMINO, M. C.; DOBREV, I.; DOUGLAS, G. R.; NOHMI, T.; PHILLIPS, D. H.; VICKERS, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 341–349, 2009

ENANGA, B.; KEITA, M.; CHAUVIERE, G.; DUMAS, M.; BOUTEILLE, B. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. **Trop. Med. Int. Health**, v. 3, n. 9, p. 736–741, 1998.

ENANGA, B.; NDONG, J. M. M.; BOUDRA, H.; DEBRAUWER, L.; DUBREUIL, G.; BOUTEILLE, B.; CHAUVIERE, G.; LABAT, C.; DUMAS, M.; PERIE, J.; HOUIN, G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of human African trypanosomiasis – preliminary study. **Arzneimittelforschung**, v. 50, n. 2, p. 158–162, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A. O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, p. 209, 1990.

FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. CL 64,855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the *Salmonella*/Microsome Assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 49-52, 1986a.

FERREIRA, R. C. C.; SCHWARZ, U.; FERREIRA, L. C. S. Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. **Mutat. Res.**, v. 204, n. 4, p. 577-583, 1988b.

FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Avaliação do potencial mutagênico-cancerígeno de fármacos pelo ensaio *Salmonella*/Fração Microsossomal. I- Mutagenicidade de Drogas Anti-*Trypanosoma cruzi*. **Ciência e Cultura**, v. 38, n. 4, p. 696-702, 1986b.

FERREIRA, R. C.; MELO, M. E.; MORAES, J. M. A.; FERREIRA, L. C. Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole. **Braz J Med Biol Res.**, v. 21, n. 5, p.1069-1077, 1988a.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.**, v. 55, p. R1–R4. 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_169.html>. Acesso em: 11 Jul 2011

GORLA, N. B. Sister-chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to nifurtimox or benznidazole. **Mutat. Res.**, v. 188, n. 2, p. 129–133, 1987.

GRUNBERG, E.; TITSWORTH, E. H. Chemotherapeutic properties of heterocyclic compounds: Monocyclic compounds with five-membered rings. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 317–346, 1973.

GRUNBERG, E.; TITSWORTH, E.H. Chemotherapeutic properties of heterocyclic compounds: Monocyclic compounds with five-membered rings. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 317–346, 1973.

GÜRISOY, A.; EROĞLU, L.; ULUTIN, Ş.; TAŞYIIREK, M.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet aggregation. **Int. J. Pharm.**, v.52, p. 101-108, 1989.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm.**, v. 113, p. 57-63, 1995.

HELLEDAY, T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 532, p. 103–115, 2003.

HENDERSON, G. B.; FAIRLAMB, A. H. Tripanothione metabolism: a chemotherapeutic target in Trypanosomatids. **Parasitol. Today**, v. 3, n. 10, p. 312-315, 1987.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El Reino de los Hongos: micología básica y aplicada**. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990. p. 552.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 244, p. 69-70, 1966.

HOLLSTEIN, M, MCCANN, J.; ANGELOSANTO, F. A.; NICHOLS, W. W. Short-term tests for carcinogens and mutagens. **Mutat. Res.**, v. 65, n. 3, p. 133-226, 1979.

IMREH, S.; KLEIN, G.; ZABAROVSKY, E. R. Search for unknown tumor-antagonizing genes. **Gene Chromosome Canc.**, v. 38, n. 4, p. 307-321, 2003.

ISHIHARA, T.; GOTO, M.; KANAZAWA, H.; HIGAKI, M.; MIZUSHIMA, Y. Efficient Entrapment of Poorly Water-Soluble Pharmaceuticals in Hybrid Nanoparticles. **J Pharm Sci.**, v. 98, n. 7, p. 2357-2363, 2009.

JENNINGS, F. W.; CHAUVIERE, G.; VIODE, C.; MURRAY, M. Topical chemotherapy for experimental African trypanosomiasis with cerebral involvement: the use of melarsoprol combined with the 5-nitroimidazole, megalzol. **Trop. Med. Int. Health**, v. 1, n. 3, p. 363-366, 1996.

JOSEPHY, P. D.; MASON, R. P. Chemical and enzymatic nitroreduction: free radical and diamagnetic products of nitroimidazoles. In: ANDERS, M. W. (Ed.). **Bioactivation of Foreign Compounds**. New York: Academic Press, 1985. p. 451-483.

KÄFER, E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, v. 9, p. 105-145, 1958.

KARPIŃSKA, J. Derivative spectrophotometry—recent applications and directions of developments. **Talanta**, v. 64, p. 801–822, 2004.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 233, n.1–2, p. 239–252, 2002.

