

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Sais imidazólicos de corantes azóicos e benzimidazóis fluorescentes como marcadores biocidas de biofilmes patogênicos de *Candida* spp.

IGOR OLIVEIRA PALAGI DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Sais imidazólicos de corantes azóicos e benzimidazóis fluorescentes como marcadores biocidas de biofilmes patogênicos de *Candida* spp.

IGOR OLIVEIRA PALAGI DE SOUZA

Dissertação apresentada por Igor Oliveira Palagi de Souza para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientador: Prof Dr. Henri Stephan Schrekker

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em dia 17/03/2016 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Irene Kùlkamp Guerreiro, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

FICHA CATALOGRÁFICA

Palagi de Souza, Igor Oliveira

Sais imidazólicos de corantes azóicos e benzimidazóis fluorescentes como marcadores biocidas de biofilmes patogênicos de *Candida* spp. – Porto Alegre, 2016. Nº de páginas: 85

Área de concentração: Micologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Co-orientador: Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a meu orientador e meu co-orientador que sempre me ajudaram durante todo o desenvolvimento deste estudo e que acreditam no meu potencial. E a minha família que mesmo diante de diversas adversidades esteve ao meu lado me apoiando durante esses dois anos.

Agradecimentos

Agradecimentos a participação dos membros da banca examinadora, ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise e ao Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, laboratórios que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

*When everything seems to be going against you,
remember that the airplane takes off against the wind,
not with it. Henry Ford*

SAIS IMIDAZÓLICOS DE CORANTES AZÓICOS E BENZIMIDAZÓIS
FLUORESCENTES COMO MARCADORES BIOCIDAS DE BIOFILMES
PATOGENICOS DE *Candida* spp.

Biofilmes propiciam um ambiente capaz de proteger as células microbianas de danos por fatores químicos e físicos, promovendo infecções hospitalares relacionadas ao uso de cateteres e demais instrumentos hospitalares, elevando os índices de mortalidade e morbidade de pacientes. Portanto, garantir a correta desinfecção capaz de impedir contaminações e infecções em ambientes hospitalares é de extrema importância. Para este fim, neste estudo explorou-se a seleção de uma substância capaz de marcar e ser biocida contra biofilmes fúngicos em superfícies de aço inox, a partir de nove candidatos benzimidazóis fluorescentes, com códigos **NB1** a **NB9** e oito sais imidazólicos de corantes azóicos, denominados **C₄MImErioCr**, **C₁₀MImMO**, **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₄MImMO**, **C₁₀MImORANGEII**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII**. Desenvolveu-se para este fim um roteiro metodológico para determinar quais destas substâncias são capazes de marcar e eliminar biofilmes de forma eficaz e segura. Os métodos utilizados para avaliar as substâncias foram (1) a Concentração Mínima Inibitória (MIC) conforme protocolo do CLSI M27-A3, (2) microscopias verificando capacidade das substâncias em marcar células, (3) ensaios com deposição sobre superfície do corpo de prova (placas de aço inox) com biofilme, (4) verificação da atividade biocida sobre biofilmes utilizando microscopias e (5) ensaios de citotoxicidade. Essas substâncias foram testadas frente a nove cepas de *Candida* spp., incluindo *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Na avaliação das substâncias, SI de corantes azóicos inibiram o crescimento celular de fungos, já o benzimidazol fluorescente **NB7** apresentou atividades simultâneas de detecção e ação biocida sobre o biofilme. Todas as cepas testadas foram sensíveis a essa substância. Além disso, os biofilmes formados pelas cepas ATCC 18804 (*C. albicans*), ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) e ATCC 750 (*C. tropicalis*) na superfície de aço inox 304 sofreram ação biocida, quando expostas por 15 segundos a **NB7**, sendo um potencial sanitizante.

Palavras-chaves: Biofilme fúngico, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, Aço inoxidável, Substâncias Fluorescentes, Sais imidazólicos de corantes azóicos.

IMIDAZOLIUM SALTS OF AZO DYES AND FLUORESCENT BENZIMIDAZOLES WITH BIOCIDAL AND STAINING ACTIVITY AGAINST PATHOGENIC *Candida* spp. BIOFILMS

Biofilms provide an environment capable of protecting microbial cells from damage by chemical and physical factors of the immune system, and hinder the penetration of various antimicrobial agents, promoting nosocomial infections related to catheters, increasing mortality and morbidity of patients. Therefore, it is important to ensure proper hygiene to prevent contamination and infections in hospital environments. For this purpose, this study explored the identification of a substance that both detects and has biocidal activity against fungal biofilms on stainless steel surfaces. Both nine fluorescent benzimidazole substances, coded **NB1** to **NB9** and eight imidazolium salts of azo dyes, named denominados **C₄MImErioCr**, **C₁₀MImMO**, **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₄MImMO**, **C₁₀MImORANGEII**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII** were tested as candidates. These substances were tested applying a methodology developed to determine if a substance is able to detect and has biocidal activity against fungal biofilms. Overall, this study involved the following methods: (1) Minimum Inhibitory concentration test following the CLSI protocol (M27-A3; the substances were tested against nine fungal strains, including *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*.), (2) microscopy to determine the marker capacity, (3) spraying tests of the substances on surfaces (stainless steel) with fungal biofilms, (4) tests to verify the capability of the substances to both stain and be biocidal against fungal biofilms, applying microscopic techniques and (5) cytotoxicity tests. Within the set of seventeen substances, benzimidazole derivative **NB7** was identified with the desired capabilities, staining and biocidal activity against fungal biofilms at the same time. All tested fungal strains were sensitive to this substance. A biocidal activity was identified on the biofilms of ATCC 18804 (*C. albicans*), ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) and ATCC 750 (*C. tropicalis*), grown on stainless steel 304, when exposed fifteen seconds to substance **NB7**. Although this substance showed being cytotoxic, it represents a promising candidate for sanitization purposes, including medical tools.

Keywords: Fungal biofilm, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, Stainless Steel, Fluorescent substance, Imidazolium salt of azo dye.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Biofilme	17
2.2. Atividade de remoção e biocida contra biofilmes	18
2.3. Marcação de biofilme fúngico	19
2.4. Métodos de formação e remoção de biofilme	21
2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura para análise de biofilmes	21
2.6. Corpos de prova susceptíveis a formação de biofilme fúngico	22
2.7. Sais imidazólicos e SI de corantes azóicos	22
2.8. Substâncias fluorescentes	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Cepas utilizadas	29
4.2. Formação do biofilme sobre corpo de prova	30
4.3. Síntese dos SI de corantes azóicos	30
4.4. Benzimidazóis fluorescentes	33
4.5. Metodologia	37
4.5.1. Teste de suscetibilidade	39
4.5.2. Microscopia óptica e de fluorescência	39
4.5.3. Marcação do biofilme sobre corpo de prova	40
4.5.4. Atividade de remoção ou biocida contra biofilmes	42
4.5.5. Teste de toxicidade	44
4.5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Testes de suscetibilidade	47
5.2. Microscopia óptica e de fluorescência	50
5.2.1. Microscopia com corantes	50
5.2.2. Microscopia com sais imidazólicos de corantes azóicos	54
5.2.3. Microscopia com substâncias fluorescentes	62
5.3. Marcação do biofilme sobre corpo de prova	64
5.3.1. Teste com corantes puros	64

5.3.2. Teste com sais imidazólicos de corantes azóicos	64
5.3.3. Teste com derivados benzimidazóis fluorescentes.....	66
5.4. Atividade de remoção ou biocida contra biofilmes	68
5.5. Teste de toxicidade	72
5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura	74
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO I – Certificado de qualidade da empresa Aperam	85

TABELAS

Tabela 1. Código, espécie e origem das cepas testadas.....	29
Tabela 2. Códigos e estruturas dos sais imidazólicos de corantes azóicos.	31
Tabela 3. Estruturas químicas dos benzimidazóis fluorescentes testados.....	34
Tabela 4. Suscetibilidade de nove cepas frente as substâncias testadas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	49

FIGURAS

Figura 1. Esquema das etapas de formação de um biofilme de levedura.	18
Figura 2. Estrutura do anel imidazólico e do derivado catiônico (SI).	23
Figura 3. Estrutura química de um sal imidazólico (cloreto de 1-n-decil-3-metilimidazólico). Regiões hidrofílicas em azul e hidrofóbicas em vermelho.	24
Figura 4. Estrutura genérica do benzimidazol	25
Figura 5. Estrutura genérica dos benzimidazóis fluorescentes	33
Figura 6. Fluxograma de testes realizados para benzimidazóis fluorescentes e sais imidazólicos com ânions azoicos corantes a fim de verificar a capacidade de ação biocida e de marcação contra biofilmes leveduriformes.	38
Figura 7. Esquema ilustrando teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com substância fluorescente.	41
Figura 8. Esquema ilustrando teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com substância benzoazólica fluorescente.	43
Figura 9. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade dos corantes em marcar células fúngicas em microscopia óptica.	53
Figura 10. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico C ₁₀ MIm e ânion com corante Alaranjado II.	56
Figura 11. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico (C ₁₀) ₂ MIm e ânion com corante Alaranjado II. ..	57
Figura 12. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico C ₁₆ MIm e ânion com corante Alaranjado II.	58
Figura 13. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico C ₁₀ MIm e ânion com corante Alaranjado de Metila.	59
Figura 14. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico (C ₁₀) ₂ MIm e ânion com corante Alaranjado de Metila.	60
Figura 15. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico C ₁₆ MIm e ânion com corante Alaranjado de Metila.	61
Figura 16. Imagens fotográficas de microscopias por fluorescência utilizando a substância de código NB7. É possível observar que as células fúngicas foram reveladas.	64
Figura 17. Imagens fotográficas do teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com composto com cátion com ramificação de dez carbonos e ânion com corante Orange II.	65

Figura 18. Imagens fotográficas do teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com NB7 e controle negativo, em que o corpo de prova ficou somente imerso em água peptonada por 96 h.	67
Figura 19. Viabilidade celular de leucócitos expostos a substâncias controle e diferentes concentrações da substância NB7.	73
Figura 20. Proliferação celular de leucócitos expostos a substâncias controle e diferentes concentrações da substância NB7.	73
Figura 21. Gráfico do percentual de leucócitos por mm³ e concentração do NB7 com regressão linear e equação para cálculo de IC50.	74
Figura 22. A) Candida albicans ATCC 18804 um minuto após entrar em contato com a substância NB7 (flechas brancas e azuis indicam células parentais e em brotamento, respectivamente), B) C. albicans ATCC 18804 uma hora após entrar em contato com a substância NB7, C) Controle com C. albicans ATCC 18804; e D) Controle com C. albicans ATCC 18804 e parte de matriz polimérica com uma célula leveduriforme.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

LI – Líquidos Iônicos

SI – Sais Imidazólicos

QS – Quorum Sensing

ADN – Ácido desoxirribonucleico

TSB – Caldo triptona de soja

UFC – Unidades formadoras de colônia

ATCC – American Type Culture Collection

PNCq – Programa Nacional de Controle de Qualidade

XTT – 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

C₄MImErioCr – Sal imidazólico com cátion **C₄MIm** e ânion corante Negro de Eriocromo T

C₁₀MImMO – Sal imidazólico com cátion **C₁₀MIm** e ânion corante alaranjado de metila

C₁₆MImMO – Sal imidazólico com cátion **C₁₆MIm** e ânion corante alaranjado de metila

(C₁₀)₂MImMO – Sal imidazólico com cátion **(C₁₀)₂MIm** e ânion corante Alaranjado de metila.

C₄MImMO – Sal imidazólico com cátion **C₄MIm** e ânion corante alaranjado de metila

C₁₀MImORANGEII – Sal imidazólico com cátion **C₁₀MIm** e ânion corante alaranjado II

C₁₆MImORANGEII – Sal imidazólico com cátion **C₁₆MIm** e ânion corante alaranjado II

(C₁₀)₂MImORANGEII – Sal imidazólico com cátion **(C₁₀)₂MIm** e ânion corante alaranjado II.

1. INTRODUÇÃO

Infecções por fungos oportunistas são crescentes em seres humanos, principalmente devido ao aumentado número de indivíduos imunocomprometidos. Tais infecções são principalmente desencadeadas pela capacidade desses microrganismos de formar biofilmes em materiais em contato direto com o organismo humano, sendo um fator determinante da virulência de espécies de *Candida* gerando resistência a antimicrobianos e ao sistema imunológico de pacientes. Nesta condição, células planctônicas tornam-se aderidas a uma superfície e o conjunto de células forma microcolônias de micro-organismos embebidos em uma matriz extracelular polimérica, composta de proteínas, lipídeos, sacarídeos e ácidos nucleicos (COSTA, 2013). Tal ambiente protege as células de danos por fatores químicos e físicos promovidos pelo sistema imune, além de dificultar a penetração de diversos agentes antimicrobianos, promovendo infecções hospitalares relacionadas ao uso de cateteres, elevando índices de mortalidade e morbidade de pacientes e elevando os custos de permanência (STORTI, 2007; CERQUEIRA, 2013). A explicação deve-se aos biopolímeros presentes na matriz polimérica que garantem a adesão e coesão de células dos micro-organismos, protegendo as formas vivas da dessecação, oxidação por cátions metálicos, antibióticos e ação de luz ultravioleta. Além disso, essa estrutura passa a reter enzimas produzidas pelos micro-organismos garantindo um mecanismo acessório de digestão extracelular (FLEMMING, 2010).

Para detecção de biofilmes existem diversas metodologias, que vão desde o uso de corantes a quantificação de genes. Essas técnicas podem ser qualitativas ou quantitativas, sendo possível realiza-las sobre corpos de prova (PANTANELLA, 2013). Atualmente, um método de detecção de biofilme adequado, simples, rápido e de fácil realização ainda não é uma realidade no ambiente hospitalar. Principalmente porque as substâncias utilizadas como sanitizantes em boa parte não são totalmente eficazes e não indicam a presença de biofilmes (KIM, 2007). O desenvolvimento de um método para a detecção e biocida de biofilmes, de forma preventiva, é uma necessidade para uma ação corretiva pela equipe médica, a fim de garantir a correta higienização de matérias médico-hospitalares e impedir o desenvolvimento de biofilmes.

Sais imidazólicos de corantes azóicos e benzimidazóis fluorescentes surgem como possíveis candidatos a marcadores de biofilmes. Estudos indicam que a classe dos sais imidazólicos apresenta potencial atividade antifúngica por interferirem na relocação de ergosterol na membrana plasmática alterando a permeabilidade de membrana do microrganismo (SCHREKKER, 2013). Além disso, novas aplicabilidades vêm sendo propostas para os sais imidazólicos e substâncias fluorescentes devido as suas propriedades físicas que estão sendo exploradas com sucesso no desenvolvimento de sondas marcadoras, capazes de demonstrar a presença de determinadas biomacromoléculas (CHEN, 2011; LIU, 2013).

Portanto, o desenvolvimento de novos métodos de detecção e eliminação de biofilmes, que sejam acessíveis e de fácil realização, é de grande valia para os profissionais da área de saúde, pois garante uma detecção precoce de um possível agente causador de uma infecção. Neste trabalho foram testados compostos imidazólicos e benzimidazóis fluorescentes de forma a verificar a capacidade de detectar biofilmes de *Candida* spp. e ter atividade biocida. Trata-se de uma solução para esta lacuna tecnológica que presenciamos na área da saúde.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biofilme

O conjunto de microcolônias irreversivelmente aderidas de forma séssil sobre uma superfície, somado a uma matriz exopolimérica com substâncias sintetizadas por essa comunidade, define o que chamamos de biofilme, sendo tal estrutura forma uma proteção frente aos agentes antimicrobianos e defesas naturais do organismo (DONLAN & COSTERTON, 2002; COSTA, 2013).

Além da matriz extracelular fisicamente impedir a difusão de substâncias nocivas, existem outros mecanismos de proteção de biofilmes fúngicos, esses potencializam a resistência de biofilmes. Bombas de efluxo, são capazes de expulsar antifúngicos do interior de células impedindo sua ação. O aumento da síntese de ergosterol, compete e dificulta a ação de medicamentos inibidores de sua síntese. A resposta ao stress promove maior desenvolvimento da matriz polimérica (KUHN, 2002; CORDEIRO, 2015; TAFF, 2013). A regulação por um sistema de comunicação microbiana (QS) capaz de induzir, através de moléculas, a expressão de genes que determinam a quantidade de formação de biofilme e secreção de fatores de virulência, sendo um dos mais citados modelos é o da *Candida albicans*, na qual o farnesol atua como um modulador de desenvolvimento de biofilmes (CORDEIRO, 2015).

Diferentemente de células planctônicas (células de vida livre), o biofilme apresenta alta capacidade de resistência e diferença no crescimento. Quanto mais internalizadas as células no biofilme menos atividade elas possuem, sendo denominadas de latentes e apresentando maior resistência a agentes antimicrobianos que tem mais atividade contra micro-organismos em rápido crescimento (TAFF, 2013).

As etapas de formação do biofilme são divididas em adesão microbiana, seguida pela formação de colônias, formação de hifas, secreção de polímeros extracelulares e maturação do biofilme (Figura 1). A *Candida albicans* é uma das maiores causadoras de doenças sistêmicas e superficiais em ambientes hospitalares, sendo frequentemente associada a infecções por biofilmes em implantes médicos, o que gera problemas de morbidade, mortalidade e altos custos para o tratamento de pacientes (FLEMMING, 2010).

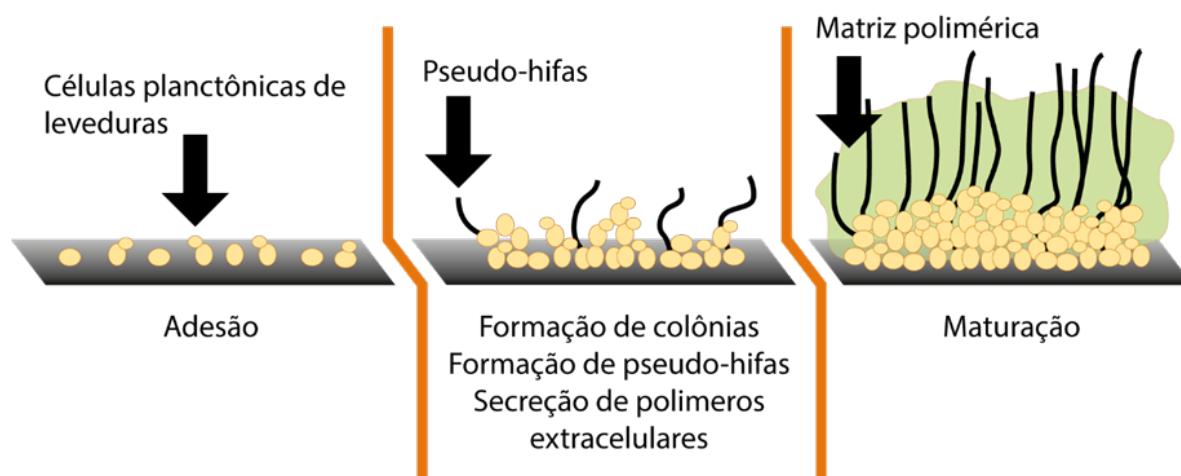


Figura 1. Esquema das etapas de formação de um biofilme de levedura.