KUNZ, B. A.; HAYNES, R. H. Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast. **Ann. Rev. Genet.**, v. 15, p. 57-80, 1981.

LAFAVE, M. C.; SEKELSKY, J. Mitotic Recombination: Why? When? How? Where? **PLoS Genet.**, v. 5, n. 3, p. e1000411, 2009

LAGES-SILVA, E.; FILARDI, L. S.; BERNER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 85, n. 4, p. 401–405, 1990.

LEE, W. L. LOEI, C.; WIDJAJA, E.; CHYE, S.; LOO, J. Altering the drug release profiles of double-layered ternary-phase microparticles, **J. Control. Release**. 2011. doi:10.1016/j.jconrel.2011.02.012

LI, A. P.; HEFLICH, R. H. **Genetic toxicology**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.
MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **Int. J. Pharm.**, n. 290, p. 137–144, 2005.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, n. 6, p. 999–1006, 2003.

MAYORGA, M. E.; TIMBERLAKE, W. E. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes, a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthase. **Mol. Gen. Genet.**, v. 235, p. 205-212, 1992

MITAL, A. Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activity and Mutagenicity Relationship. **Sci Pharm.**, v. 77, p. 497–520, 2009.

MORAIS, M. A.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Mutagenic activation of CL 64 855, an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivant, by bacterial nitroreductases, **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n. 4, p. 567–572, 1998.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. **Environ Health Perspect**, v. 64, p. 199-208, 1985.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29–60, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. Efficacy and Pharmacokinetics of Intravenous Nanocapsule Formulations of Halofantrine in *Plasmodium berghei*-Infected Mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 4, p. 1222–1228, 2004.

MU, L.; FENG, S. S. PLGA/TPGS Nanoparticles for Controlled Release of Paclitaxel: Effects of the Emulsifier and Drug Loading Ratio. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1864-1872, 2003.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 26, n. 3, p. 343–347, 2000.

MUTHU, M. S.; SINGH, S. Studies on biodegradable polymeric nanoparticles of risperidone: in vitro and in vivo evaluation. **Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 305-319, 2008.

NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas Contendo Camptotecina a partir do Ácido poli (D,L-lático) e de Copolímeros Diblocos do Ácido Poli (D,L-lático) e Polietilenoglicol. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 504-11, 2005.

NESSLANY, F.; BRUGIER, S.; MOURIÈS, M. A.; LE CURIEUX, F.; MARZIN, D. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megazol. **Mutation Research**, v. 560, n. 2, p. 147–158, 2004.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, n. 1-2, p. 1–24, 2004.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Diseases: The Diseases of Poverty. Disponível em:

<<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.pdf>> Acesso em: 11 fev. 2010.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; DIAS M. R. P.; VILELA A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.vol. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PENG, H. S.; LIU, X. J.; LV, G. X.; SUN, B.; KONG, Q. F.; ZHAI, D. X.; WANG, Q.; ZHAO, W.; WANG, G. Y.; WANG, D. D.; LI, H. L.; JIN, L. H.; KOSTULAS, N. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **Int. J. Pharm.**, v. 352, n. 1-2, p. 29–35, 2008.

PIMENTEL, L. F.; JÚNIOR, A. T. J.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PIRES, L. T. A.; ZUCCHI, T. M. A. D. A new method to detect potential genotoxic agents using mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 17, p. 371-376, 1994.

PIRES, L. T. A.; ZUCCHI, T. M. A. D. Ribonucleic acid treatment alters gene expression in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Cell. Mol. Biol.**, v. 44, p. 303-313, 1998.

POÇA, K. S. **Avaliação do efeito genotóxico do megazol**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P. GUTERRES S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 16, p. 305–312, 2002.

POLI, P.; MELLO, M. A.; BUSCHINI, A.; MORTARA, R. A.; ALBUQUERQUE, C. N.; SILVA, S.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. M. A. D. Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1617-1627, 2002.

POOVI, G.; LEKSHMI, U. M. D.; NARAYANAN, N.; REEDY, P. N. Preparation and Characterization of Repaglinide Loaded Chitosan Polymeric Nanoparticles. **Research J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 1, n. 1, p. 12-24, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. **J. Microencapsulation**, v.15, n. 1, p.107-119, 1998.

RACHMAWATI, H.; RASAPUTRI, D. H.; TARINI, S. Preparation and Characterization Of Folic Acid-Encapsulated Solid Lipid Nanoparticle. **J. Nano Saintek**, v. 3, n. 2, p. 37-40, 2010.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-72, 2003.

ROPER, J. A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experientia**, v. 8, p. 14-15, 1952.

ROPER, J. A. The Parasexual Cycle. In: SUSSMAN, A. S. **The fungi an advanced treatise**: volume II, the fungal organism. London: Academic Press, 1966. p. 589-618.

SAEZ, A.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, p. 379-387, 2000.

SALVADOR, J. M.; ZUCCHI, T. D.; SCHINOR, E. C.; DIAS, D. A.; ZUCCHI, O. L. A. D.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. Genotoxic potentials of natural products detected by a short-term test using diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Open Mycol. J.**, v. 2, p. 48-54, 2008.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 208, p. 71–80, 2000.

SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Curr. Drug Deliv.**, v. 2, n. 4, p. 369–381, 2005.

SCHAFFAZICK S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTIERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 56, p. 501–505, 2003.

SCHIESTL, R. H. Non-mutagenic carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast. **Nature**, v. 337, p. 285-288, 1989.

SCHIESTL, R. H.; KHOGALI, F.; CARLS, N. Reversion of the mouse pink-eyed unstable mutation induced by low doses of X-rays. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1573-1576, 1994.

SCHMUÑIS, G. A.; SZARFMAN, A.; COARASA, L.; GUILLERON, C.; PERALTA, J. M. Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas' disease. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 2, p. 170-178, 1980.

SCHOUSTRA, S. E.; ALFONS, J.; DEBETS, M.; SLAKHORST, M.; HOEKSTRA R. F. Mitotic Recombination Accelerates Adaptation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. **PLOS Genetics**, v. 3, n. 4, p. 648-653, 2007.

SILVEIRA, A. C. Control of Vector Transmission of Chagas Disease, its limits and the research of situations or areas with persistent infestation by introduced species. In: PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research** (Final Report). Rio de Janeiro: PanAmerican Health Organization/World Health Organization, 2007.

SINGH, S.; MUTHU, M. S. Preparation and Characterization of nanoparticle containing atypical antipsychotical agent. **Nanomedicine**. v. 2, n. 2, p. 233-240. 2007.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int. J. Pharm.**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SOUSA, G. D.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; MILLER, R. G.; ANJOS, R. M. A.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect genotoxic effects of mercury fumes in eukaryotic organisms. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, p. 404-413, 2009.

STOLL, L. B.; CREMONESI, F. C.; PIRES, L. T.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, T. M. A. D. Induction of mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans* using low-dose X-rays. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, p. 467-475, 2008.

TAVARES, G. D.; ISHIKAWA, G.M.; MONTEIRO, T.F. ; KÉDOR, E.R.M.; CHACRA, N.A.B.; CONSIGLIERI, V.O. Derivative spectrophotometric method for determination of acyclovir in polymeric nanoparticles. **Química Nova** (Online), 2011. Disponível em: <<https://sistemas.usp.br/tycho/producaoacademica/fcf/fbf/P7-0.html>>. Acesso em: 10 Jul. 2011.

TILBURN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C. Insertional and cloning of the wA gene of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 126, p. 81-90, 1990

TIMBERLAKE, W.; MARSHAL, M. A. Genetics engineering of filamentous fungi. **Science**, v. 224, p. 1313-1317, 1988.

TORCHILIN, V. P. Introduction. Nanocarriers for Drug Delivery: Needs and Requirements. In:_____. **Nanoparticulates as Drug Carriers**. London: Imperial College Press, 2006. p. 1-8.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. **J. Mol. Med.**, v. 77, n. 3, p. 332–338, 1999.

VAN DE VATE, C.; JANSEN, G. J. O. Meiotic recombination in a duplication strains of *Aspergillus nidulans*. **Gen. Res.**, v. 31, p. 29-52, 1978.

VIODE, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PERIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, n. 5, p. 549–557, 1999.

WANG, Y.; LI, P.; KONG L.; PENG, Z.; LUO, Y. Formulation Optimization For High Drug Loading Colonic Drug Delivery Carrier. **BMEI**, p. 1686-1689, 2010. doi: 10.1109/BMEI.2010.5640547.

WANG, Y.; MAHER, V. M.; LISKAY, R. M; MCCORNICK, J. J. Carcinogens can induce homologous recombination between duplicated chromosomal sequences in mouse L cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 196-202, 1988.

WARDMAN, P. Some reactions and properties of nitra radical-anions important in biology and medicine. **Environ. Health Perspect.**, v. 64, p. 309-320, 1985.

WATANABE, M.; NISHINO, T.; TAKIO, K.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. typhimurium*. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 23922–23928, 1998.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Fungal Genetics. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005. p. 35-64.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. .Distribution of cases Trypanosoma cruzi infection, based on official estimates and status of vector transmission, worldwide, 2006-2009. Disponível em: <http://gamapserser.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png> Acesso em: 18 Jul 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, v. 905, p. 1–115, 2002.