Demais espécies como a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também são citadas em artigos científicos como formadoras de biofilme e causadoras de infecções hospitalares. Cepas de referência são citadas como boas produtoras de biofilmes, dentre elas estão a ATCC 750 (*C. tropicalis*), ATCC 18804 (*C. albicans*) e ATCC 22019 (*C. parapsilosis*), (ALNUAIMI, 2013; NEGRI, 2015).

Com o objetivo de reduzir os casos de infecção envolvendo biofilmes, diversos estudos estão sendo conduzidos verificando propriedades antifúngicas, de remoção do biofilme e atividade antibiofilme de substâncias. Além disso, a detecção atrelada a eliminação do biofilme apresenta-se como uma estratégia eficiente de controle microbiológico e prevenção em ambientes hospitalares (HIJNEN, 2012; BERGAMO, 2013).

2.2. Atividade de remoção e biocida contra biofilmes

Diversos estudos estão sendo conduzidos com a finalidade de tratar superfícies com substâncias e inibir a formação de biofilmes sobre as mesmas (atividade antibiofilme) (BERGAMO, 2015b; RAUT, 2015). Além disso, outros trabalhos focam na eliminação do biofilme sobre o material já contaminado com essa biomassa, isto é, substâncias capazes de remover estruturas do biofilme ou que apresentam atividade biocida (BERGAMO, 2015a).

No caso da atividade de remoção, busca-se retirar o biofilme sobre a superfície do corpo de prova. Tal ação é realizada por agentes físicos ou químicos que podem danificar células dos micro-organismos, eliminar a matriz do biofilme ou alterar estruturas do biofilme de forma a alterar a adesão permitindo sua remoção (HIJNEN, 2012; HOFER, 2015).

Um exemplo simples de removedores físicos são escovas de dente, que são projetadas e avaliadas para remoção de biofilmes sobre a superfície dentária, bem como de próteses móveis. Em estudos de Tan et al. (2014), através de microscopias eletrônicas de varredura foi possível verificar e mensurar a efetiva ação removedora de escovas de dente, neste caso foi observado uma redução e dano do biofilme de *Candida albicans* sobre a superfície de corpos de prova mesmo com o uso de uma escova de dente de baixo custo.

Diferentes substâncias podem ser utilizadas contra biofilmes com atividade antimicrobiana eliminando células viáveis ou interferindo na matriz dos biofilmes permitindo que os mesmos não se proliferem mais (atividade biocida). Compostos oxigenados, óleos essenciais e demais antifúngicos, como sais imidazólicos (SI) apresentaram atividade contra o biofilme de *C. tropicalis*, por exemplo e inclusive inibiram sua formação. Deste modo é possível a utilização destes como medicamento, na síntese de polímeros com propriedade antibiofilme, esterilização de locais e profilaxia (SCHREKKER, 2013; BERGAMO, 2015b).

2.3. Marcação de biofilme fúngico

Sondas e corantes capazes de marcar micro-organismos já são uma realidade. No caso das sondas, essas substâncias são capazes de marcar macromoléculas, com o uso de anticorpos e fluorescência. Diversos estudos estão sendo conduzidos com substâncias fluorescentes capazes de se intercalar no ADN de células, entre as bases nitrogenadas ou ligar-se a biomoléculas (PERIN, 2013). Além disso, os SI são potenciais antifúngicos relatados em trabalhos como bons marcadores macromoleculares (CHEN, 2011).

Em estudos de Chen et al. 2011, os líquidos iônicos foram capazes de emitir forte fluorescência quando excitados por luz de 315 nm de comprimento de onda, além disso formaram um complexo com hemoglobina sendo um possível candidato a marcador seletivo de macromoléculas. Outros trabalhos envolvendo certas substâncias fluorescentes demonstram uma capacidade peculiar das mesmas, a de se intercalar entre o DNA celular, ou seja, potenciais marcadores de micro-organismos (PERIN, 2013).

Além de substâncias fluorescentes, corantes como fucsina são usados como marcadores de biofilmes, sendo utilizados na odontologia para indicar locais onde placas bacterianas se depositam e indicar locais que podem ser higienizados com mais frequência com escovas dentais. Adicionalmente, nas últimas duas décadas, foram desenvolvidos métodos envolvendo computação e softwares para determinar a biomassa presente nessas marcações. Contudo, as substâncias utilizadas não apresentam capacidade desinfetante (HEYDORN, 2000; PARANHOS, 2004; SILVA-LOVATO, 2009). Outro corante capaz de marcar o biofilme produzido por micro-organismos é o azul de metileno. Em estudos de Tote et al., 2008 este corante vital foi usado com um indicador de biofilme bacteriano em testes com microplacas, por exemplo.

Outros corantes também surgem como potenciais marcadores de biofilme. O alaranjado II ou laranja ácido 7 em estudos envolvendo bicho da seda foi capaz de corar glândulas do inseto e por consequência a seda, sendo um potencial marcador biológico (NISAL, 2014). O indicador de pH alaranjado de metila também pode marcar seletivamente o biofilme fúngico, visto que fungos sobrevivem em ambientes com nutrientes ácidos, assim a mudança de cor seria possível para detecção do biofilme fúngico (SABNIS, 2010; BISHOP, 2013). O eriocromo T, um corante tipicamente utilizado em análises clínicas, também pode ser utilizado para marcação de células de leveduras (CORRY, 2011). Adicionalmente, é importante ressaltar que diversos artigos informam a capacidade de fungos em metabolizar todos esses corantes, o que eleva o potencial de marcação dos mesmos (KUMARI, 2015; RAMALHO, 2004).

2.4. Métodos de formação e remoção de biofilme

As técnicas de análise de biofilmes fúngicos quanto a formação, remoção e inibição são muitas vezes adaptações de métodos já descritos para biofilmes bacterianos. O crescimento de biofilmes de fungos leveduriformes e filamentosos é lento quando comparado com o de bactérias, por isso se faz necessário a modificação das técnicas de formação de biofilme. No caso de leveduras, o tempo ótimo de crescimento de biofilmes é de 96 horas para realização de testes com corpos de prova, sendo que em 48 h já é possível verificar a formação de matrizes em microscopia eletrônica de varredura (ENNETI, 2012; TAN, 2014).

Os métodos mais comumente usados são os que utilizam discos de cateteres como corpos de provas, microplacas de 96 poços e bandas de acrílico (BAILLIE & DOUGLAS, 1998; RAMAGE, 2001).

Modificações na técnica de formação de biofilme podem ser feitas para averiguar a capacidade antibiofilme ou de remoção de uma substância (BERGAMO, 2015a). Através de uma simples técnica envolvendo crescimento de micro-organismos em meio de cultura é possível verificar a viabilidade das células fúngicas após serem expostas a uma substância. Complementada com a microscopia eletrônica de varredura é possível inclusive afirmar se a substância apresenta atividade biocida ou antiaderente (TAN, 2014).

2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura para análise de biofilmes

A microscopia eletrônica de varredura é amplamente utilizada para análise de biofilmes, visto que pode ser feita uma análise da estrutura das células bem como detectar a presença de matrizes ou alteração das mesmas (JIANG, 2014; CHEW, 2015). Esta técnica baseia-se em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para verificar a superfície de uma amostra. Ponto a ponto, em linhas sucessivas, o sinal é transmitido a uma tela catódica, sendo a varredura sincronizada ao feixe incidente. A superfície da amostra recoberta com uma fina película condutora de ouro ou platina, quando o feixe de elétrons incide sobre a mesma provoca a emissão de fótons e

elétrons que são convertidos em sinal de vídeo. A interação do feixe incidente com a amostra resulta em uma imagem, pois o sinal recolhido regula o brilho dos pixels do monitor permitindo a observação. Tal microscopia deve ser realizada em vácuo total ou baixo vácuo por “*sputtering*”, garantindo uma imagem de alta qualidade em duas dimensões (DEDAVID et al., 2007).

2.6. Corpos de prova susceptíveis a formação de biofilme fúngico

No ambiente hospitalar os principais instrumentos cirúrgicos, mesas cirúrgicas e pias são produzidos com aço inoxidável 304. Outros materiais como silicões (polímeros) são utilizados para cateteres e tubos de traqueostomia, por exemplo. Portanto, tanto o aço inoxidável como alguns polímeros são os principais corpos de prova para análise de biofilmes que potencialmente se formam na rotina de um hospital (KIM, 2007; SAKIMURA, 2015).

Os corpos de provas podem ser testados de diversas formas como por exemplo superfícies metálicas que podem ser alteradas para impedir a formação de biofilmes através de “*coating*” com substâncias antibiofilme. Além disto, outros artigos relatam testes em superfícies com biofilmes e aplicação de desinfetantes que permitem a remoção e atividade biocida contra biofilmes. Em testes envolvendo derivados de amônios quaternários, peroxiácidos e álcoois, todos demonstraram-se mais eficientes contra células planctônicas do que contra biofilmes, demonstrando a importância da correta desinfecção de ambientes hospitalares, produção de alimentos, banheiros e etc. (KIM, 2007).

2.7. Sais imidazólicos e SI de corantes azólicos

Os SI (Figura 3) são derivados catiônicos do heterociclo imidazol, sendo comumente o resultado da alquilação dos dois nitrogênios heterocíclicos do imidazol neutro (Figura 2). Atualmente, os principais antifúngicos comercializados contêm um heterociclo azólico, incluindo o imidazol. Os fármacos que contêm um anel imidazólico são o econazol, fenticonazol, isoconazol, cetoconazol, miconazol, omoconazol,

oxiconazol, sertaconazol, bifonazol, butoconazol, clotrimazolsulconazol e tioconazol. Além disso existem os triazóis (albaconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, terconazol, voriconazol) e os tiazóis (abafungin) (KANAFANI & PERFECT, 2008). Estas substâncias atuam através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, responsável por converter lanosterol a ergosterol.

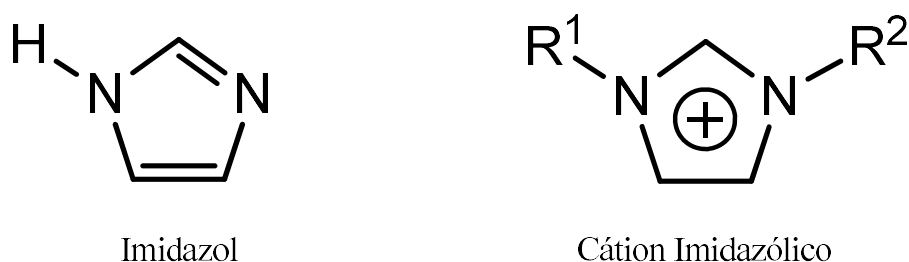


Figura 2. Estrutura do anel imidazólico e do derivado catiônico (SI).

Em comparação com os imidazóis, a atividade biológica dos SI foi pouco explorada. Neste contexto, os anéis imidazólicos já foram relacionados a atividade antitumoral e antimicrobiana (VERMA, 2013). Trabalhos já realizados pelo Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada e o laboratório TECNOCAT (Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) comprovam o grande potencial dos SI, bem como a segurança para uso com humanos através de testes “*in vitro*” de genotoxicidade realizados (SCHREKKER et al., 2013; DALLA LANA et al., 2015). Esses resultados iniciais mostram que novos estudos, principalmente envolvendo novos compostos com maior potencial antifúngico ou até mesmo que desempenhem mais de uma função como marcadores devem ser realizados. Diante da estrutura química dos sais imidazólicos que apresentam um ânion haleto e dos corantes que possuem um cátion metálico, existe a possibilidade de síntese de novos compostos através de uma reação de troca iônica, permitindo diversas combinações com potenciais corantes e antifúngicos, por exemplo.

Outra característica importante dos sais imidazólicos é que os mesmos apresentam caráter anfifílico (Figura 3), sendo potencialmente capazes de penetrar ou se interagir com maior facilidade pelas membranas celulares compostas de

fosfolipídios, por exemplo, permitindo alterações que levam a morte celular. Como necessariamente não estão no estado sólido, alguns desses sais podem estar na forma líquida a 100 °C, sendo, portanto denominados como Líquidos Iônicos (LI). Os LI que estão sendo amplamente estudados na síntese verde, como substitutos para solventes voláteis potencialmente tóxicos (DE LIMA, 2011).

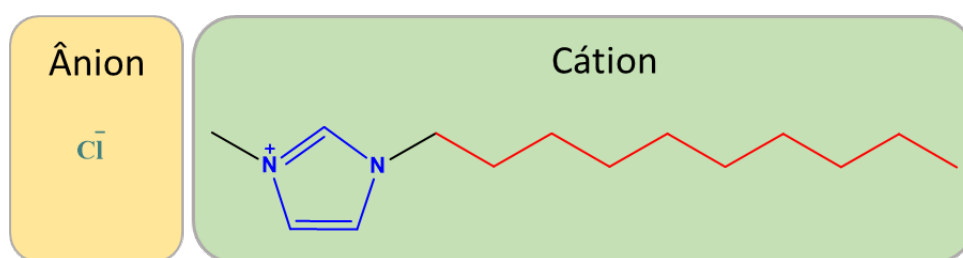
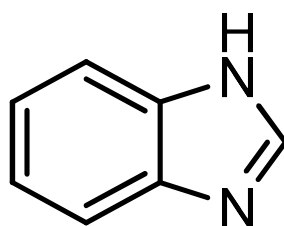


Figura 3. Estrutura química de um sal imidazólico (cloreto de 1-*n*-decil-3-metilimidazólico). Regiões hidrofílicas em azul e hidrofóbicas em vermelho.

2.8. Substâncias fluorescentes

Alguns estudos demonstram que substâncias fluorescentes são capazes de marcar diversas estruturas de biofilmes leveduriformes como matrizes, sendo verificadas *“in situ”* através de microscopia por fluorescência (JIM, 2005; KEPPLER-ROSS, 2008). Novos sensores como derivados de bezimidazol fluorescentes são citados como sondas capazes de identificar seletivamente íons metálicos como Cu^{+2} , que tem papel fundamental na ativação de enzimas dependentes deste íon. Além disso, podem detectar o íon S^{-2} , que forma com o hidrogênio o sulfeto de hidrogênio e em altos níveis gera efeitos nocivos as células. Sendo outra aplicação a detecção deste poluente em ambientes aquáticos (PAUL, 2015). A estrutura do benzimidazol como o nome já informa possui a característica de possuir um benzeno fundido com um imidazol (Figura 4), sendo os principais medicamentos com essa estrutura os antiparasitários como mebendazol e albendazol, além disso existem antifúngicos derivados de benzimidazóis como o Carbendazim que interfere na síntese de tubulina ao intercalar-se com a β -tubulina e por consequência impedir a síntese de microtubolos e a divisão celular (SCHMAHL, 1998; ZHANG, 2015; YANG, 2015). Recentemente um grupo de pesquisadores da Universidade de Zagreb identificaram e sintetizaram um

grupo de substâncias de derivados benzimidazólicos que apresentam fluorescência, são capazes de se intercalar com ADN, marcar células e ter certa atividade antitumoral (PERIN, 2013).



Benzimidazol

Figura 4. Estrutura genérica do benzimidazol

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi testar benzimidazóis fluorescentes (**NB1 a NB9**) e sais imidazólicos de corantes azóicos (**C₄MImErioCr**, **C₁₀MImMO**, **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₄MImMO**, **C₁₀MImORANGEII**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII**), de forma a identificar quais destes são capazes de marcar e apresentar atividade biocida contra biofilmes fúngicos leveduriformes, sobre superfícies inertes.

3.1. Objetivos específicos

- I. Determinar a concentração inibitória mínima, com ensaios de suscetibilidade, dos benzimidazóis fluorescentes e SI de corantes azóicos;
- II. Caracterizar a capacidade de derivados benzimidazólicos fluorescentes e sais imidazólicos em corar os micro-organismos para observação visual e através de microscopias Óptica e Fluorescente;
- III. Verificação do biofilme detectado pelas substâncias, através de análise por deposição dos benzimidazóis fluorescentes e SI de corantes azóicos sobre a superfície de corpos de prova;
- IV. Avaliar a toxicidade “*in vitro*” com testes de tripano azul dos benzimidazóis fluorescentes e SI de corantes azóicos para avaliação das suas futuras aplicações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o crescimento do biofilme sobre o corpo de prova que no presente trabalho eram placas de inox 304 cortadas a laser (5,0 por 7,5 cm) adquiridas da empresa INOXOPLASMA Ltda., distribuidora da Aperam Inox América do Sul S.A com laudo (em Anexo I) informando composição de cada placa. A escolha desse material permitiu a simulação da superfície de diversos dispositivos médico hospitalares, como instrumentos cirúrgicos, mesas de cirurgias e demais objetos metálicos. Posteriormente, esses corpos de prova com o biofilme foram expostos aos sais imidazólicos modificados e benzimidazóis fluorescentes verificando-se a capacidade de corar o biofilme e a atividade que apresentam contra este biofilme.

4.1. Cepas utilizadas

Foram utilizadas nove cepas no total, quatro ATCC's e cinco isolados clínicos do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da UFRGS, todas armazenadas na Faculdade de Farmácia da UFRGS. No quadro abaixo está a relação de *Candida* spp., seus códigos e suas respectivas origens (Tabela 1).

Tabela 1. Código, espécie e origem das cepas testadas.