YOUNG, B. D.; DEBERNARDI, S.; LILLINGTON, D. M.; SKOULAKIS, S.; CHAPLIN T.; FOOT, N. J.; RAGHAVAN, M. A role for mitotic recombination in leukemogenesis. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 46, p. 90-97. 2006.

ZEIGER, E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, n. 2, p. 85-95, 1998.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **Int. J. Pharm.**, v. 294, p. 261–267, 2005.

ZUCCHI, F.D. **Linhagens de *Aspergillus nidulans* como Biossensores de Efeitos Genotóxicos e Antigenotóxicos de Agentes Ambientais**. 2005. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; MELO, I. S.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. A short-term test adapted to detect the genotoxic effects of environmental volatile pollutants (benzene fumes) using the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **J. Environ. Monit.**, v. 7, p. 598-602, 2005.

ZUCCHI, T. M. A. D. Isolation of putative recombination mutants of *Aspergillus nidulans*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 13, p. 409-424, 1990a.

ZUCCHI, T. M. A. D. Location of the suppressor of *methA17* mutation in the 30 mutant of *Aspergillus nidulans*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 13, p. 425-443, 1990b.

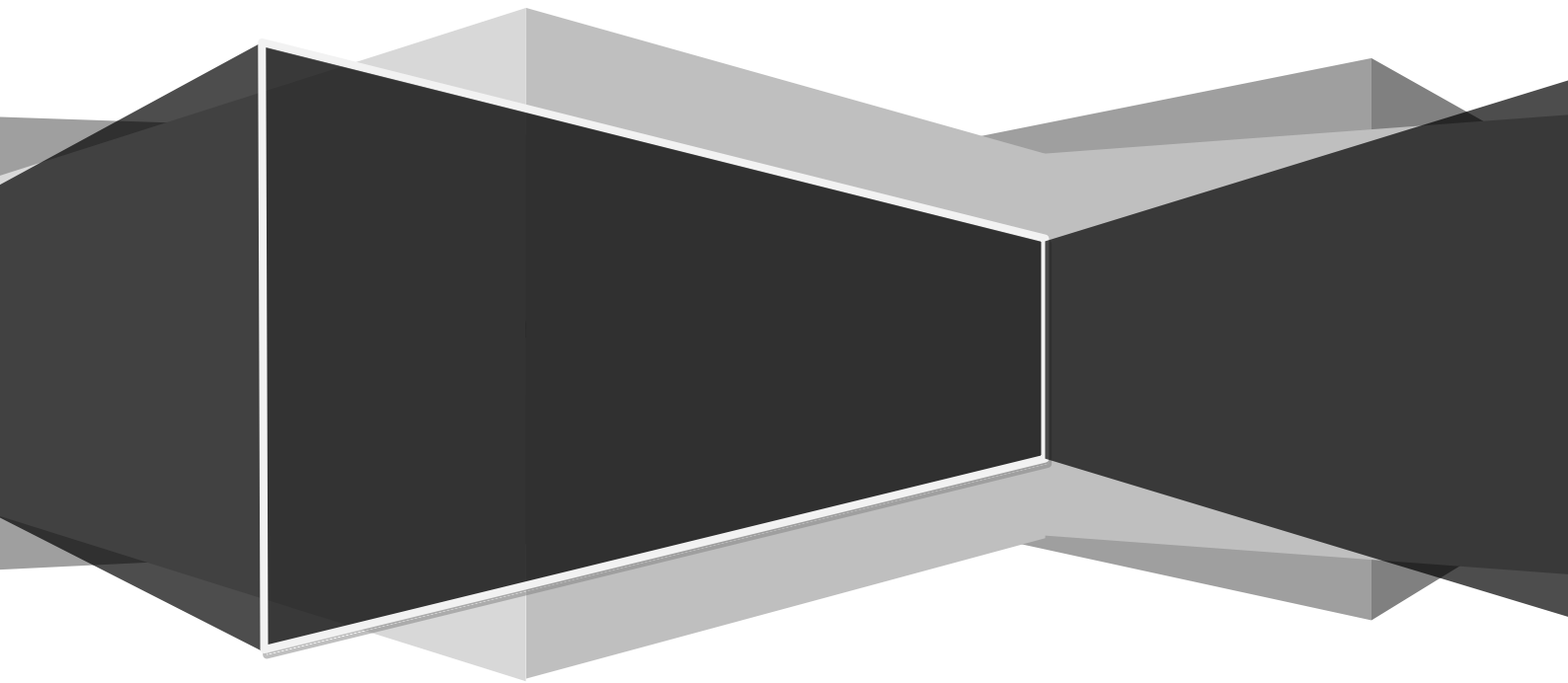
ZUCCHI, T. M. A. D. RNA-mediated transformation in *A. nidulans* recovers gene functions lost by deletion or by point mutations. **Cell. Mol. Biol.**, v. 42, n. 6, p. 889-904, 1996a.