Código	Espécie	Origem
ATCC 18804	<i>Candida albicans</i>	ATCC
ATCC 24433	<i>Candida albicans</i>	ATCC
CA01	<i>Candida albicans</i>	PNCq
ATCC 750	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC
950	<i>Candida tropicalis</i>	Aspirado traqueal
RL17	<i>Candida tropicalis</i>	Aspirado traqueal
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC
RL33	<i>Candida parapsilosis</i>	Urina
RL07	<i>Candida parapsilosis</i>	Hemocultura

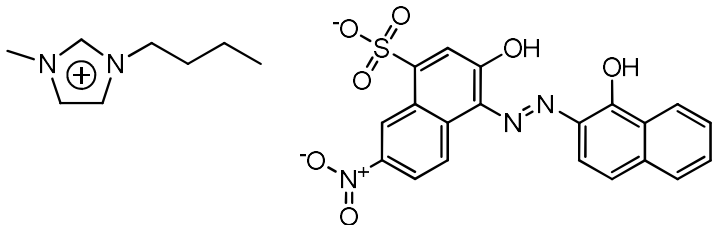
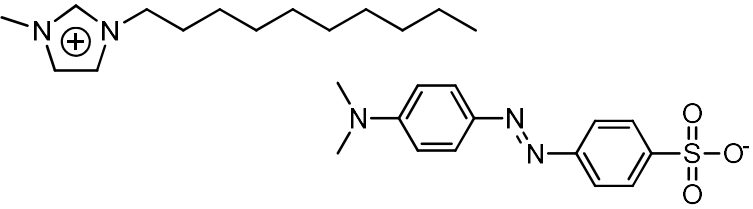
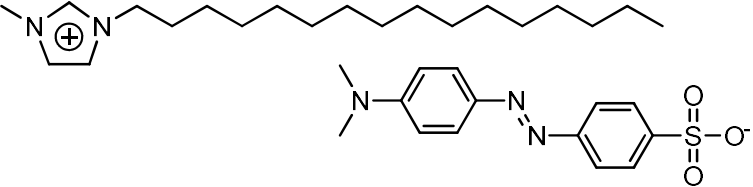
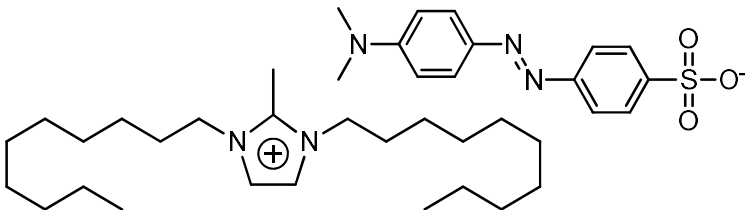
4.2. Formação do biofilme sobre corpo de prova

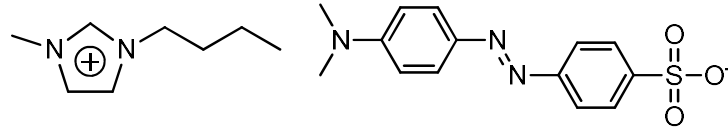
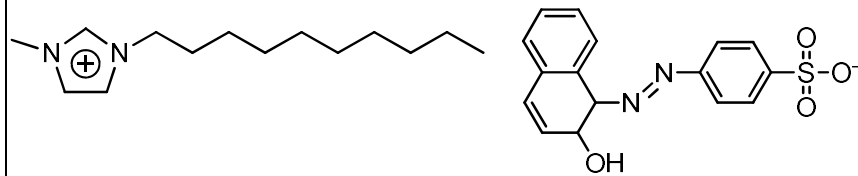
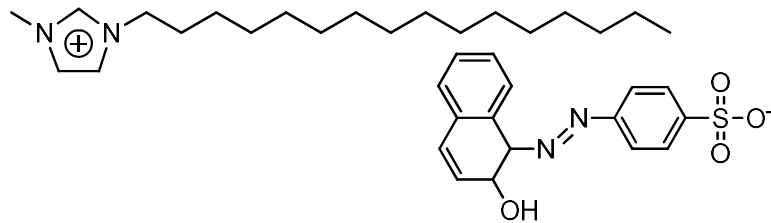
Neste procedimento foi produzida uma suspensão de 10^6 UFC/mL do micro-organismo a ser estudado e incubada em caldo TSB por um período de 24 h a 32 °C. Posteriormente, adicionou-se quantidade suficiente dessa suspensão (aproximadamente 1 mL) a 99 mL de água peptonada estéril, para que a solução final fosse de 10^6 UFC/mL obtendo assim a solução mãe para teste de formação de biofilme. A verificação foi feita por absorvância com colorímetro CO7500 Colorwave (marca Denville, Inglaterra). Nessa solução, os corpos de prova foram imersos e incubados a 32 °C, por um período de 96 h.

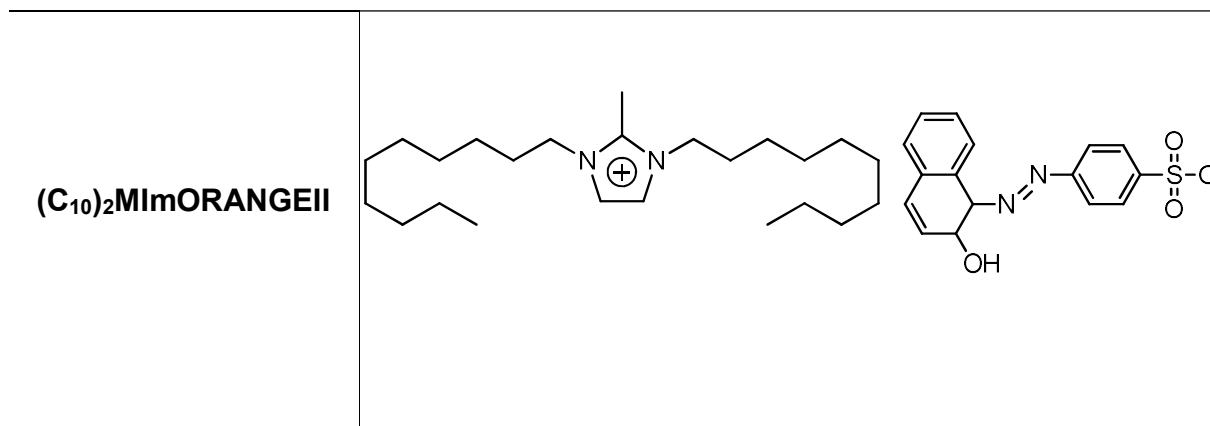
4.3. Síntese dos SI de corantes azóicos

A preparação dos SI foi realizada em conjunto com o Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise (TECNOCAT), no Instituto de Química da UFRGS. As reações envolvendo a síntese destes sais foram efetuadas em atmosfera inerte empregando-se a técnica dos tubos Schlenk/linha de vácuo. As reações de alquilação do metilimidazol para formação dos cátions imidazólicos desejados e de troca dos ânions com grupos cromóforos foram efetuadas de acordo com procedimentos descritos na literatura (SCHREKKER, 2008; WASSERSCHIED, 2008). Os SI de corantes azóicos (Tabela 2) foram produzidos através de uma troca iônica entre o SI que possuía um ânion cloreto e o corante que possui como cátion o sódio, resultando na produção do sal imidazólico com ânion corante e cloreto de sódio. Esses foram caracterizados por espectroscopia na região do RMN ^1H . Foram testados como ânions cromóforos dos corantes preto de eriocromo T, alaranjado II e alaranjado de metila a partir dos seus sais de sódio.

Tabela 2. Códigos e estruturas dos sais imidazólicos de corantes azóicos.

Código do SI	Fórmula Estrutural
C₄MImErioCr	
C₁₀MImMO	
C₁₆MImMO	
(C₁₀)₂MImMO	

C₄MImMO**C₁₀MImORANGEII****C₁₆MImORANGEII**



4.4. Benzimidazóis fluorescentes

Os benzimidazóis fluorescentes (Figura 5; Tabela 3) foram disponibilizados pela colaboração com a Universidade de Zagreb na Croácia e a síntese das substâncias está descrita no artigo de Perin et al. (2013). Todas essas substâncias foram diluídas em água com 2% de DMSO, sendo submetidas a ação do sonicador USC700 (marca Unique, Brasil) para permitir a solubilização do material.

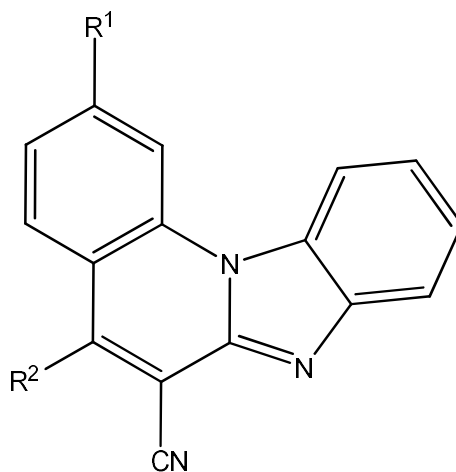
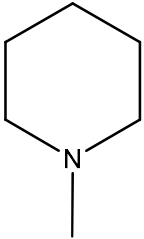
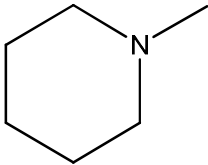
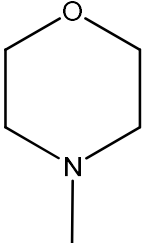
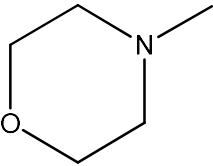
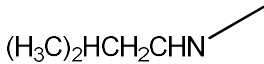


Figura 5. Estrutura genérica dos benzimidazóis fluorescentes

Tabela 3. Estruturas químicas dos benzimidazóis fluorescentes testados.

Código	R ¹	R ²	Nome
NB1		H	2-(piperidin-1-il)benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila
NB2	H		5-(piperidin-1-il)benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila
NB3		H	2-morfolinobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila

NB4	H		5- morfolinobenzo[4,5]imidazo[1, 2-a]quinolina-6-carbonitrila
NB5	$\begin{array}{c} \text{NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \end{array}$	H	2- (isobutilamina)benzo[4,5]imid azo[1,2-a]quinolina-6- carbonitrila
NB6	H	$(\text{H}_3\text{C})_2\text{HCH}_2\text{CHN}$ 	5- (isobutilamina)benzo[4,5]imid azo[1,2-a]quinolina-6- carbonitrila

NB7	$\begin{array}{c} \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \\ \end{array}$	H	2-((3-(dimetilamino)propil)amino)benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila
NB8	H	$(\text{H}_3\text{C})_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHN} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	5-((3-(dimetilamino)propil)amino)benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila
NB9	$\begin{array}{c} \text{NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \end{array}$	$(\text{H}_3\text{C})_2\text{HCH}_2\text{CHN} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	2,5-bis(isobutilamina)benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinolina-6-carbonitrila

4.5. Metodologia

Para a verificação de quais substâncias poderiam ser potenciais marcadores, ter atividade biocida ou de remoção de biofilmes, desenvolvemos uma proposta metodológica apresentada na Figura 5. Os ensaios foram seguidos de acordo com o fluxograma abaixo, sendo que cada teste era eliminatório, isto é, para ser aprovada uma substância deveria apresentar a capacidade de ser antifúngica (cepas serem suscetíveis), marcadora de células (microscopias revelarem coloração celular), indicadora e biocida contra biofilmes. Ao final destes testes temos uma substância capaz de marcar e ter atividade biocida contra biofilmes. Após era realizado o teste de toxicidade indicando se a substância era um possível sanitizante ou medicamento, e por fim a análise por MEV indicava o possível mecanismo de ação da substância.

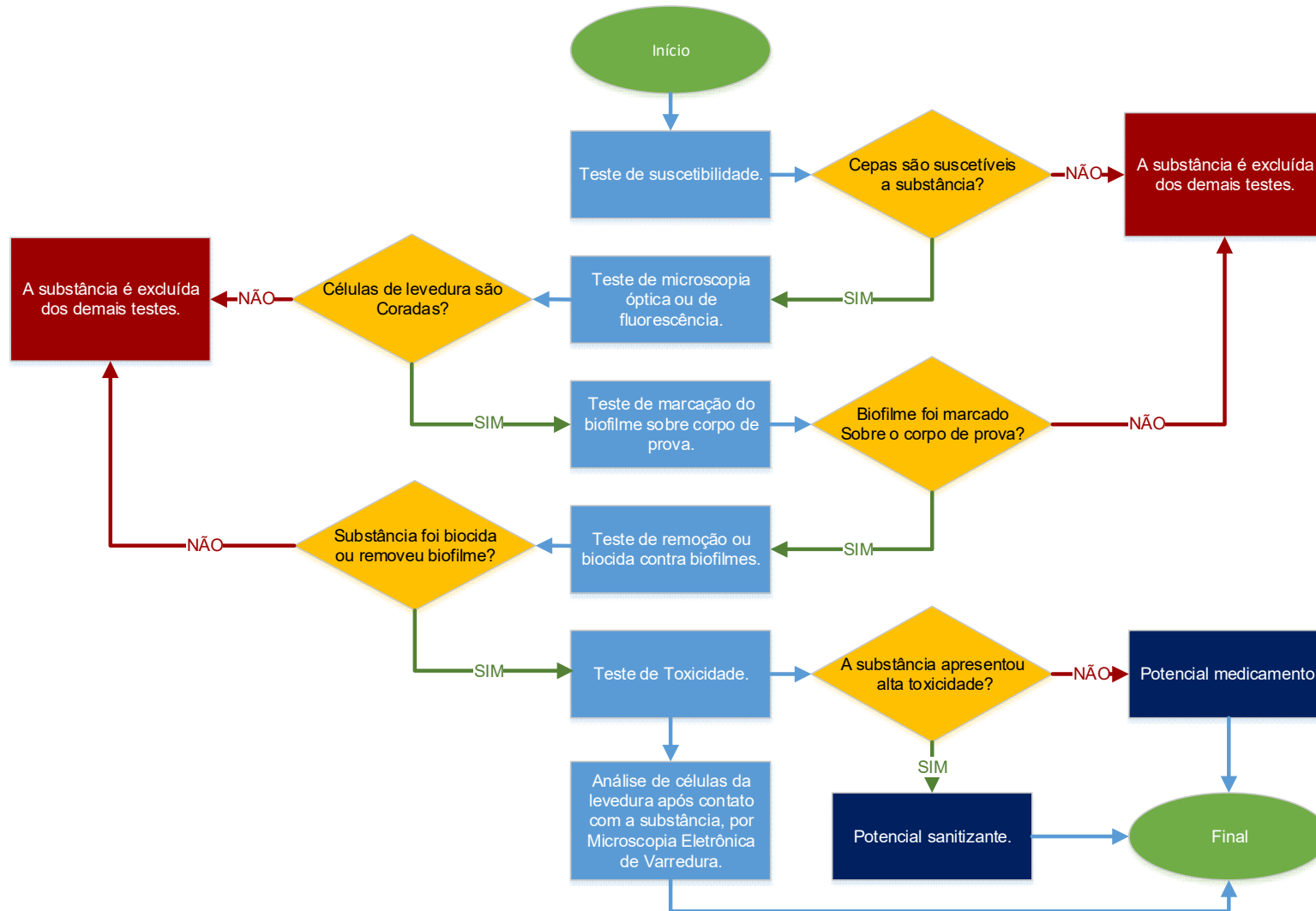


Figura 6. Fluxograma de testes realizados para benzimidazóis fluorescentes e sais imidazólicos com ânions azoicos corantes a fim de verificar a capacidade de ação biocida e de marcação contra biofilmes leveduriformes.

4.5.1. Teste de suscetibilidade

As substâncias produzidas foram diluídas em uma solução de água e DMSO a 2% na concentração de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para posteriormente ser realizado o método de microdiluição baseado na norma M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com 96 poços. A faixa de concentração utilizada para os testes foi de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram adicionadas na primeira coluna as soluções de sais imidazólicos, corantes ou substâncias fluorescentes a serem testadas ($200 \mu\text{L}$) e $100 \mu\text{L}$ removidas e diluídas de forma seriada até a décima primeira coluna. Adicionou-se o inóculo fúngico ($100 \mu\text{L}$) na microplaca na primeira até a décima primeira coluna. As placas foram incubadas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. O teste foi realizado em triplicata e a avaliação foi feita mediante leitura visual observando o crescimento ou não de aglomerados de células no fundo da cavidade de cada poço da microplaca.

4.5.2. Microscopia óptica e de fluorescência

Para este teste, $20 \mu\text{L}$ de uma suspensão de 10^6 UFC foram adicionados no centro de uma lâmina de vidro para microscopia, a qual foi colocada dentro de uma placa de Petri e incubada por 24 h a $32 \text{ }^\circ\text{C}$. As substâncias produzidas foram diluídas em uma solução de água e DMSO a 2% na concentração de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após, uma alíquota da substância a ser testada ($20 \mu\text{L}$) foi adicionada sobre as leveduras que cresceram na placa, uma lamínula foi adicionada e foi feita a verificação da coloração celular através da microscopia óptica e câmera de fotografia Canon T3i acoplada ou microscopia de fluorescência com o microscópio FLUO-3 da empresa Bel Photonics (Itália), no caso de a substância ter tal propriedade. Foi realizada, em triplicata, uma análise cinética, que consiste em verificar o aparecimento de coloração intracelular em até duas horas com fotos tiradas a cada dez minutos.

4.5.3. Marcação do biofilme sobre corpo de prova

Para este teste utilizamos placas de inox 304, que foram adquiridas da empresa INOXPLASMA e previamente expostas ao biofilme fúngico. Após a formação do biofilme, as substâncias foram borrifadas sobre a superfície de inox 304 com biofilme a ser verificado. Primeiramente, formou-se o biofilme sobre o corpo de prova, no caso uma placa de aço inox 304 com dimensões de 5,0 por 7,5 cm, utilizando cepas ATCC já estudadas e sabidamente formadoras de biofilme (ALNUAIMI, 2013; NEGRI, 2015). A formação do biofilme foi realizada com o corpo de prova sendo imerso em suspensão de 10^6 UFC/mL e depois da incubação por 96 h e 32 °C este foi removido já com o biofilme fúngico sobre a superfície. Após, substâncias produzidas foram diluídas em uma solução de água e DMSO a 2% na concentração de $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, a substância a ser testada foi borrifada quatro vezes até cobrir toda a superfície do corpo de prova, sendo feita uma análise por 2 h. No caso de substâncias fluorescentes, foi utilizada uma lâmpada UV com comprimento de onda de 254 nm (Figura 7). Para teste controle utilizamos uma placa de inox 304 imersa por 96h em água peptonada estéril a 32°C sem formação de biofilme sobre.

Sobre o corpo de prova é borrifado o corante fluorescente ou composto imidazólico e após é vertido 20mL de água para retirar excesso do corante e células planctônicas

É verificado se a substância é capaz de corar o biofilme, no caso de substâncias fluorescentes é usada uma lâmpada UV



Figura 7. Esquema ilustrando teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com substância fluorescente.

4.5.4. Atividade de remoção ou biocida contra biofilmes

Este teste foi realizado baseado no artigo de Bergamo et. al 2015b apresentando adaptações. É dividido em duas partes, sendo a primeira a verificação da remoção do biofilme e a segunda parte a confirmação de uma possível atividade biocida. Na primeira parte a placa de aço inox 304 com biofilme já previamente formado foi lavada com 20 mL de água para remoção de células planctônicas e imersa na solução contendo a substância a ser testada, pelo tempo de 15 seg., 2 h, 24 h e 48 h. Uma alíquota de 20 µL foi removida e inoculada em ágar sabouraud, bem como foram realizadas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} as quais foram removidos 20 µL e inoculadas em ágar sabouraud. Simultaneamente foi realizado o mesmo teste, contudo com água peptonada no lugar da substância sendo utilizada como Controle.

A próxima parte do experimento consistiu em uma continuação da primeira, ou seja, a placa de inox com o biofilme foi retirada do meio com a substância após o tempo determinado e imersa em água peptonada, sendo exposta a ação de um ultrasonicador por 10 min de forma a remover o biofilme fúngico remanescente. Da mesma forma que no primeiro passo foram inoculados em ágar alíquotas não diluídas e diluídas do meio em que a placa se encontra. As alíquotas foram inoculadas em triplicata e as unidades formadoras de colônias foram contadas após serem incubadas por 24 h e 32 °C. O teste Controle foi realizado nesta etapa do teste também. No caso de ser uma substância com atividade removedora na primeira parte foram contadas as células e comparadas com a remoção do Controle, na segunda etapa foram contadas as células provenientes de um biofilme não removido (Figura 8).

No caso de nem na primeira e nem na segunda parte do experimento serem contadas UFC, podemos considerar que a substância apresentou atividade biocida quando comparada ao Controle. A partir da contagem de colônias, os resultados obtidos no teste do biofilme foram convertidos a UFC/cm², sendo estes resultados convertidos em log.

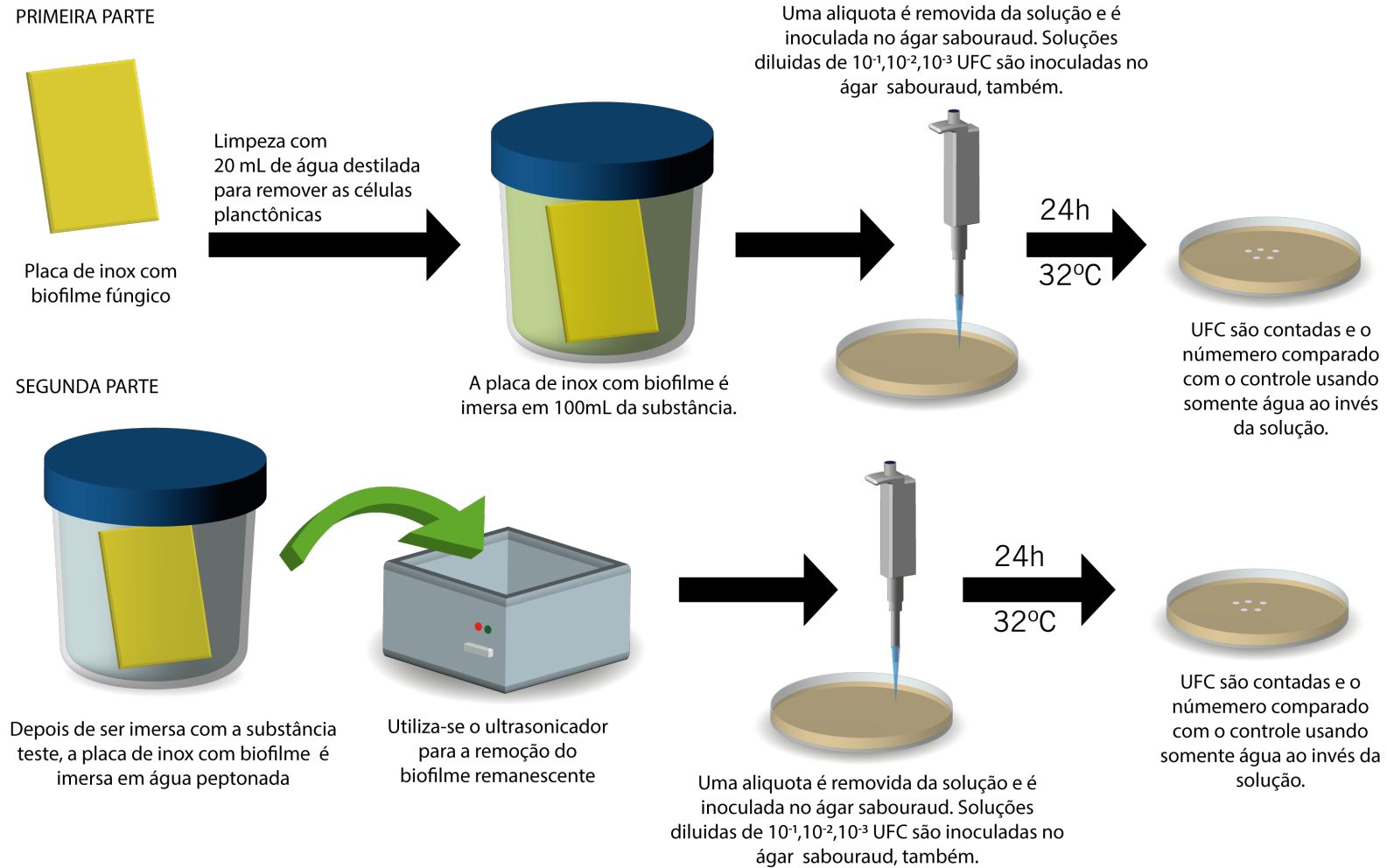


Figura 8. Esquema ilustrando teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com substância benzoazólica fluorescente.

4.5.5. Teste de toxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado na Universidade Federal do Pampa em colaboração com o professor Dr. Luis Flávio Souza de Oliveira. Para a análise de citotoxicidade foi preparada primeiramente uma suspensão de leucócitos. As culturas de linfócitos foram preparadas utilizando uma mistura de linhagens celulares de Linfócito B (SU-DHL-4) e de Linfócito T (MJ [G11]). As células foram imediatamente transferidas para o meio de cultura contendo 10 mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina / penicilina, conforme descrito em trabalho prévio do nosso grupo (SANTOS MONTAGNER et al., 2010). As células foram colocadas em estufa a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ por 72 horas. A seguir, à essa solução de leucócitos foi exposta a substância a ser testada por 3 h. Então a solução de azul de Tripano foi adicionada e seguida pela análise microscópica que verifica a viabilidade e proliferação celular. Células viáveis tornaram-se transparentes e mortas coradas de azul, isto porque a membrana celular quando intacta impede a entrada do corante (GÜEZ, 2012; AVELAR-FREITAS, 2014). Para calcular o valor aproximado do IC50 da substância foram plotados os pontos da porcentagem de viabilidade celular pela concentração do antifúngico sendo definida por regressão linear a equação do gráfico e calculado o valor (ROCHA DE SOUZA, 2007).

4.5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Diante da Microscopia Eletrônica de Varredura envolver o uso de vácuo, foi necessário a preparação da amostra. Visto que isto pode provocar o colapso das estruturas de biofilme, é essencial a desidratação da amostra, que deve ser executada de forma correta para evitar alterações na estrutura do biofilme. Além disso, existe a necessidade de cobrir a amostra com película de ouro ou platina (PANTANELLA et al. 2013).

A MEV é capaz de determinar qual a forma de ação da substância utilizada, isto é, através das imagens é possível supor qual atividade sobre o biofilme ela tem. Assim é possível verificar qual a atividade da substância sobre as células e biofilme fúngico, como, por exemplo, analisar a atividade de remoção de escovas de dente, como

explorado por Tan et al. 2014, em que se observava a capacidade física de remoção através de diversas imagens obtidas por MEV. Sendo feito através da análise das estruturas da matriz polimérica ou destruição celular, após o contato com uma substância, por exemplo. Foi realizada utilizando a cepa de *C. albicans* ATCC 18804. Primeiramente, o biofilme foi formado sobre uma lamínula de vidro por 48 h a 32 °C, após foi tratado com a substância, no caso o **NB7** por 1 min. e 1 h. Biofilme sem tratamento com a substância foi utilizado como controle. Depois de incubado novamente, células planctônicas foram removidas por três lavagens com 0,1 M de cacodilato. A lamínula com o biofilme restante foi imersa em solução de 2,5% de gliceraldeído e 0,1 M de cacodilato e incubada a temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram desidratadas com concentrações seriadas de álcool (30, 50, 70, 95 e 100 % v/v) e secas até o ponto crítico utilizando CO₂ no estado supercrítico. As amostras foram recobertas com ouro e visualizadas com microscópio MA-10 Carl Zeiss.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes de suscetibilidade

Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC) para as substâncias testadas, descartando as substâncias que não obtiveram ação antifúngica. Dentre as substâncias testadas, os SI mantiveram a atividade antifúngica mesmo após estarem combinados com ânions azóis corantes. No caso do teste para determinar o MIC com corantes alaranjado II, alaranjado de metila e negro de eriocromo T, somente o Negro de Eriocromo T apresentou bons resultados contra os isolados leveduriformes testados. Contudo, o eriocromo T comercial apresentou muitas impurezas evidenciadas pela análise por ressonância magnética nuclear e, como consequência, não foi considerado para a continuação deste estudo. Das substâncias testadas, as substâncias que apresentaram atividade contra todas as espécies testadas foram a **NB7**, **negro de eriocromo T**, **C₄MImErioCr**, **C₁₀MImMO**, **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₁₀MImORANGEII**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII**.

Os SI já citados como agentes antibiofilme em publicações recentes do grupo (BERGAMO, 2015a) e testados neste trabalho na forma de SI de corantes azóicos mantiveram propriedades antifúngicas. O SI **C₄MImMO** não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma cepa testada. Já o **C₁₀MImORANGEII** inibiu o desenvolvimento do fungo para praticamente todas as cepas excluindo-se a *C. albicans* CA01, um isolado clínico que apresentou resistência. Da mesma forma o **C₁₀MImMO** também foi eficaz contra várias cepas, excluindo-se as *C. albicans* CA01 e ATCC 24433. Os SI **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII** tiveram atividade contra todas as cepas. É possível observar que os SI com menor tamanho de cadeia do cátion foram menos efetivos contra todas as cepas, isto pode ser devido a estrutura com cadeias maiores e ter maior capacidade de interagir com a membrana celular de fungos gerando dano celular, além disso uma maior cadeia de carbonos torna a molécula apolar podendo permitir maior ação sobre estruturas celulares do fungo (SOLOMONS, 2003; BERGAMO, 2015a; SCHREKKER, 2013).

Das substâncias fluorescentes, a **NB7** apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, a **NB8** apresentou atividade contra praticamente todas as

cepas excluindo-se a *C. albicans* ATCC 18804 e *C. parapsilosis* RL33. O benzimidazol **NB6** apresentou atividade somente contra duas cepas, a *C. tropicalis* ATCC750 e a 950. Os outros benzimidazóis fluorescentes não tiveram nenhuma atividade contra as cepas testadas. O fato do benzimidazol **NB7** apresentar atividade antifúngica corrobora com os resultados de Perin et al. (2013), visto que esse estudo avaliou as substâncias fluorescentes incluindo a **NB7**. Verificando que esta pode se intercalar no ADN de células eucarióticas e por consequência possuir atividade antitumoral, mesmo mecanismo que pode explicar a atividade antifúngica verificada nesse estudo bem como a capacidade de marcação e revelação de células fúngicas e conseqüentemente do biofilme.

As demais substâncias com fluorescência apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra as cepas testadas e não solubilizaram adequadamente, o que pode ter impossibilitando a ação esperada, já o **NB7** apresentou excelente solubilidade, assim como o **NB8** que teve ação contra diversas cepas. Uma explicação plausível para a maior solubilidade das substâncias **NB7** e **NB8** em 2% de DMSO e água se comparada com as demais deve-se ao fato dessas substâncias apresentarem grupos aminas secundárias e terciárias o que permite maior interação com a água, formando ligações com pares de elétrons do nitrogênio e hidrogênio. Conferindo, portanto, maior polaridade a molécula e por consequência maior solubilidade nessa solução se comparada com as demais moléculas (SOLOMONS, 2003; VOLLHARDT, 2013; WADE, 2013). É possível verificar na Figura 4 e Tabela 3 que a diferença entre **NB7** e **NB8** é somente a mudança de posição de uma cadeia de R¹ para R², o que não altera a solubilidade, devido manutenção das aminas secundárias e terciárias, mas reduz a atividade contra as leveduras.

Tabela 4. Suscetibilidade de nove cepas frente as substâncias testadas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.


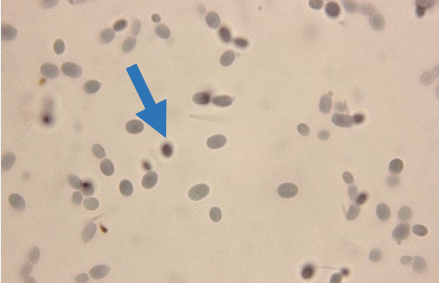

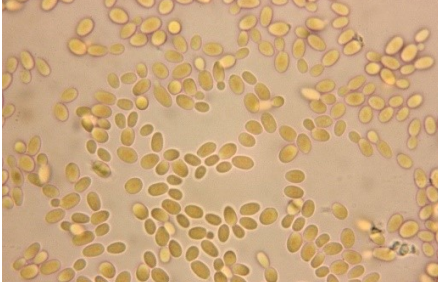


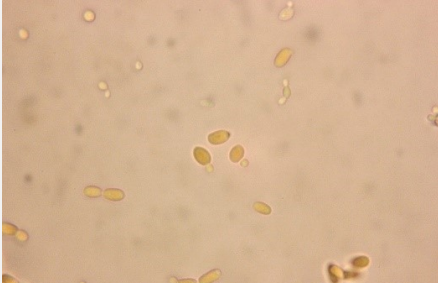


Cepas Substância	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>C. albicans</i> (Isolado clínico) CA01	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. tropicalis</i> 950	<i>C. tropicalis</i> (Isolado clínico) RL17	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i> RL33	<i>C. parapsilosis</i> RL07
Negro de Eriocromo T	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
C₄MImErioCr	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
C₁₀MImMO	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	sem atividade	sem atividade	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
C₁₆MImMO	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
(C₁₀)₂MImMO	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
C₁₀MImORANGEII	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	sem atividade	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
C₁₆MImORANGEII	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
(C₁₀)₂MImORANGEII	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
NB6	sem atividade	sem atividade	sem atividade	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	sem atividade	sem atividade	sem atividade	sem atividade
NB7	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
NB8	sem atividade	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	sem atividade	sem atividade

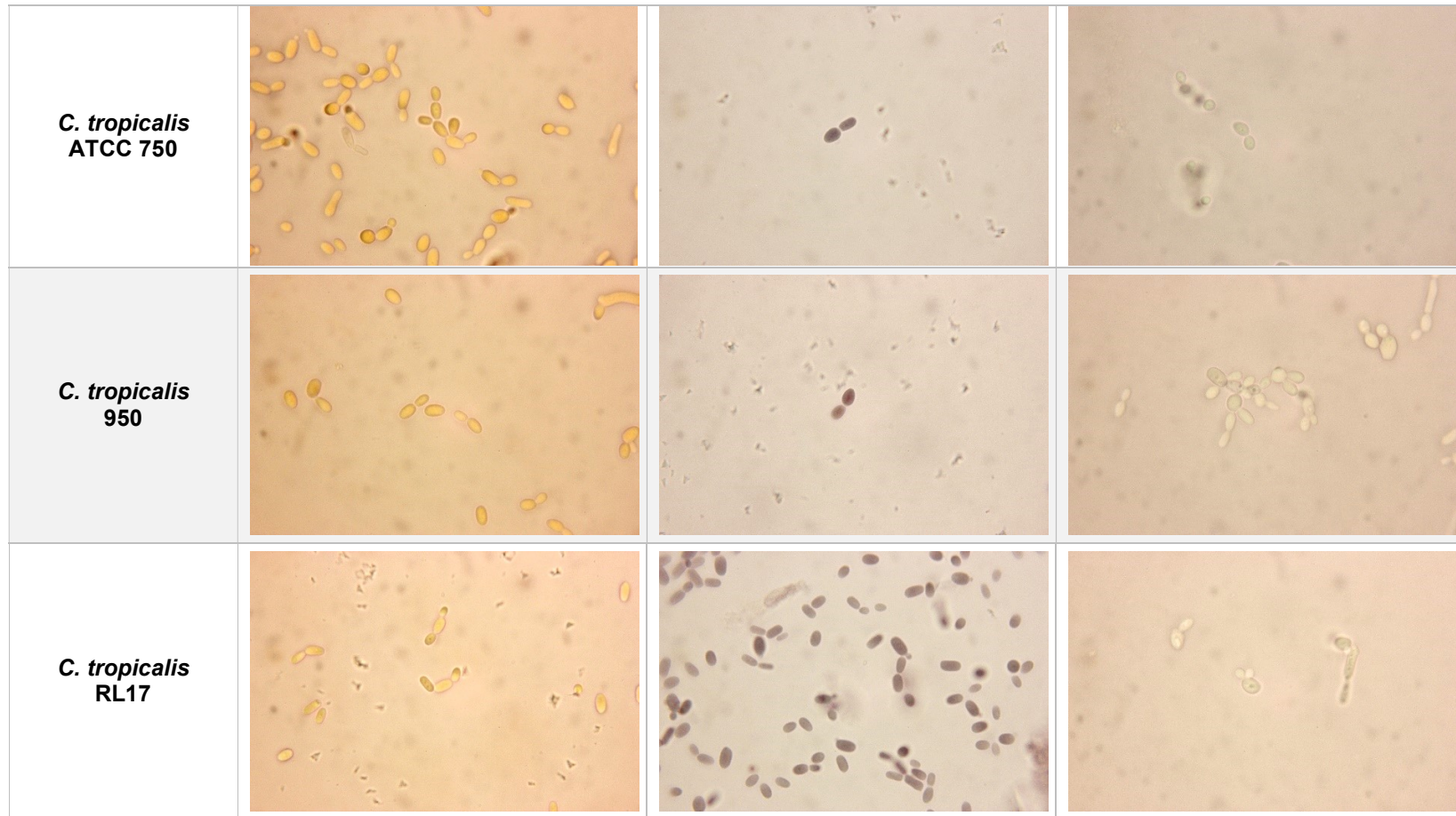
5.2. Microscopia óptica e de fluorescência

5.2.1. Microscopia com corantes

Para fins de comparação, os corantes puros foram testados previamente na concentração de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em contato com as cepas. Os resultados demonstraram que somente o corante alaranjado II e negro de eriocromo T foram capazes de marcar as células fúngicas antes da transformação em SI de corante azóico. É possível observar na Figura 9 que partes das células de todos os isolados foram marcadas com os corantes com a exceção de quando se utilizava o alaranjado de metila que não foi capaz de marcar o interior das células de leveduras. Tal fato é possivelmente devido a capacidade de penetrar nas células dos corantes, fato comprovado pela utilização do alaranjado II para corar células e tecidos (SABNIS, 2010).

Em diversos estudos já realizados com corantes na forma pura, os mesmos já apresentavam a capacidade de serem absorvidos e degradados por leveduras (KUMARI, 2015). Buscava-se biorremediar rejeitos da indústria têxtil com o uso de micro-organismos. Assim, corantes com grupos azo incluindo o alaranjado de metila e o alaranjado II, além de outros como o eriocromo T foram submetidos a ação de diferentes fungos e bactérias. O fato de fungos serem capazes de metabolizar os corantes pode explicar os resultados encontrados, visto que esses corantes foram capazes de indicar células fúngicas, com exceção somente do Alaranjado de Metila.