ZUCCHI, T. M. A. D.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; FERREIRA, S. H.; DELUCCA, F. L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by RNA from rat macrophages stimulated with lipopolysaccharides. **Cell. Mol. Biol.**, v. 42, n. 2, p. 235-240, 1996b.

ZUCCHI, T. M. A. D.; PIRES, L. T. A. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1997. p. 357-413,

APÊNDICE

QUADRADOS LATINOS



Nome: Quadro 1 - Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* (II-I)// UT184 (121 colônias – 5 placas) - CONTROLE

Legenda: _menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

<i>Dp</i> (II-I) UT184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bio</i> +	<i>w</i> +	+ <i>pyro</i>	+ <i>lac</i>	+ <i>tio</i>	+ <i>gal</i>	+ <i>nic</i>	+ <i>ac</i>	+ <i>cha</i>
+ <i>ribo</i>	95 26	2 93 12 14	1 94 5 21	45 50 9 17	93 2 12 14	93 2 18 8	94 1 23 3	93 2 12 14	56 39 11 15	93 2 16 10	30 20 3 14
+ <i>paba</i>	13.2%	107 14	4 103 2 12	49 58 5 9	101 6 4 10	104 3 7 7	105 2 12 2	99 8 6 8	63 44 4 10	103 4 6 8	31 27 2 7
+ <i>bio</i>	18.2%	13.2%	115 6	52 63 2 4	101 14 4 2	107 8 4 2	113 2 4 2	103 12 2 4	63 52 4 2	106 9 3 3	32 31 1 3
+ <i>w</i>	51.2%	47.9%	46.3%	67 54	60 7 45 9	61 6 50 4	64 3 53 1	58 9 47 7	40 27 27 27	61 6 48 6	33 34 0 0
<i>pyro</i> +	88.4%	91.7%	85.1%	57.0%	16 105	8 8 103 2	13 3 104 1	6 10 99 6	3 13 64 41	9 7 100 5	2 5 31 29
<i>lac</i> +	83.5%	91.7%	90.1%	53.7%	8.3%	10 111	7 3 110 1	0 10 105 6	3 7 64 47	4 6 105 6	0 6 33 28
<i>tio</i> +	80.2%	88.4%	95.0%	53.7%	11.6%	6.6%	4 117	1 3 104 13	0 4 67 50	3 1 106 11	1 2 32 32
<i>gal</i> +	88.4%	88.4%	88.4%	53.7%	9.9%	6.0%	11.6%	16 105	6 10 61 44	6 10 103 2	1 8 32 26
<i>nic</i> +	58.7%	60.3%	53.7%	55.4%	36.4%	41.3%	41.3%	41.3%	54 67	47 7 62 5	9 18 24 16
<i>ac</i> +	85.1%	91.7%	90.1%	55.4%	11.6%	8.3%	11.6%	6.6%	43.0%	12 109	0 6 33 28
<i>cha</i> +	65.7%	56.7%	52.2%	49.3%	46.3%	41.8%	49.3%	40.3%	37.3%	41.8%	34 33

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp II-I//UT184* em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp (II-I)//UT184* (121 colônias – 5 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 1												Placa 2												Placa 3												
		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac	
1	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
2	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	2	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	3	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	6												6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	8	B	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	8	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	9	B	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	10	B	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	10	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11												11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12												12	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13	C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	13	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14												14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	16	B	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Cd	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	Cd	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	22	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Vd	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	23	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	Vd	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	24	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	Bd	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	Bd	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* II-I//UT184 (121 colônias – 5 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 4

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4											
5											
6	C	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
7	C	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
8	C	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
11											
12	B	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
13	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Bd	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
22	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
23	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Placa 5

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8	B										
9	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
18	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
20	C										
21	C										
22	C										
23	C										
24	C										
25	C										

Nome: Quadro 2 - Análise mitótica do diplóide recombinante (*Dp* II-I)//UT184 tratado com DMSO 0,1 ml em MM e haploidizado em MC + *pFA*

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* (II-I)//UT184 (148 colônias – 6 placas) - CONTROLE