Espécie	Alaranjado II	Eriocromo T	Alaranjado de Metila
<i>C. albicans</i> ATCC 18804			
<i>C. albicans</i> ATCC 24433			
<i>C. albicans</i> ATCC CA01			



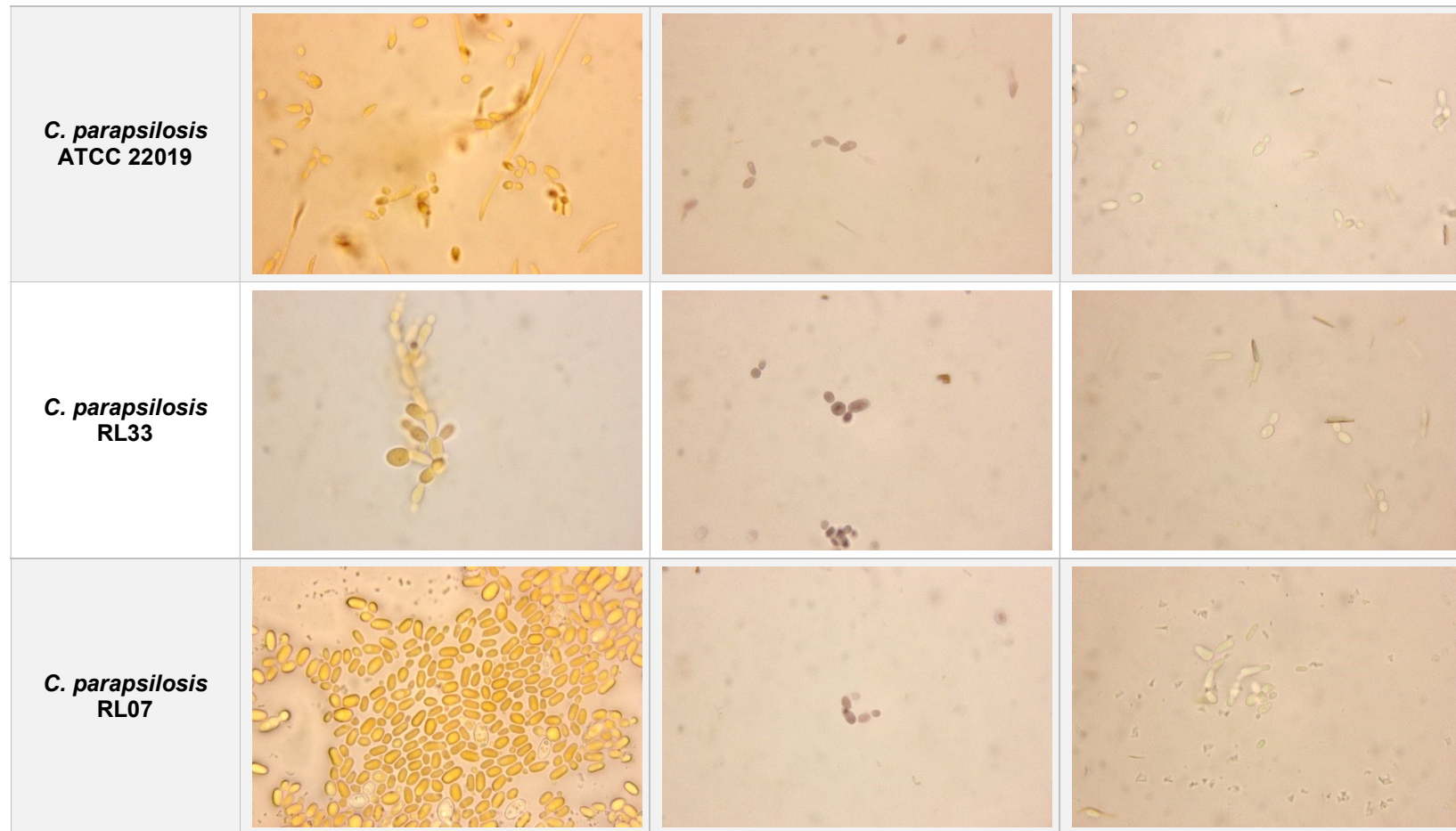


Figura 9. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade dos corantes em marcar células fúngicas em microscopia óptica. Flecha verde mostra mudança de coloração de células com o uso do corante alaranjado II e flecha azul, mudança de coloração de células com corante Negro de Eriocromo T.

5.2.2. Microscopia com sais imidazólicos de corantes azóicos

Nos testes com os SI de corantes azóicos, as amostras foram mantidas por 2 h em análise sendo que só após esse tempo era possível observar certa coloração no interior de células quando utilizado o SI **C₁₀MImORANGEII**. Os outros compostos não apresentaram mudança na coloração intracelular, muito menos nas membranas. Nas imagens abaixo temos a marcação celular das três cepas ATCC, após o tempo de 2h quando se utilizava o SI com ramificação de dez carbonos e com o ânion azóico o corante alaranjado II (Figura 10). Já os demais compostos não foram capazes de marcar células fúngicas como é possível verificar nas Figuras 11, 12, 13, 14 e 15.

O SI **C₁₀MImORANGEII** foi capaz de manter a propriedade de marcação do alaranjado II, sendo que após 2 h de verificação em microscopia era possível observar mudanças na coloração do interior das células das cepas. Outros sais contendo os cátions **C₁₆MIm** e **(C₁₀)₂MIm** e Alaranjado de metila também apresentaram atividade antifúngica, mas não foram capazes de corar as células. O **C₁₀MImMO** não foi capaz de corar as células, até porque o alaranjado de metila na sua forma pura já não tinha atividade de marcação sobre as células fúngicas. O aumento da cadeia lateral dos cátions de SI com corantes azóicos representou uma queda na capacidade de corar células o que permite inferir que o tamanho do SI de corante azóico possa ter interferido na capacidade de penetrar na célula e marcar suas estruturas, ou até mesmo que o aumento da cadeia de hidrocarbonetos possa ter promovido mudança na polaridade da molécula e impedido a ação esperada (SOLOMONS, 2003).

Esperava-se que o SI com ânion corante contendo um cátion com atividade antifúngica, teria maior capacidade de interagir com a membrana ou até mesmo penetrar nas células sendo a revelação de biofilmes potencializada, contudo talvez pelo tamanho molecular, estruturas com ramificações maiores, com 16 a 20 carbonos, não foram capazes de marcar células e por consequência os biofilmes, entretanto, mantiveram sua atividade antifúngica. O único composto capaz de marcar as células fúngicas em microscopia ótica, após 2h de análise, foi o com cátion com ramificação de dez carbonos e corante alaranjado II como ânion.

Contudo, em testes para detecção de biofilme diretamente sobre corpo de prova, o SI **C₁₀MimORANGEII** não foi capaz de indicar as regiões onde o biofilme encontrava-se, mesmo em altas concentrações. Uma possível explicação está no fato do biofilme possuir uma matriz polimérica formada por proteínas, lipídios e que pode ter impedido a penetração desse SI por essa barreira física impedindo a marcação de células fúngicas (COSTA, 2013).

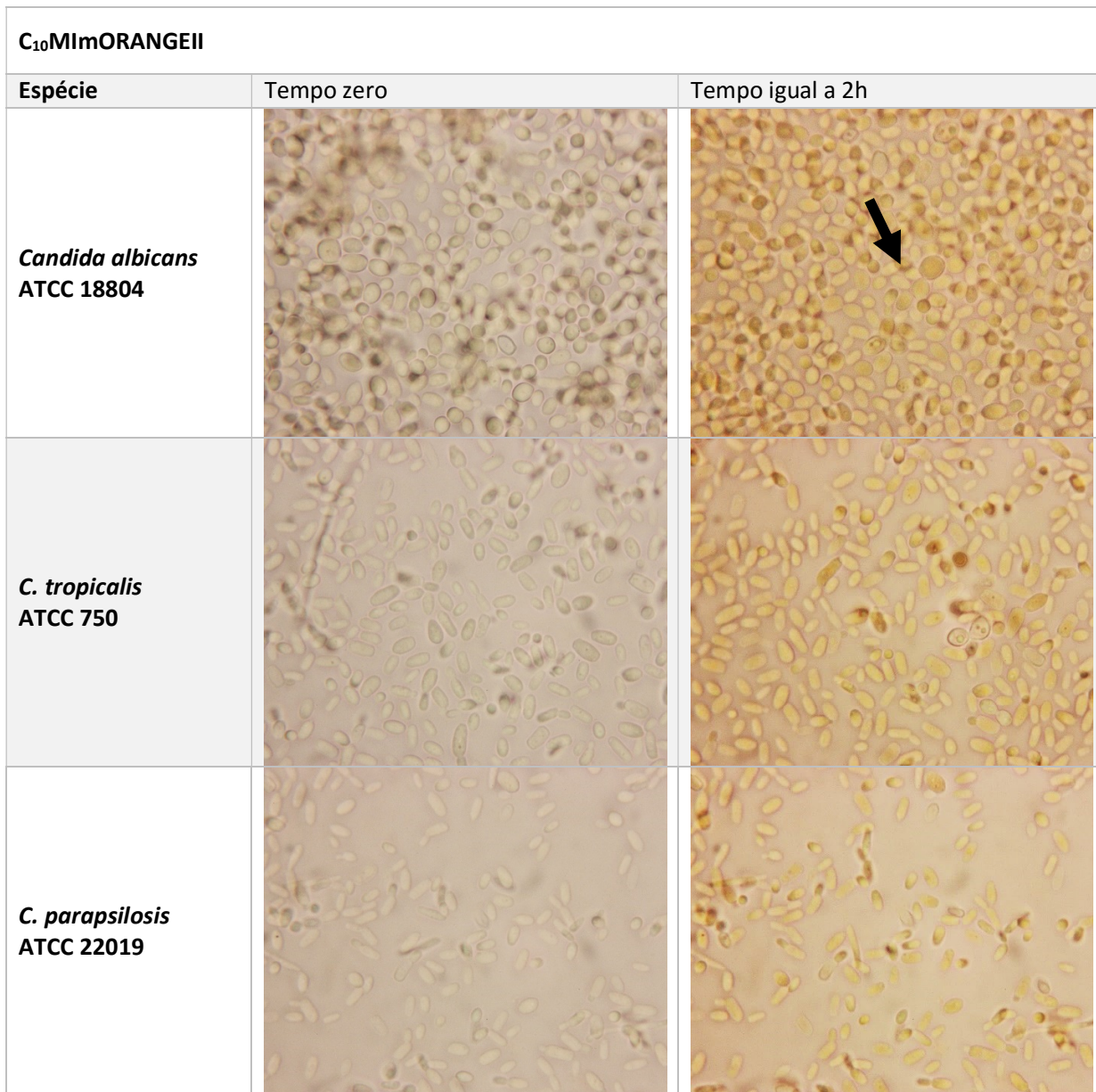


Figura 10. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Observa-se mudança de coloração após 2h (flecha preta). Cátion com o sal imidazólico **C₁₀MIm** e ânion com corante Alaranjado II.

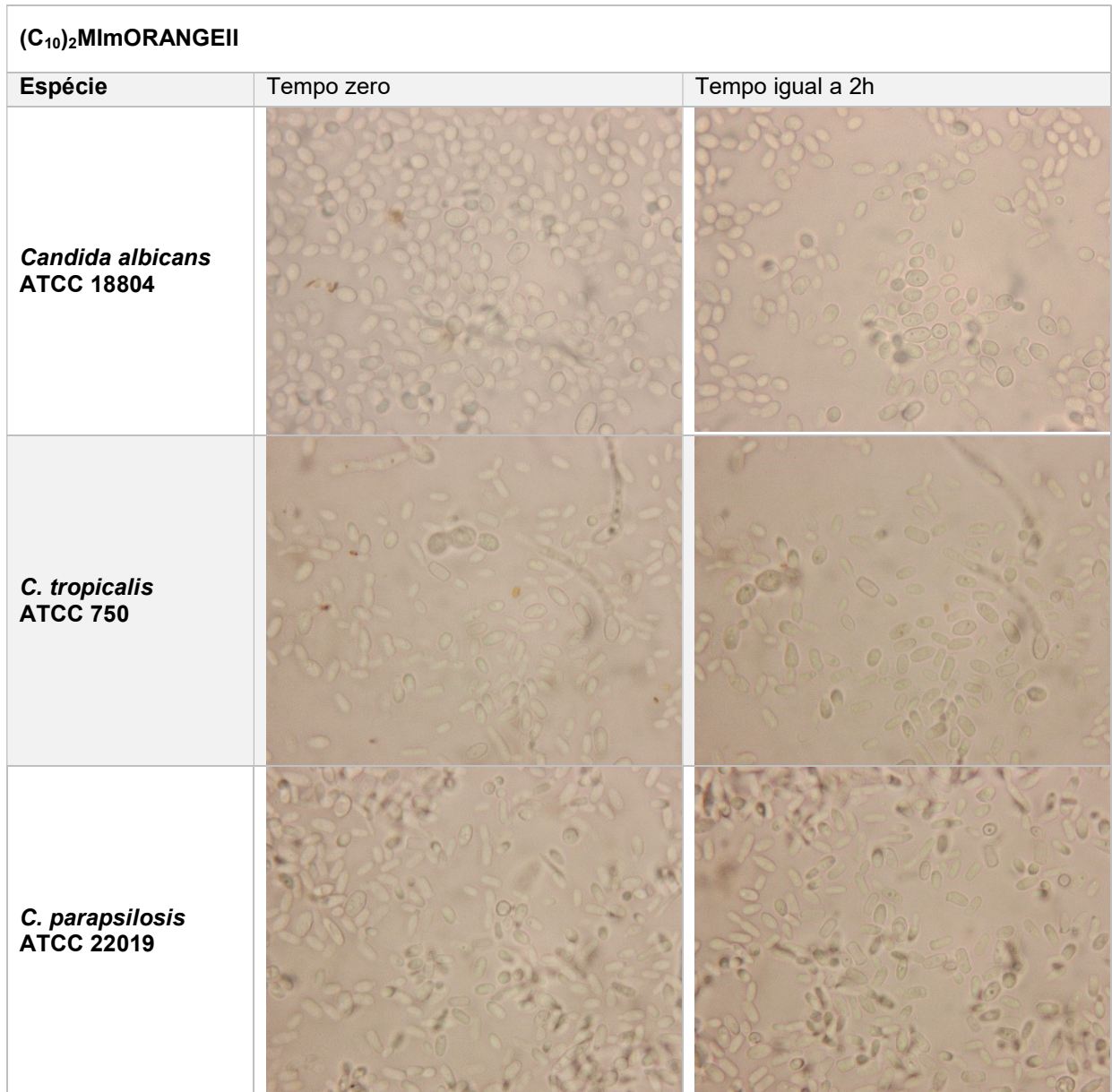


Figura 11. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico (C₁₀)₂MIm e ânion com corante Alaranjado II.

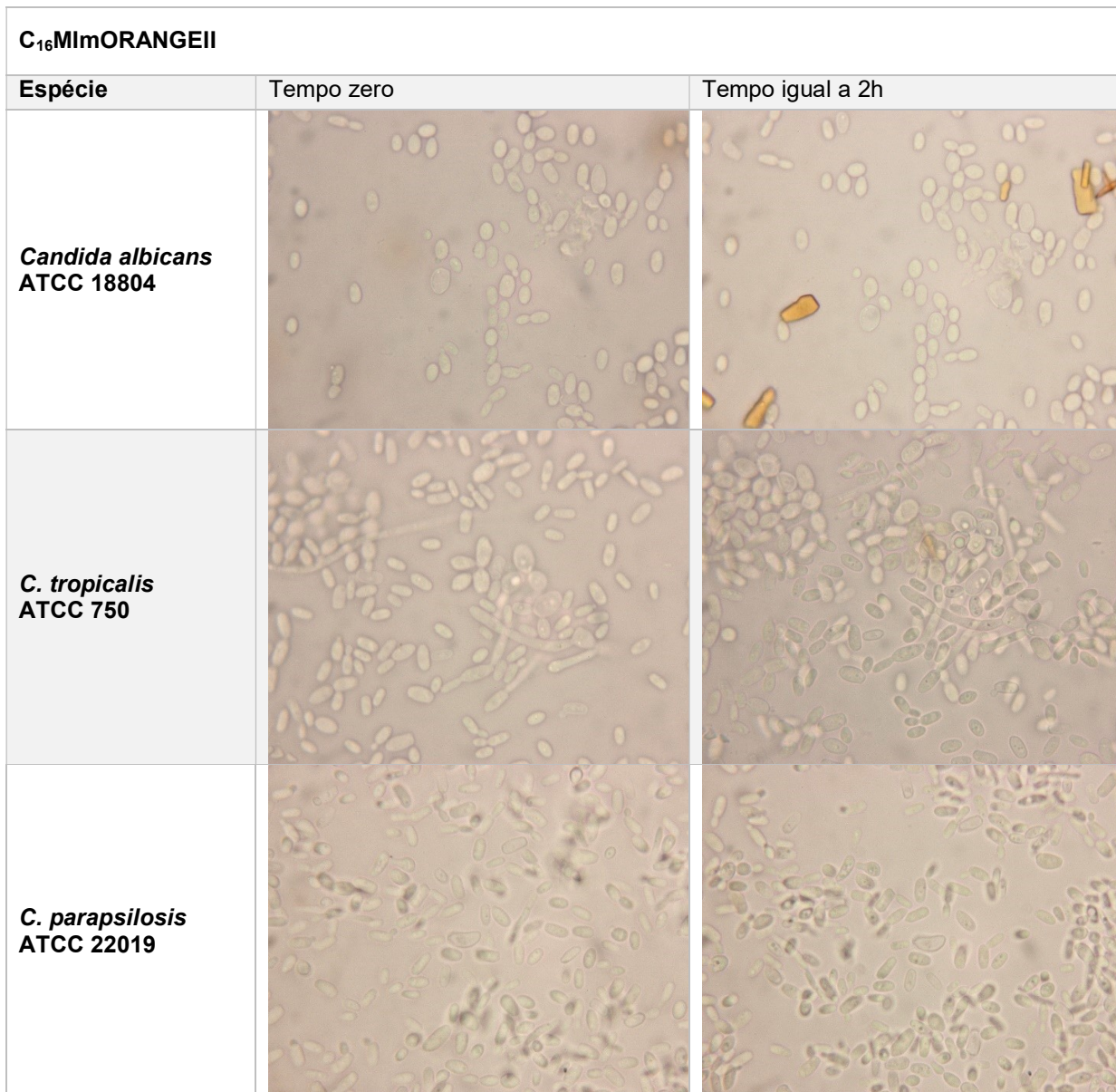


Figura 12. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico **C₁₆MIm** e ânion com corante Alaranjado II.

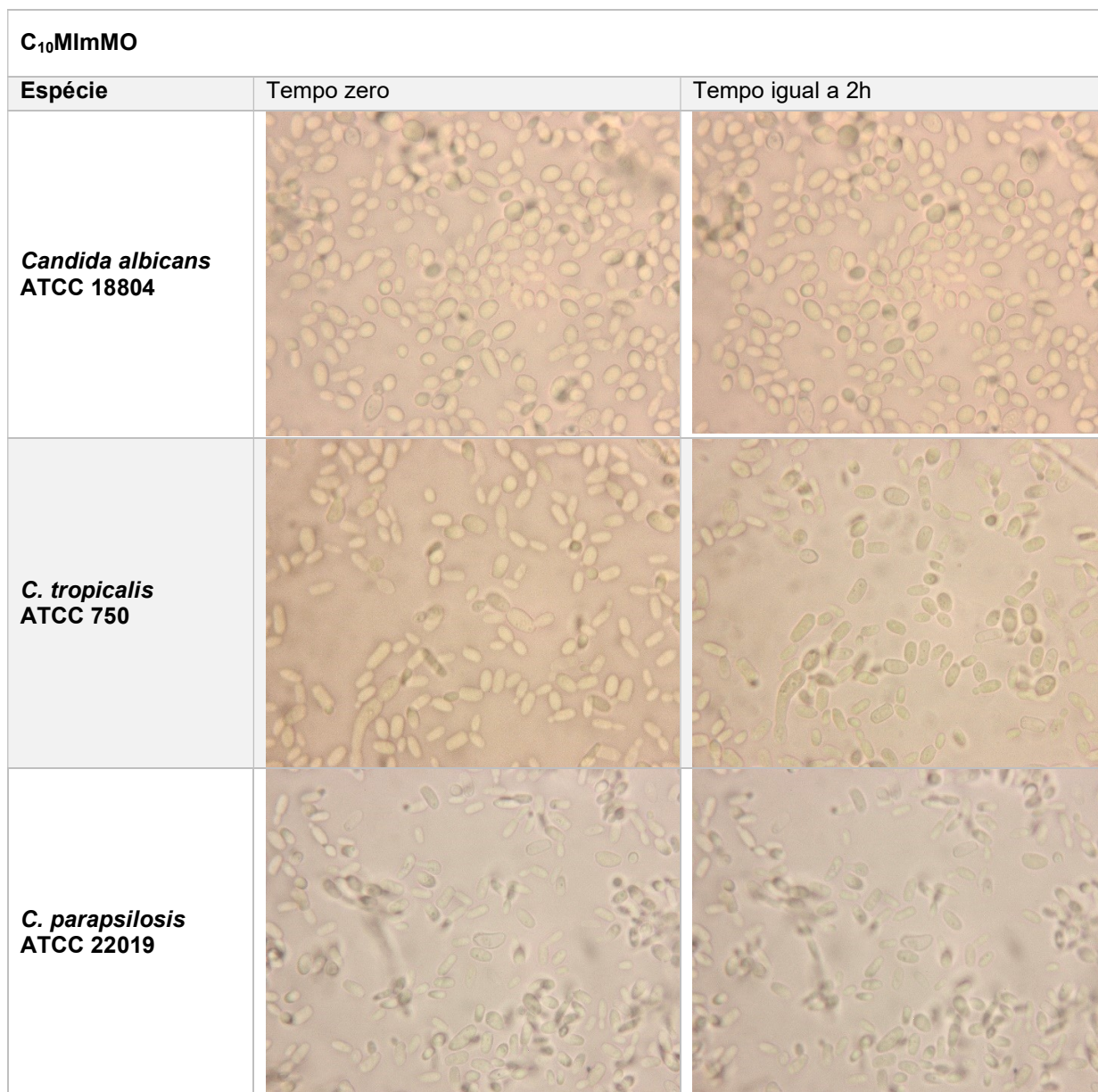


Figura 13. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico **C₁₀MIm** e ânion com corante Alaranjado de Metila.