Legenda: _menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

<i>Dp</i> (II-I) UT184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bio</i> +	<i>w</i> +	+ <i>pyro</i>	+ <i>lac</i>	+ <i>tio</i>	+ <i>gal</i>	+ <i>nic</i>	+ <i>ac</i>	+ <i>cha</i>
+ <i>ribo</i>	113 35	2 111 18 17	2 111 17 18	54 49 23 12	112 1 29 6	113 0 34 1	113 0 33 2	110 3 25 10	100 13 16 19	111 2 28 7	12 37 2 10
+ <i>paba</i>	12.8%	128 20	7 121 12 8	68 60 19 1	124 4 17 3	128 0 19 1	127 1 19 1	125 3 10 10	109 19 7 13	128 0 11 9	13 47 1 0
+ <i>bio</i>	13.5%	10.1%	129 19	72 57 15 4	128 1 13 6	128 1 19 0	128 1 18 1	124 5 11 8	108 21 8 11	124 5 15 4	13 44 1 3
+ <i>w</i>	51.4%	46.6%	51.4%	61 87	59 2 82 5	61 0 86 1	60 1 86 1	59 2 76 11	51 10 65 22	61 0 78 9	14 47 0 0
+ <i>pyro</i>	79.7%	85.8%	90.5%	43.2%	7 141	7 0 140 1	6 1 140 1	4 3 131 10	1 6 115 26	5 2 134 7	0 2 14 45
+ <i>lac</i>	77.0%	87.2%	86.5%	41.9%	5.4%	1 147	0 1 146 1	0 1 135 12	0 1 116 31	0 1 139 8	0 0 14 47
+ <i>tio</i>	77.7%	86.5%	87.2%	41.2%	4.7%	0.7%	2 146	1 1 134 12	0 2 116 30	1 1 138 8	0 1 14 46
+ <i>gal</i>	81.1%	91.2%	89.2%	47.3%	9.5%	8.1%	8.8%	13 135	4 9 112 23	7 6 132 3	1 1 13 46
+ <i>nic</i>	80.4%	82.4%	80.4%	49.3%	18.2%	20.9%	20.3%	18.2%	32 116	24 8 115 1	0 10 14 37
+ <i>ac</i>	79.7%	92.6%	86.5%	47.3%	8.1%	5.4%	6.1%	6.8%	16.9%	9 139	0 0 14 47
+ <i>cha</i>	36.1%	21.3%	26.2%	23.0%	73.8%	77.0%	75.4%	77.0%	60.7%	77.0%	87 14

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com DMSO 0,1 mL em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* II-I//UT184 (148 colônias – 6 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 1											Placa 2											Placa 3													
		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	Bd	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	2	Bd	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	Bd	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	Bd	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	4	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	C	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	Bd	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	11	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	Bd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	Bd	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	Bd	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	24	Bd	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	25	Bd	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com DMSO 0,1 mL em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* II-I x UT184 (148 colônias – 6 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 4

	sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4		-	-	-	+	-	+	-	-	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	-	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Bd	+	+	-	+	-	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	-	+
25	Bd	+	-	-	-	+	+	+	-	+

Placa 5

	sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Vd	+	-	-	-	+	+	+	-	+
6	Bd	+	-	+	+	+	-	+	-	+
7	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Bd	+	-	+	-	+	-	+	+	+
10	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+
11	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Bd	+	-	+	-	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+
22	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	-
23	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
24	V	+	-	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+

Placa 6

	sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac	
1	C	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Bd	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
16	Bd	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
17	B	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Bd	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
21	C	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
22	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nome: Quadro 3 - Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com Megazol 2 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA
 IDENTIFICAÇÃO: *Dp* (II-I)//UT184 (150 colônias – 6 placas)

Legenda: _menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

<i>Dp</i> (II-I) UT184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bio</i> +	<i>w</i> +	+ <i>pyro</i>	+ <i>lac</i>	+ <i>tio</i>	+ <i>gal</i>	+ <i>nic</i>	+ <i>ac</i>	+ <i>cha</i>
+ <i>ribo</i>	122 28	23 99 11 17	2 120 8 20	86 36 15 13	122 0 28 0	121 1 25 3	120 2 28 0	121 1 22 6	109 13 22 6	119 3 24 4	6 30 0 13
+ <i>paba</i>	26.7%	116 34	3 113 7 27	71 45 30 4	116 0 34 0	115 1 31 3	114 2 34 0	115 1 28 6	101 15 30 4	114 2 29 5	6 39 0 4
+ <i>bio</i>	14.7%	20.0%	140 10	93 47 8 2	140 0 10 0	138 2 8 2	138 2 10 0	138 2 5 5	125 15 6 4	136 4 7 3	6 41 0 2
+ <i>w</i>	66.0%	50.0%	63.3%	49 101	59 2 82 5	49 0 97 4	48 1 100 1	49 0 94 7	42 7 89 12	48 1 95 6	6 43 0 0
+ <i>pyro</i>	81.3%	77.3%	93.3%	32.7%	0 150	0 0 146 4	6 1 140 1	0 0 143 7	0 0 131 19	0 0 143 7	0 0 6 43
+ <i>lac</i>	82.7%	78.7%	93.3%	35.3%	2.7%	4 146	0 0 148 2	3 1 140 6	2 2 129 17	3 1 140 6	0 0 6 43
+ <i>tio</i>	80.0%	76.0%	92.0%	32.7%	1.3%	4.0%	2 148	2 0 141 7	2 0 129 19	2 0 141 7	0 1 6 42
+ <i>gal</i>	84.7%	80.7%	95.3%	37.3%	4.7%	6.0%	6.0%	7 143	5 2 126 17	5 2 138 5	0 0 6 43
+ <i>nic</i>	76.7%	70.0%	86.0%	36.0%	12.7%	12.7%	14.0%	14.7%	19 131	17 2 129 5	2 5 4 38
+ <i>ac</i>	82.0%	75.3%	92.7%	36.0%	4.7%	6.0%	6.0%	6.7%	14.7%	7 143	0 1 6 42
+ <i>cha</i>	38.8%	20.4%	16.3%	12.2%	87.6%	87.8%	85.7%	87.8%	81.6%	85.7%	101 6

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp(II-I)//UT184* tratado com Megazol 2 µg/mL em MM e haploidizado em MC + pFA
 IDENTIFICAÇÃO: *Dp(II-I)//UT184* (150 colônias – 6 placas)
 LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 1												Placa 2												Placa 3											
		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	Bd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	3	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	3	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	4	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Bd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5	C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
6	Bd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	Bd	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	18	Bd	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	Bd	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Bd	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
23	Bd	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	Bd	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp II-I//UT184* tratado com Megazol 2 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp (II-I)// UT184* (150 colônias – 6 placas)

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 4

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Bd	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	Bd	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
11	C	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
12	Bd	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
13	Bd	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 5

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9	B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
16	Bd	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
17	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 6

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
23	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Nome: Quadro 4 - Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com Megazol 4 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA
 IDENTIFICAÇÃO *Dp* (II-I)//UT184 (150 colônias – 6 placas)

Legenda: _menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

<i>Dp</i> (II-I) UT184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bio</i> +	<i>w</i> +	+ <i>pyro</i>	+ <i>lac</i>	+ <i>tio</i>	+ <i>gal</i>	+ <i>nic</i>	+ <i>ac</i>	+ <i>cha</i>
+ <i>ribo</i>	115 35	5 110 11 24	1 114 5 30	63 52 8 27	115 0 34 1	115 0 34 1	113 2 35 0	111 4 25 10	106 9 24 11	109 6 34 1	0 52 0 27
+ <i>paba</i>	19.3%	134 16	0 134 6 10	59 75 12 4	133 1 16 0	134 0 15 1	132 2 16 0	132 2 4 12	126 8 4 12	132 2 11 5	0 75 0 4
+ <i>bio</i>	20.7%	6.7%	144 6	67 77 4 2	143 1 6 0	143 1 6 0	142 2 6 0	133 11 3 3	129 15 1 5	138 6 5 1	0 77 0 2
+ <i>w</i>	60.0%	42.0%	46.0%	79 71	78 1 71 0	79 0 70 1	78 1 70 1	74 5 62 9	72 7 58 13	77 2 66 5	0 79 0 0
+ <i>pyro</i>	77.3%	88.7%	96.3%	50.0%	1 149	1 0 148 1	1 0 147 2	1 0 135 14	1 0 129 20	1 0 142 7	0 1 0 78
+ <i>lac</i>	77.3%	90.0%	95.3%	53.3%	1.3%	1 149	1 0 147 2	0 1 136 13	1 0 129 20	1 0 142 7	0 0 0 79
+ <i>tio</i>	75.3%	88.0%	94.7%	52.7%	2.0%	2.0%	2 148	2 0 134 14	2 0 128 20	2 0 141 7	0 1 0 78
+ <i>gal</i>	80.7%	96.0%	90.7%	55.3%	10.0%	8.7%	10.7%	14 136	5 9 125 11	10 4 133 3	0 5 0 74
+ <i>nic</i>	78.0%	92.0%	89.3%	56.7%	14.0%	14.0%	14.7%	10.7%	20 130	15 5 128 2	0 7 0 72
+ <i>ac</i>	73.3%	91.3%	92.7%	54.7%	6.3%	5.3%	6.0%	8.7%	11.3%	7 143	0 2 0 77
+ <i>cha</i>	34.2%	5.1%	2.5%	0.0%	98.7%	100.0%	98.7%	93.7%	91.1%	97.5%	0 71 79