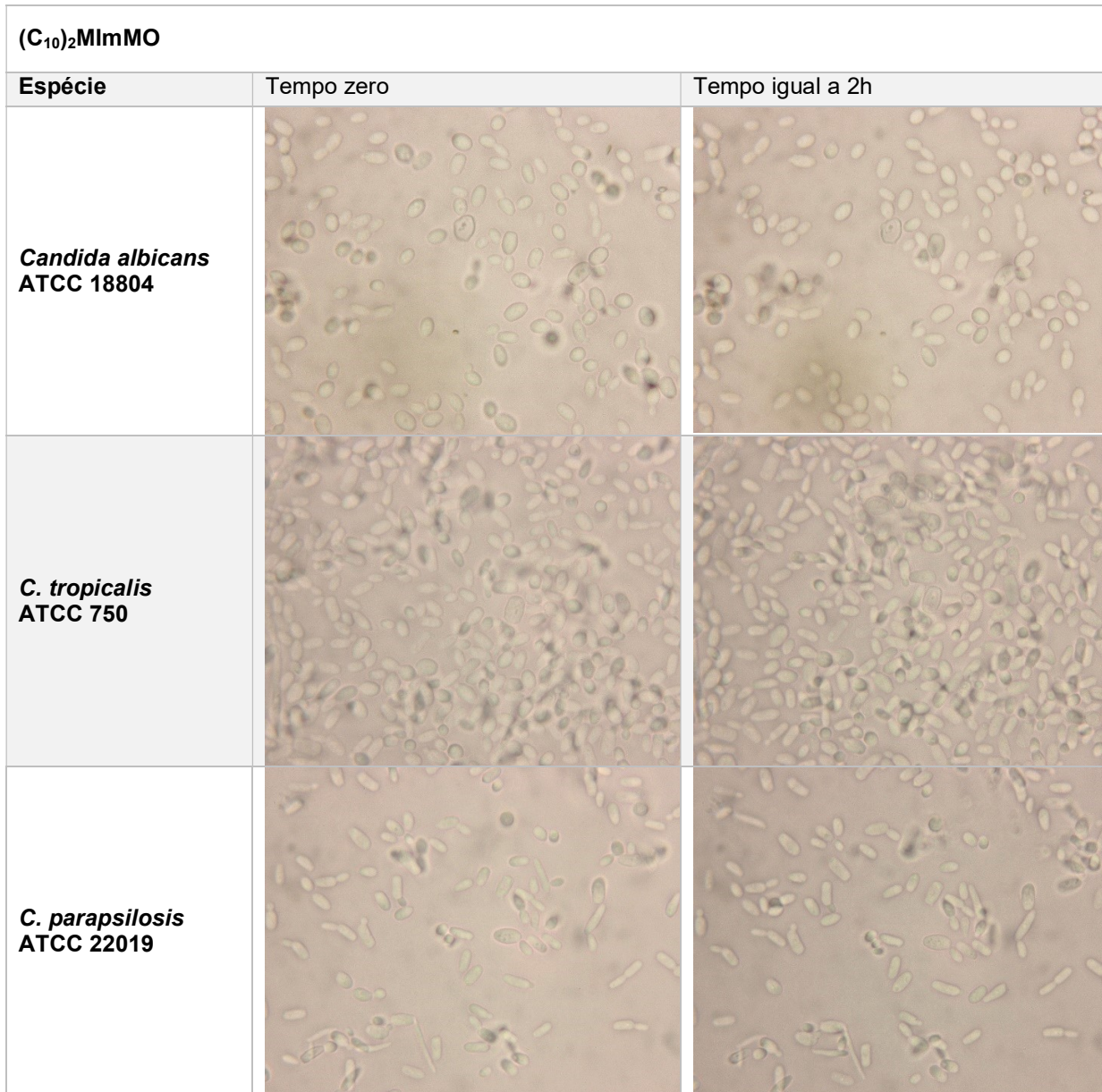


Figura 14. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico (C₁₀)₂MIm e ânion com corante Alaranjado de Metila.

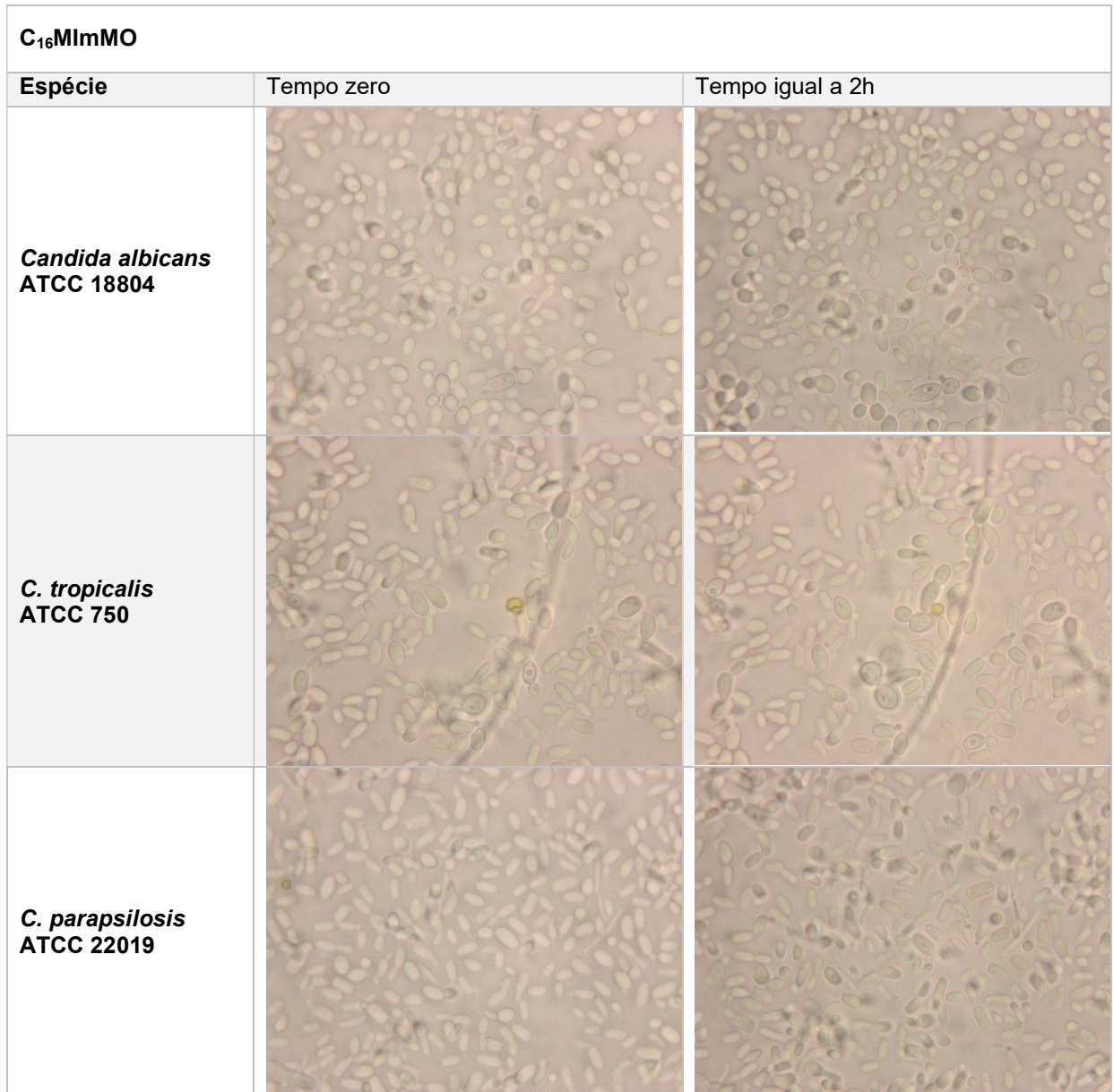
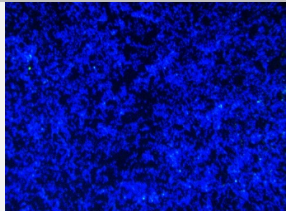
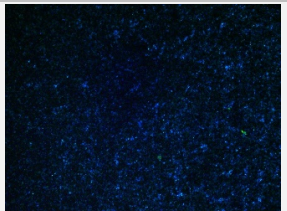
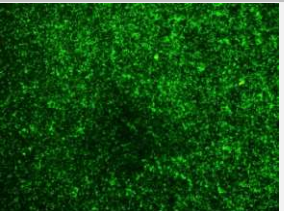
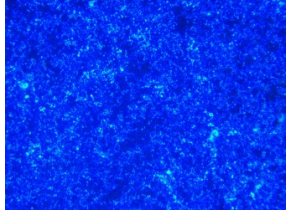
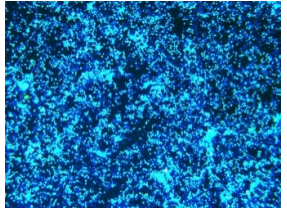
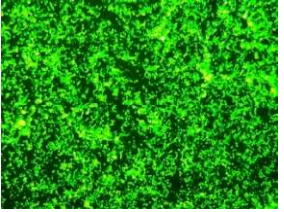
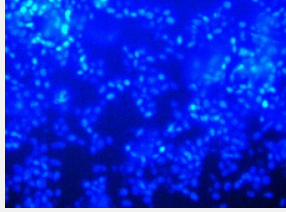
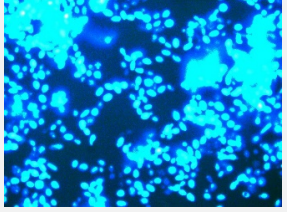
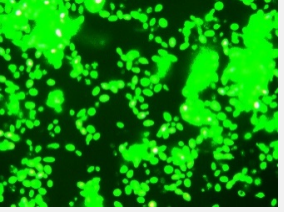


Figura 15. Imagens fotográficas demonstrando a capacidade do composto em marcar células fúngicas em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. Cátion com o sal imidazólico **C₁₆MIm** e ânion com corante Alaranjado de Metila.

5.2.3. Microscopia com substâncias fluorescentes

Das substâncias fluorescentes, o **NB7** apresentou atividade antifúngica satisfatória, permitindo o prosseguimento de seus testes. Foram realizadas microscopias por fluorescência para verificar a capacidade de marcar as células. De imediato, as células foram marcadas com a substância **NB7**, como é possível verificar na microscopia por fluorescência a seguir com a revelação através do uso de diferentes filtros (Figura 16).

Na microscopia por fluorescência demonstrou-se capaz de marcar células de leveduras com todas as espécies testadas. O **NB8** não apresentou atividade contra duas espécies de cepas testadas o que impediu o prosseguimento de seus testes, já o benzimidazol **NB6** apresentou somente atividade contra duas cepas. O **NB7**, segundo estudos de Perin et al, 2013, pode penetrar nas células e se intercalar com ADN sendo esse, possivelmente o principal mecanismo de marcação das células e biofilmes.

<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	Filtro UV	Filtro Violeta	Filtro Azul
4x de aumento			
10x de aumento			
40x de aumento			

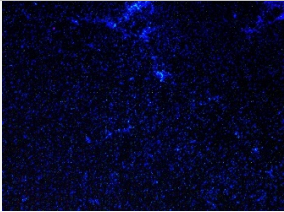
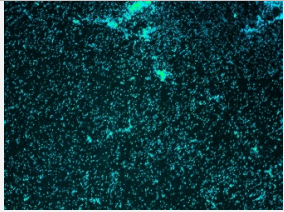
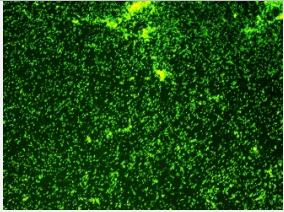
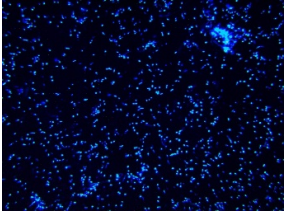
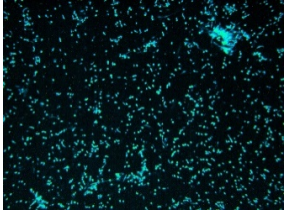
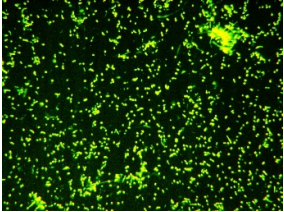
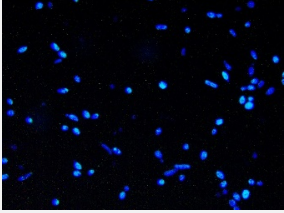
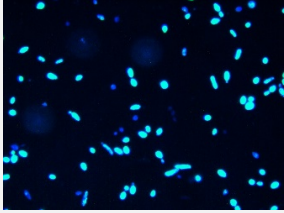
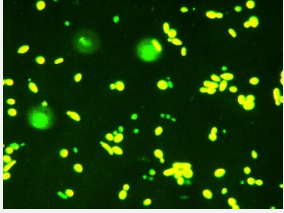
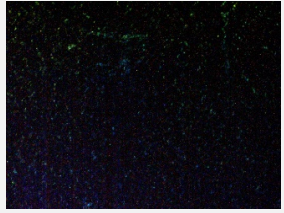
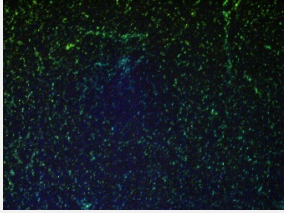
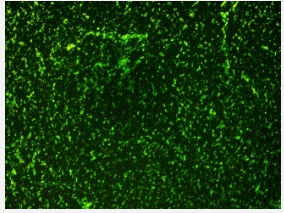
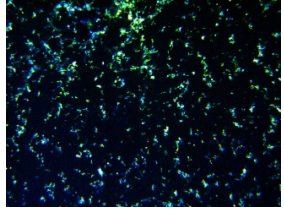
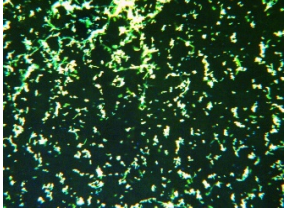
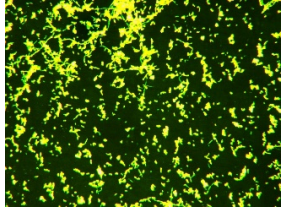
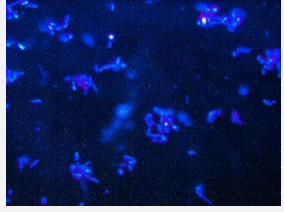
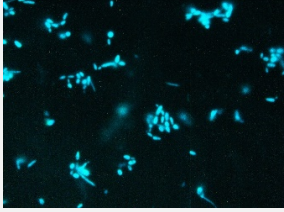
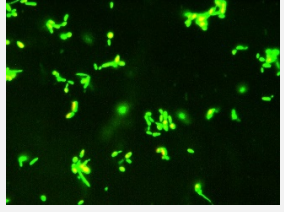
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	Filtro UV	Filtro Violeta	Filtro Azul
4x de aumento			
10x de aumento			
40x de aumento			
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Filtro UV	Filtro Violeta	Filtro Azul
4x de aumento			
10x de aumento			
40x de aumento			

Figura 16. Imagens fotográficas de microscopias por fluorescência utilizando a substância de código **NB7**. É possível observar que as células fúngicas foram reveladas.

5.3. Marcação do biofilme sobre corpo de prova

5.3.1. Teste com corantes puros

Para fins de comparação com os resultados de marcação de biofilme envolvendo os SI de corante azóico, foram testados somente os corantes contra biofilmes fúngicos, de forma a verificar a capacidade de corar e revelar o biofilme. As concentrações aplicadas foram de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $254 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo todos os resultados negativos para capacidade de corar o biofilme.

5.3.2. Teste com sais imidazólicos de corantes azóicos

Seguindo o fluxograma desta pesquisa (Figura 5), o biofilme não foi marcado pelo composto **C₁₀MImORANGEII**, mesmo após 2 h de exposição sobre o biofilme e corpo de prova. Não foi observada nenhuma coloração no biofilme fúngico. Mesmo com o aumento da concentração do composto aplicado que foi de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $254 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como é possível observar na Figura 17.

O único SI de corante azóico que tinha capacidade de corar células (**C₁₀MImORANGEII**), verificado por microscopia, não foi capaz de marcar o biofilme fúngico "*in loco*". Tal fato é possivelmente devido a matriz de biofilme ser constituída de polissacarídeos, proteínas e lipídios o que impede a penetração e marcação das células com corantes.






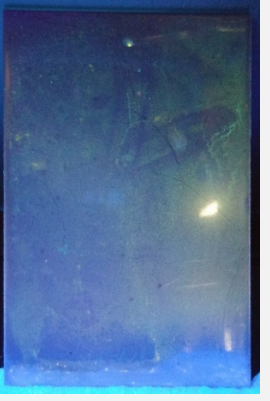
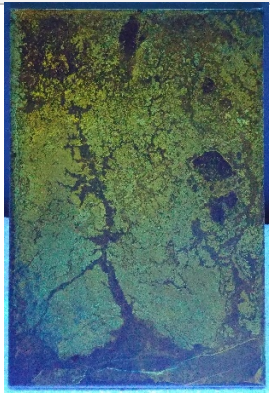


Composto C₁₀MImORANGEII	
Espécie do biofilme	Teste de marcação de biofilme
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	

Figura 17. Imagens fotográficas do teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com composto com cátion com ramificação de dez carbonos e ânion com corante Orange II.

5.3.3. Teste com derivados benzimidazóis fluorescentes

O **NB7** demonstrou-se capaz de corar biofilmes sendo sua marcação com maior intensidade quando utilizando concentração de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Como é possível verificar na figura abaixo, as placas de inox 304 com o biofilme de três diferentes espécies foram marcados com sucesso. Sendo que no caso do Controle negativo, nada foi marcado, mesmo com a utilização de somente água peptonada durante o teste por 96 h com incubação sem micro-organismos a $32 \text{ }^\circ\text{C}$.

NB7			
	Concentração da substância fluorescente		
Espécie do biofilme	$128 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$64 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$32 \mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Candida albicans</i> ATCC18804			
<i>C. tropicalis</i> ATCC750			

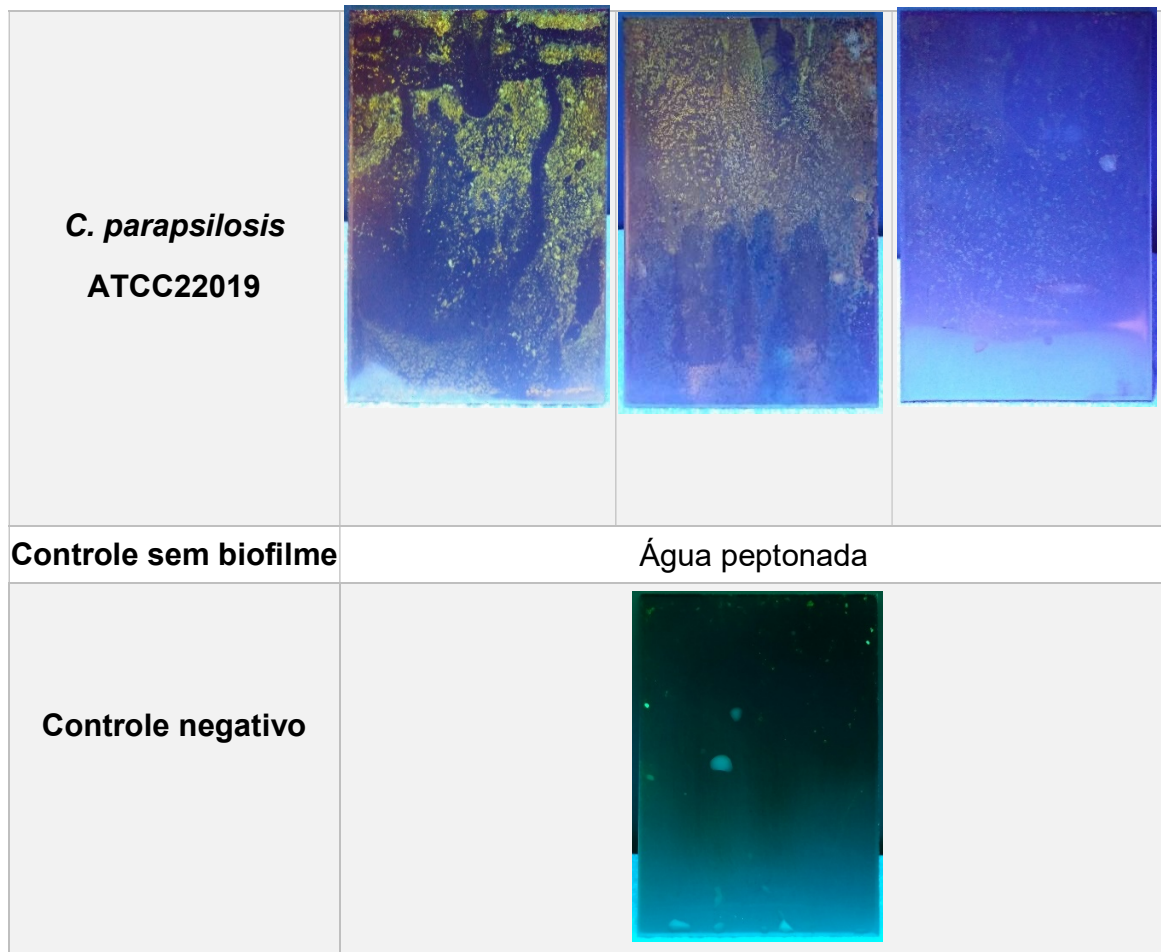


Figura 18. Imagens fotográficas do teste de marcação do biofilme sobre corpo de prova com **NB7** e controle negativo, em que o corpo de prova ficou somente imerso em água peptonada por 96 h.

5.4. Atividade de remoção ou biocida contra biofilmes

Primeiramente foi realizado o método de verificação da atividade de remoção ou biocida (Figura 8) e após o cálculo de conversão para unidades formadoras de colônia por cm², através da seguinte equação:

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{Y}{\text{mL}} \times \frac{100\text{mL}}{37,5\text{cm}^2}$$

Obs: onde Y é a contagem de UFC mL⁻¹ x 100 mL (fator de conversão de 20 µL a 1000 µL ou 1 mL). E 37,5 cm² a área da placa de inox 304.

Em seguida, os dados foram comparados com o controle negativo. Na Tabela 5 é possível verificar os resultados observados, sendo que somente para os controles negativos, isto é, cepas que não tiveram contato com a substância, foi observado crescimento de colônias após inoculação em ágar sabouraud. Após quinze segundos em contato com a substância fluorescente já era observada a atividade biocida.

Das substâncias fluorescentes, a **NB7** apresentou atividade antifúngica contra todas as espécies testadas, prosseguindo para testes de marcação de células em microscopia por fluorescência o que revelou ótimos resultados da marcação, além de testes “*in loco*” mostrando que a solução com esta substância era capaz de marcar biofilmes fúngicos de leveduras. Seguindo o fluxograma (Figura 6), os testes de atividade biocida revelaram que o **NB7** possui essa atividade, mas não de remoção. Isto porque em quinze segundos de contato com a substância já acontecia a morte de micro-organismos ao contrário do que acontecia com o grupo controle que havia entrado em contato somente com água. Este resultado somado a Microscopia Eletrônica de Varredura revela que as células fúngicas não eram removidas, mas sim sofriam alterações estruturais, fato observado na figura 20, em que células em brotamento aparentam estar plasmolisadas, o que possivelmente leva a morte celular. Imagens por microscopia eletrônica em estudos de Hartmann et al. (2012), células de bactérias patogênicas também aparecem plasmolisadas, assemelham-se com as imagens que observamos neste trabalho. As demais substâncias não prosseguiram

para essa etapa de testes por não terem atividade antifúngica e não marcar biofilmes fúngicos.

A atividade biocida do **NB7** é possivelmente devido ao anel azólico presente nas moléculas fluorescentes, pois tal estrutura é encontrada em diversos antifúngicos, além disso a característica de poder intercalar-se no ADN também sugere dano genético a célula (PERIN, 2013; SCHREKKER, 2013). No caso dos sais imidazólicos com ânion azólico esses não foram capazes de corar células fúngicas de biofilmes a olho nu, não sendo realizados em testes posteriores.

Tabela 5. UFC/cm² de leveduras após exposição a substância **NB7** e controle negativo com exposição somente a água.

<i>Candida albicans</i> - ATCC 18804								
Concentração da substância	Sonicação	Tempo de contato com substância	Crescimento da colônia	UFC/cm ² :				Interpretação
				0	-1	-2	-3	
32 µg.mL ⁻¹	Não	15s	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	2h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	24h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	48h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
Água (Controle)	Não	15s	Normal	19,7x10 ³	4,6x10 ³	0	0	Controle (+)
	Sim			9,2 x10 ³	1,1x10 ³	0	0	
<i>Candida tropicalis</i> - ATCC 750								
32 µg.mL ⁻¹	Não	15s	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	2h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	24h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	48h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
Água (Controle)	Não	15s	Normal	7,3x10 ³	1,3x10 ³	0	0	Controle (+)
	Sim			2x10 ³	0,3x10 ³	0	0	

<i>Candida parapsilosis</i> - ATCC 22019								
32 µg.mL ⁻¹	Não	15s	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	2h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	24h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
32 µg.mL ⁻¹	Não	48h	Sem crescimento	0	0	0	0	Biocida
	Sim							
Água (Controle)	Não	15s	Normal	13,6x10 ³	2,7x10 ³	0	0	Controle (+)
	Sim			4,5x10 ³	0,5x10 ³	0	0	

5.5. Teste de toxicidade

Os testes de citotoxicidade revelaram que a substância **NB7** interferiu fortemente na viabilidade celular de leucócitos humanos. De acordo com a Figura 19, menos de 70% das células mantiveram-se viáveis mesmo em baixas concentrações da substância fluorescente ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo, portanto, considerada tóxica quando comparada com os controles, que apresentam viabilidade de mais de 80% das células. O valor de IC50, calculado pela equação da reta (Figura 21), foi de aproximadamente $53,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto o valor do MIC e biocida de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ encontrado para o **NB7** é abaixo de IC50, representando que a substância apresenta relativa toxicidade quando nessa concentração. No caso da proliferação celular a substância impediu a replicação como é possível observar na Figura 20, onde a contagem de leucócitos por mm^3 tornou-se baixíssima ao compararmos a **NB7** a demais substâncias controle, sendo este denominado um efeito citostático (HEDAYA; 2016). O segundo teste que deveria a ser realizado é o genotóxico sendo chamado ensaio cometa. Tal método utiliza glóbulos brancos como células teste e baseia-se na detecção da quebra de cadeias, indicando o dano inicial das moléculas de ADN (TICE, 2000; NADIN, 2001; DOS SANTOS MONTAGNER, 2010). Sendo baseado na formação de rastros em forma de cometa quando um ADN, danificado e marcado com composto fluorescente, é carregado por método da eletroforese (MOLLER, 2006; LIAO, 2009; GÜEZ, 2012). Contudo, no caso de uma substância ser citotóxica e citostática o método fica inviabilizado, pois não há material genético suficiente para conduzi-lo, como aconteceu com a substância benzoimidazólica testada.

O benzimidazol **NB7** apresentou toxicidade e efeito citostático o que impede seu uso tópico e sistêmico em seres humanos. Essa citotoxicidade está possivelmente ligada a atividade antitumoral da substância que além de destruir células de tumores provoca danos nas demais células, sendo, portanto, um potencial sanitizante.

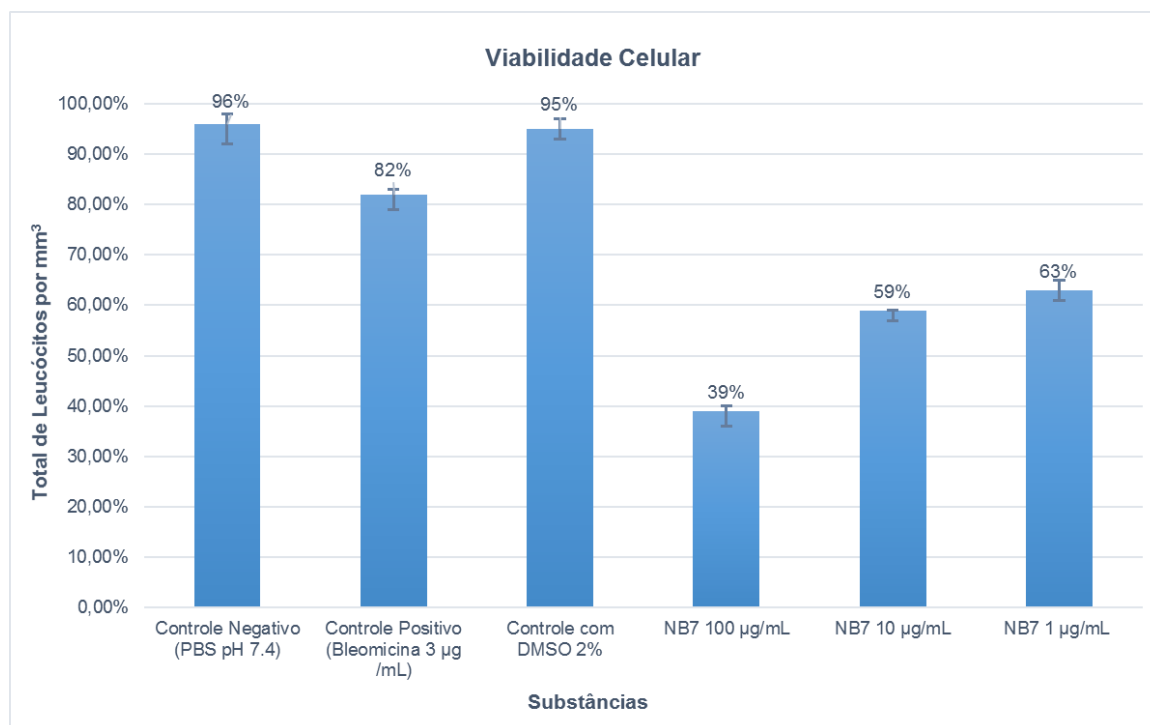


Figura 19. Viabilidade celular de leucócitos expostos a substâncias controle e diferentes concentrações da substância **NB7**.

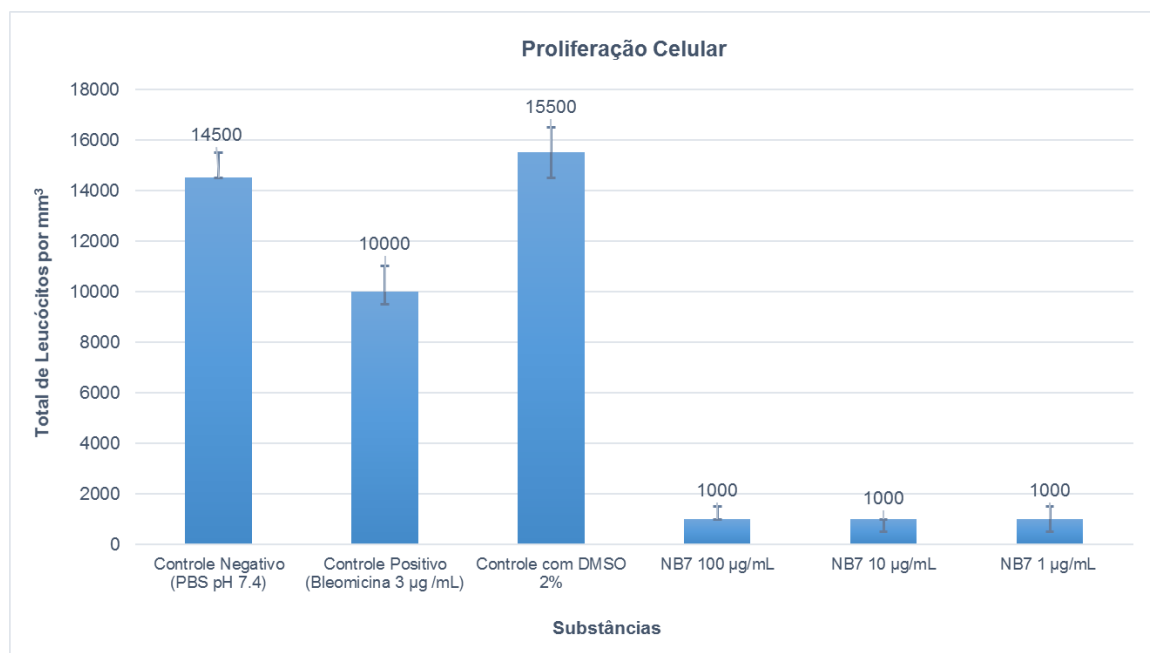


Figura 20. Proliferação celular de leucócitos expostos a substâncias controle e diferentes concentrações da substância **NB7**.

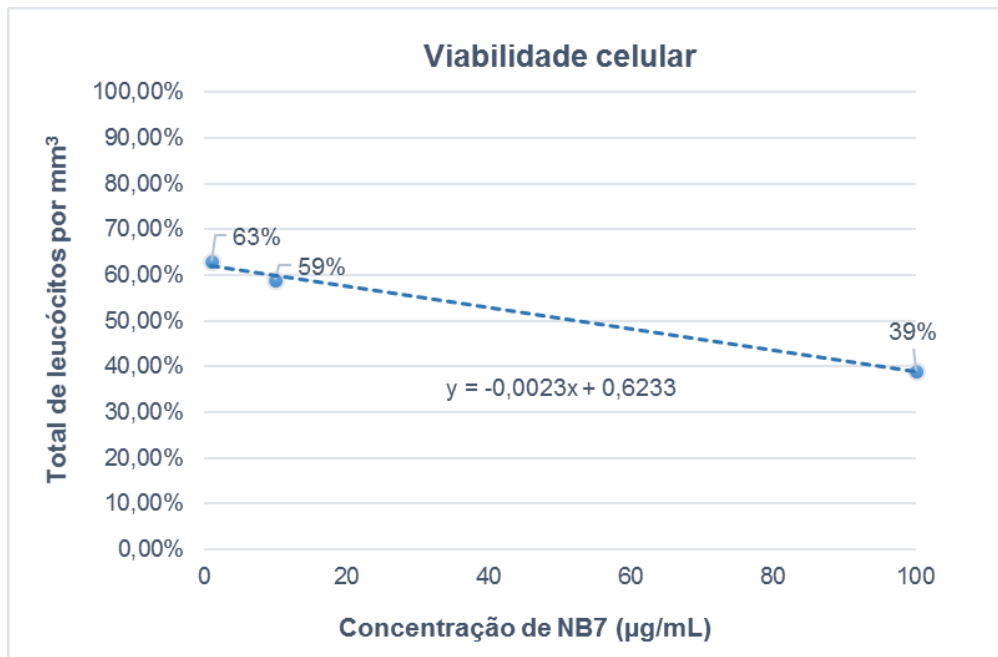


Figura 21. Gráfico do percentual de leucócitos por mm³ e concentração do **NB7** com regressão linear e equação para cálculo de IC50.

5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Através de imagens obtidas por MEV e pintadas digitalmente, foi possível observar a alteração nas células fúngicas. Como é possível observar na Figura 21, as leveduras submetidas ao **NB7** por 15 seg. e 1 h, sofreram alterações semelhantes a plasmólise celular, principalmente as células jovens em brotamento. O benzimidazol fluorescente demonstrou-se capaz de corar as células e ao mesmo tempo ter atividade biocida, fato confirmado por Microscopia Eletrônica de Varredura, que mostram claramente alterações nas células dos micro-organismos (Figura 21). Ou seja, além de marcar as células de fungos, o **NB7** foi capaz de penetrar a camada de biofilme e indicar a sua estrutura.