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* II-I//UT184 tratado com Megazol 4 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp* (II-I)// UT184 (150 colônias – 6 placas)

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 1

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
2	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
6	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	C	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Bd	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	B	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 2

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Bd	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
5	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Bd	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Bd	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
19	Bd	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 3

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Bd	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Bd	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp II-I//UT184* tratado com Megazol 4 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp (II-I)// UT184* (150 colônias – 6 placas)

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 4

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Bd	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Cd	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 5

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Placa 6

		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Bd	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
11	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
12	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Cd	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
15	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Bd	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
22	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
23	C	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nome: Quadro 5 - Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com Megazol 8 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA
 IDENTIFICAÇÃO: *Dp* (II-I)//UT184 (150 colônias – 6 placas)

Legenda: _menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

<i>Dp</i> (II-I) UT184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bio</i> +	<i>w</i> +	+ <i>pyro</i>	+ <i>lac</i>	+ <i>tio</i>	+ <i>gal</i>	+ <i>nic</i>	+ <i>ac</i>	+ <i>cha</i>
+ <i>ribo</i>	104 46	3 101 5 41	0 104 3 43	32 72 14 32	104 0 46 0	104 0 42 4	104 0 45 1	103 1 41 5	104 0 40 6	104 0 45 1	2 70 0 32
+ <i>paba</i>	20.3%	142 8	1 141 2 6	41 103 5 3	142 0 8 0	141 1 5 3	142 0 7 1	139 3 5 3	139 3 5 3	142 0 7 1	2 99 0 3
+ <i>bio</i>	28.7%	4.7%	147 3	44 103 2 1	147 0 3 0	144 3 2 1	146 1 3 0	142 5 2 1	143 4 1 2	147 0 2 1	2 101 0 1
+ <i>w</i>	42.7%	29.3%	30.0%	104 46	104 0 46 0	104 0 42 4	104 0 45 1	104 0 40 6	103 1 41 5	104 0 45 1	2 102 0 0
+ <i>pyro</i>	69.1%	94.7%	98.0%	89.3%	0 150	0 0 146 4	0 0 149 1	0 0 144 6	0 0 144 6	0 0 149 1	0 0 2 102
+ <i>lac</i>	72.0%	96.0%	96.7%	72.0%	2.7%	4 146	3 1 146 0	1 3 143 3	1 3 143 3	3 1 146 0	0 0 2 102
+ <i>tio</i>	70.0%	95.3%	97.3%	70.0%	0.7%	2.0%	1 149	1 0 143 6	1 0 143 6	1 0 148 1	0 0 2 102
+ <i>gal</i>	72.0%	94.7%	95.3%	73.3%	4.0%	2.7%	4.7%	6 144	3 3 141 3	5 1 144 0	0 0 2 102
+ <i>nic</i>	73.3%	94.7%	86.7%	72.0%	4.0%	2.7%	4.7%	4.0%	6 144	5 1 144 0	0 1 2 101
+ <i>ac</i>	70.0%	96.3%	98.7%	70.0%	6.7%	2.0%	1.3%	3.3%	3.3%	1 149	0 0 2 102
+ <i>cha</i>	32.7%	4.8%	2.9%	1.9%	98.1%	98.1%	98.1%	98.1%	97.1%	98.1%	46 2 102

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp II-I//UT184* tratado com Megazol 8 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp II-I//UT184* (150 colônias – 6 placas)

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 1												Placa 2												Placa 3											
		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac
1	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	Bd	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
4	C	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	4	C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	5	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	Bd	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	Bd	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	12	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	12	B	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
13	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	13	Bd	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	13	C	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	18	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	19	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	23	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Nome: Análise mitótica do diplóide recombinante *Dp II-I//UT184* tratado com Megazol 8 µg/ml em MM e haploidizado em MC + pFA

IDENTIFICAÇÃO: *Dp (II-I)//UT184* (150 colônias – 6 placas)

LINHAGEM: *w⁻ cha⁺ ribo⁻ paba⁻ bio⁻ pyro⁺ nic⁺ tio⁺ gal⁺ ac⁺*

Placa 4												Placa 5												Placa 6												
		sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac			sm	rib	bio	pab	tio	nic	pyr	lac	gal	ac	
1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	5	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	10	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	11	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	12	Bd	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
13	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	Bd	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	13	C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	15	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Bd	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	19	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	20	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	22	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	22	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	23	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+