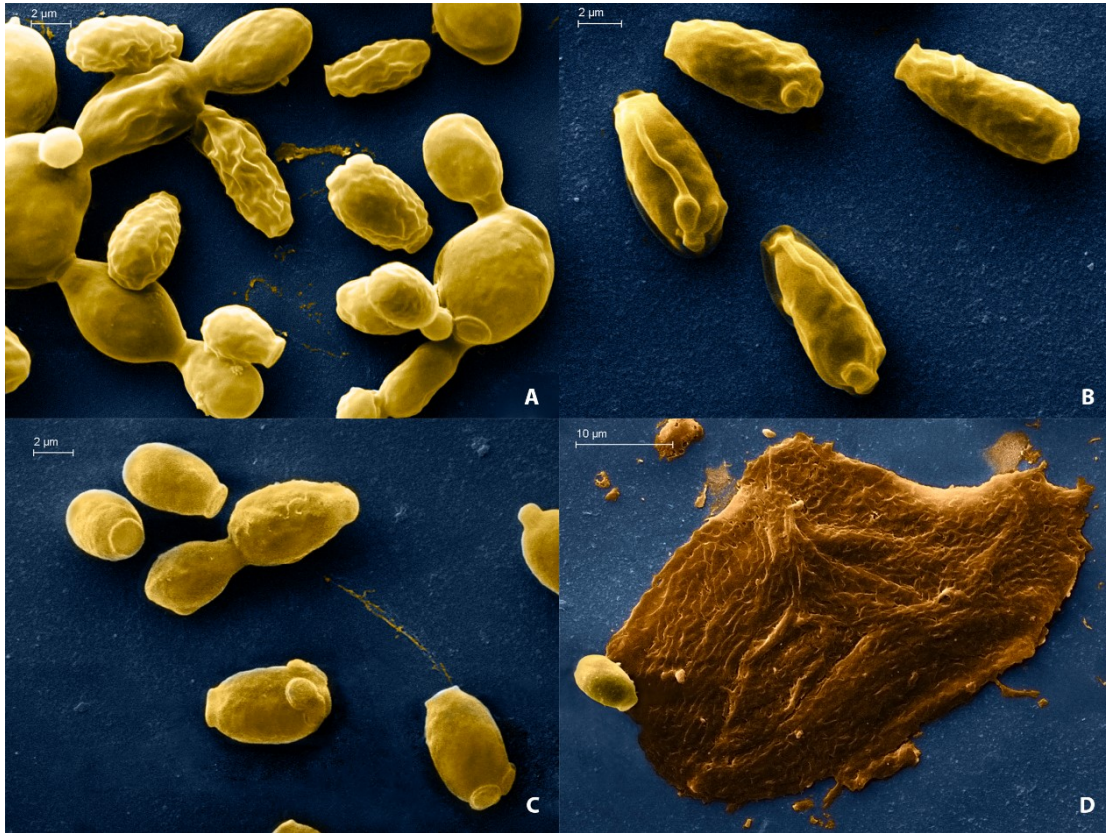


Figura 22. A) *Candida albicans* ATCC 18804 um minuto após entrar em contato com a substância **NB7** (flechas brancas e azuis indicam células parentais e em brotamento, respectivamente), B) *C. albicans* ATCC 18804 uma hora após entrar em contato com a substância **NB7**, C) Controle com *C. albicans* ATCC 18804; e D) Controle com *C. albicans* ATCC 18804 e parte de matriz polimérica com uma célula leveduriforme.

6. CONCLUSÕES

Foram testados SI com ânions corantes e substâncias fluorescentes. No primeiro teste de suscetibilidade apresentaram atividade antifúngica as substâncias **NB7**, **negro de eriocromo T**, **C₄MImErioCr**, **C₁₀MImMO**, **C₁₆MImMO**, **(C₁₀)₂MImMO**, **C₁₀MImORANGEII**, **C₁₆MImORANGEII** e **(C₁₀)₂MImORANGEII**. Nos testes envolvendo microscopias **C₁₀MImORANGEII** e **NB7** foram capazes de marcar células fúngicas. Quanto a marcação do biofilme sobre corpo de prova e atividade biocida, o benzimidazol fluorescente de código NB7 foi capaz de marcar e ter atividade biocida sobre biofilmes de três espécies de *Candida* testadas. Esta substância fluorescente apresentou um MIC de 32 µg.mL⁻¹ sobre as nove cepas de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os biofilmes das cepas ATCC 18804, ATCC 22019 e ATCC 750 sobre as placas de aço inox 304 sofreram danos celular quando expostos por quinze segundos à substância, possibilitando a atividade biocida sobre o biofilme. A substância apresentou toxicidade para testes de citotoxicidade e é citostática o que representa um obstáculo para uso tópico. Futuros estudos de estrutura e atividade podem ser conduzidos buscando a redução da toxicidade e a utilização da substância para sanitização de ambientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALDE, E.; DINARES, I.; IBANEZ, A.; MESQUIDA, N. A simple halide-to-anion exchange method for heteroaromatic salts and ionic liquids. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4007-4027, 2012.
- ALNUAIMI, A.D.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; REYNOLDS, E.C.; MCCULLOUGH, M.J. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. **FEMS Yeast Research**. v.13, n.7, p.689-699, 2013.
- AVELAR-FREITAS, B.A.; ALMEIDA V.G.; PINTO M.C.; MOURAO F.A.; MASSENSINI A.R.; MARTINS-FILHO O.A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. Brazilian journal of medical and biological research. **Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica**. v.47, n.4, p. 3007-3015, 2014.
- BAILLIE, G.S. & DOUGLAS, L.J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 8, p. 1900-1905, 1998
- BERGAMO, V. Z.; Balbuena, E.A.; Hatwig, C.; Pippi, B.; Dalla Lana, D.F.; Donato, R.K. et al.. 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. **Lett Appl Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 504-10, 2015a.
- BERGAMO, V.Z.; DONATO, R.K.; DALLA LANA, D.F.; DONATO, K.J.Z.; ORTEGA, G.G.; SCHREKKER, H.S.; FUENTEFRIA, A.M. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**. v.60, p.66-71, 2015b.
- BISHOP, E. **Indicators: International Series of Monographs in Analytical Chemistry**. Elsevier Science, 2013.
- CERQUEIRA, L.; OLIVEIRA, J.A.; NICOLAU, A.; AZEVEDO, N.F.; VIEIRA, M.J. Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. **Biofouling**. v.29, n.7, p.829-40, 2013.
- CHEN, X.; LIU, J.; WANG, J. A Highly Fluorescent Hydrophilic Ionic Liquid as a Potential Probe for the Sensing of Biomacromolecules. **J. Phys. Chem. B**. v.115, n.6, 2011.
- CHEN, X.W.; LIU J.W.; WANG J.H. A highly fluorescent hydrophilic ionic liquid as a potential probe for the sensing of biomacromolecules. **The journal of physical chemistry B**. v.115, n.6, p.1524-30, 2011.
- CHEW, S. Y. et al. In vitro modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. **Anaerobe**, v. 34, p. 132-138, 2015.
- CORDEIRO, R.A.; TEIXEIRA, C.E.; BRILHANTE, R.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.; ALENCAR, L.P.; DE OLIVEIRA, J.S.; MONTEIRO, A.J.; BANDEIRA, T.J.; SIDRIM, J.J.; MOREIRA, J.L.; ROCHA, M.F. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells

and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. **FEMS Yeast Res.** v.15, n.4, p.1-12, 2015.

CORRY, J.E.L.; CURTIS, G.D.W.; BAIRD, R.M. Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology: Royal Society of Chemistry, 2011.

COSTA, A.C.; PEREIRA, C.A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. **Mycoses.** v.56, n.6, p.614-22, 2013.

DALLA LANA, D. F. et al. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. **J Appl Microbiol**, v. 119, n. 2, p. 377-388, 2015.

DAVIS, A. S. et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. **J Histochem Cytochem**, v. 62, n. 6, p. 405-423, 2014.

DE LIMA, P.G.; Micro-ondas na Síntese de Líquidos Iônicos. **Rev. Virtual Quim.** v.3, n.4, p.325-338, 2011.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA Aplicações e preparação de amostras. 1º ed. Porto Alegre (RS): EdiPUCRS; 2007.

DOS SANTOS MONTAGNER, G.F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M.M.; ALMEIDA, R.C.; MOSTARDEIRO, C.P.; DUARTE, M.M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA.** v.24, n.5, p.1410-6, 2010.

ENNETI, R.K.; PARK, S.J.; SCHENCK, A.; GERMAN, R.M.; THOMAS, P.; LEVENFELD, B.; VAREZ, A.; DE SOUZA, I.O.P.; DE SOUZA, J.P.; FUENTEFRIA, A.M. Critical Issues In Manufacturing Dental Brackets By Powder Injection Molding. **International Journal of Powder Metallurgy.** v.48, n.2, p.23-29, 2012.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews Microbiology.** v.8, n.9, p.623-33, 2010

GÜEZ, C.M.; WACZUK, E.P.; PEREIRA, K.B.; QUEROL, M.V.M.; ROCHA J.B.Td.; OLIVEIRA, L.F.Sd. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.48, p.461-7, 2012.

HARTMANN, M. et al. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3132-3142.

HEDAYA, O. M. et al. Antiproliferative activity of a series of 5(1H1,2,3triazolyl) methyl and 5acetamidomethyloxazolidinone derivatives. **Mol Med Rep.** v.13, n.5, p.3311-3318 , 2016.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A.T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B.K. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**. v.146, n.10, p.2395-407, 2000.

HIJNEN, W.A.M.; CASTILLO, C.; BROUWER-HANZENS, A.H.; HARMSEN, D.J.H.; CORNELISSEN, E.R.; VAN DER KOOIJ, D. Quantitative assessment of the efficacy of spiral-wound membrane cleaning procedures to remove biofilms. **Water Res**. v.46, n.19, p.6369-6381, 2012.

HOFER, D.; MEIER, A.; SENER, B.; GUGGENHEIM, B.; ATTIN, T.; SCHMIDLIN, P.R. In vitro evaluation of a novel biofilm remover. **International journal of dental hygiene**. v.13, p.246-253, 2015.

JIANG, F. et al. Quaternized chitosans bind onto preexisting biofilms and eradicate pre-attached microorganisms. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 2, n. 48, p. 8518-8527, 2014.

JIN, Y. et al. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 353-60, Apr 2005.

KANAFANI, Z.A. & PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 1, p. 120-8, 2008.

KEPPLER-ROSS, S.; NOFFZ, C.; DEAN, N. A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Genetics**, v. 179, n. 1, p. 705-10, May 2008.

KEPPLER-ROSS, S.; NOFFZ, C.; DEAN, N. A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Genetics**, v. 179, n. 1, p. 705-10, May 2008.

KIM, H.; RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 4, p. 1256-65, 2007.

KUMARI, A. Biodegradation of dyes by Basidiomycetes fungi using HPLC and UV – Visible Spectrophotometer. *Journal of Chemistry*. v.1, n.4, p.31-42, 2015.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting ADN damage in individual cells. **Methods**. v.48, n.1, p.46-53, 2009.

LIU, H.; ZHANG, L.; CHEN, J.; ZHAI, Y.; ZENG, Y.; LI, L. A novel functional imidazole fluorescent ionic liquid: simple and efficient fluorescent probes for superoxide anion radicals. **Analytical and bioanalytical chemistry**. v.405, n.29, p.9563-70, 2013.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of ADN damaging exposures. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**. v.98, n.4, p.36-45, 2006.

MOWAT, E.; BUTCHER, J.; LANG, S.; WILLIAMS, C.; RAMAGE, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of medical microbiology**. v.56, n.9, p.1205-12, 2007.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**. v.49, n.9, p.1183-6, 2001.

NEGRI, M.; SILVA, S.; CAPOCI, I.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* Biofilms: Biomass, Metabolic Activity and Secreted Aspartyl Proteinase Production. **Mycopathologia**. p.1-8, 2015.

NISAL, A.; TRIVEDY, K.; MOHAMMAD, H.; PANNERI, S.; SEN GUPTA, S.; LELE, A.; MANCHALA, R.; KUMAR, N.S.; GADGIL, M.; KHANDELWAL, H.; MORE, S.; LAXMAN, R.S. Uptake of Azo Dyes into Silk Glands for Production of Colored Silk Cocoons Using a Green Feeding Approach. **ACS Sustainable Chem. Eng.** v.2, n.2, p.312-317, 2014.

NWEZE, E.I.; GHANNOUM, A.; CHANDRA, J.; GHANNOUM, M.A.; MUKHERJEE, P.K. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. v.67, n..1, p.149-53, 2012.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.; PASSERI, D.; BERLUTTI, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita**. v.25, n.1, p.31-42, 2013

PARANHOS, H.F.O.; LOVATO SILVA, C.H.; CRUZ, P.C. Métodos de quantificação de biofilme em prótese total: revisão da literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.33, n.4, p.203-10, 2004.

PAUL, A. et al. Intracellular detection of Cu(2+) and S(2-) ions through a quinazoline functionalized benzimidazole-based new fluorogenic differential chemosensor. **Dalton Trans**, v. 44, n. 38, p. 53-64, 2015.

PERIN, N.; MARTIN-KLEINER, I.; NHILI, R.; LAINE, W.; DAVID-CORDONNIER, M.H.; VUGREK, O.; KARMINSKI-ZAMOLA, G.; KRALJ, M.; HRANJEC, M. Biological activity and ADN binding studies of 2-substituted benzimidazo[1,2-a]quinolines bearing different amino side chains. **MedChemComm**. v.4, p.1537-1550, 2013.

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001; 45(9): 2475-2489

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L., Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 9, p. 2475-9, 2001.

- RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. Characterization of Azo Reduction Activity in a Novel Ascomycete Yeast Strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.4, 2004.
- RAUT, J.S.; SHINDE, R.B.; CHAUHAN, N.M.; KARUPPAYIL, S.M. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by *Candida albicans*. **Journal of microbiology and biotechnology**. v.24, n.9, p.1216-1225, 2014.
- ROCHA DE SOUZA, M. C. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Phycol**, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.
- SABNIS, R.W. Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications: Wiley, 2010.
- SAKIMURA, T. et al. Biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* expressing vancomycin resistance early after adhesion to a metal surface. **Biomed Res Int**, p.1-8, 2015.
- SALIM, N.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J.D.; MOORE, C.; RAMAGE, G.; RAUTEMAA, R. Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against *Candida albicans* biofilm formation. **International journal of antimicrobial agents**. v.41, n.2, p.193-6, 2013.
- SCHMAHL, G.; BENINI, J. Treatment of fish parasites. 11. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. **Parasitol Res**, v. 84, n. 1, p. 41-49, 1998.
- SCHREKKER, H.S.; DONATO, R.K.; FUENTEFRIA, A.M.; BERGAMO, V.; OLIVEIRA, L.F.; MACHADO, M.M. Imidazolium Salts as Antifungal Agents: Activity Against Emerging Yeast Pathogens, Without Human Leukocyte Toxicity. **MedChemComm**. v.4, p.1457-1460, 2013.
- SCHREKKER, H.S.; SILVA, D.O.; GELESKY, M.A.; STRACKE, M.P.; SCHREKKER, C.M.L.; GONÇALVES, R.S. Preparation, cation-anion interactions and physicochemical properties of ether-functionalized imidazolium ionic liquids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.19, p.426-33, 2008.
- SILVA-LOVATO, C.H.; TOTTI, A.M.; PARANHOS, H.F.; TOTTI, V.G. Evaluation of a computerized method for denture biofilm quantification: inter-examiner reproducibility. **Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists**. v.18, n.4, p.332-6, 2009.
- SOLOMONS, T. W. Graham. Química orgânica. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2003.
- STORTI, A.; PIZZOLITTO, A.C.; STEIN, R.A.; PIZZOLITTO, E.L. Biofilm detection on central venous catheter using a quantitative culture method. **RBAC**. v.39, n.3, p.183-187, 2007.

TAFF, H.T.; MITCHELL, K.F.; EDWARD, J.A.; ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future microbiology**. v.10, n.8, p.1325-1337, 2013.

TAMAYO, R.; PATIMALLA, B.; CAMILLI, A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. **Infection and immunity**. v.78, n.8, p.3560-3569, 2010.

TAN, C. M. et al. Evaluation of the *Candida albicans* removal and mechanical properties of denture acrylics cleaned by a low-cost powered toothbrush. **J Prosthodont Res**, v. 58, n. 4, p. 243-51, Oct 201

THURNHEER, T.; GMUR, R.; GUGGENHEIM, B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. **Journal of microbiological methods**. v.56, n.1, p.37-47, 2004.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**. v.35, n.3, p.206-21, 2000.

TOMASI, E.; FACCHINI, L.A.; OSORIO, A.; FASSA, A.G. Aplicativo para sistematizar informações no planejamento de ações de saúde pública. **Revista de Saúde Pública**. v.37: p.800-806, 2003.

TOTE, K. et al. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Lett Appl Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 249-254, 2008.

VERMA, A.; JOSHI, S.; SINGH, D. Imidazole: Having Versatile Biological Activities. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 12, 2013.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica - 6.ed.: Estrutura e Função**. Bookman Editora, 2013.

WADE, L. G. **Organic Chemistry – 8.ed.: Solution Manual**. Pearson Editora, 2013.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. **Ionic Liquids in Synthesis**. 2^oed.: VCH Wiley, Weinheim. 2008.

ANEXO I – Certificado de qualidade da empresa Aperam

Pág. 1/1

Aperam Inox América do Sul S.A.

aperam

Sede: Av. Carandá, nº 1115, 2ª Andar - Centro - Belo Horizonte - MG - 30130-915 - Brasil
 Usina: Praça 1ª de Maio, nº 9 - Centro - Timóteo - MG - 35180-018 - Brasil
 Filial: Av. Mercedes Benz, nº 1.420 - Distrito Industrial - Campinas - SP - 13054-750 - Brasil
 Rodovia RSC 453, Km 2,2 - S/N - Distrito Industrial - Caxias do Sul - RS - 95110-690 - Brasil

CERTIFICADO DE QUALIDADE

Número: 1733955
 Pedido APERAM: 76366008
 Data: 27/02/2015
 Nota Fiscal: **479762**

Cliente:
 INOXPLASMA COMERCIO DE METAIS LTDA
 AV HENRY FORD 90
 03109000 - SAO PAULO - SP
 BRASIL
 Ordem: 00700/15

Aço: AISI 304 Acabamento: 2B Produto: BOBINA
 Dimensões: 1,50 mm x 1240 mm
 Marcação:

Composição Química

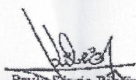
Número Corrida	C %	Mn %	Si %	P %	S %	Cr %	Ni %	Mo %	N PPM	Ti %	Co %				
560119J	0,035	1,17	0,430	0,027	0,0010	17,69	8,00	0,060	464	0,0015	0,188				

Resultados

Ensaio/Variável	Unid. Med	560119J3001B											
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Dureza RB	HRB	81,00	81,00										
Lim Resistência	MPA		709,00										
Lim. Escoamento 0,2%	MPA		298,00										
Alongamento	%		57,00										
Tamanho de Grão			08/08										
Peso Líquido	Kg		1.136										
Peso Bruto	Kg		1.381										

Identificação de unidade metálica (U.M.): Ok
 Qualidade superficial / dimensional: Ok
 Tratamento Térmico: Temp.mínima de solubilizacao 1040 C

Observações:
 a) Material sem contaminação por Mercúrio.
 b) Material sem contaminação por radioatividade. (Garantia enquanto estocado sob responsabilidade da Aperam Inox América do Sul S.A.).
 c) Certificamos que os resultados descritos acima estão corretos e de acordo com a especificação ou concessão autorizada.
 d) Sistema de Gestão da Qualidade certificado conforme norma ISO 9001 - Certificado ABS QE Nº 30071.
 e) Sistema de Gestão da Qualidade certificado conforme norma ISO/TS 16949 - Certificado ABS QE Nº 38324.
 f) Sistema de Gestão Ambiental certificado conforme norma ISO 14001 - Certificado ABS QE Nº 65989.
 g) Corrida(s) produzida(s) no Brasil.


 Paulo Sérgio Ribeiro
 Inspetor de Qualidade
 Aperam Inox América do Sul S.A.