



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0307854-0 A**

(22) Data de Depósito: 19/11/2003
(43) Data de Publicação: **13/06/2006**
(RPI 1849)



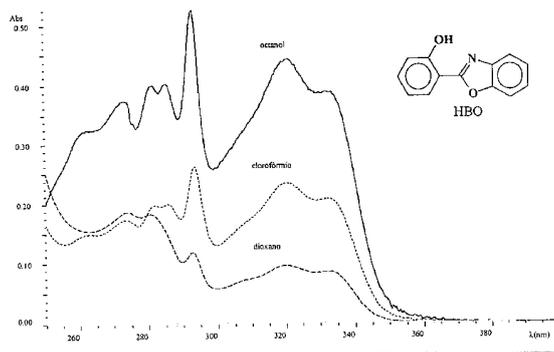
(51) Int. Cl.⁷.:
G01N 1/28
C09K 11/06
C07D 261/20

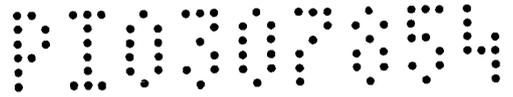
(54) Título: **MÉTODOS PARA CORAR MICROORGANISMOS UTILIZANDO FLUOROCROMOS DA FAMÍLIA DAS BENZAZOLAS E COMPOSTOS RELACIONADOS**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Inventor(es): Valter Stefani, Maria Lúcia Scroferneker, Valeriano Antonio Corbellini, Gunter Gehlen, Hector Gabriel Noblega, Ivana Pelegrim de Oliveira, Matilde Achavara Elena

(57) Resumo: "MÉTODOS PARA CORAR MICROORGANISMOS UTILIZANDO FLUOROCROMOS DA FAMÍLIA DAS BENZAZOLAS E COMPOSTOS RELACIONADOS". São descritos métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas (benzoxazolas, benzimidazolas e benzotiazolas) e compostos relacionados (pirimido-, naftaleno-, antraceno-, pirenoazolas, entre outros) para estudos de morfologia microbiana por microscopia de epifluorescência. Os corantes fluorescentes são incorporados no micélio vegetativo e reprodutor de fungos e leveduras durante crescimento em microcultivo, sendo possível o diagnóstico microbiológico in e muticelulares, em diferentes estágios de desenvolvimento e organização celular, a possibilidade de diferenciação entre células vivas e células mortas e o desenvolvimento de probes moleculares para avaliação in situ de atividades enzimáticas específicas, tais como amidase, nitrorredutase, azorredutase, oxidase, entre outros, de forma a selecionar microorganismos para a indústria farmacêutica e de alimentos, tratamento de efluentes e biodeterioração de estruturas metálicas e não metálicas.





MÉTODOS PARA CORAR MICROORGANISMOS UTILIZANDO FLUOROCROMOS DA FAMÍLIA DAS BENZAZOLAS E COMPOSTOS RELACIONADOS

CAMPO DA INVENÇÃO

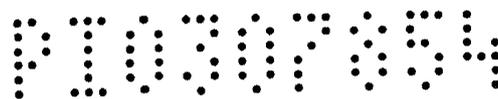
5 A presente invenção diz respeito a métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas e compostos relacionados. Mais especificamente, a invenção trata da aplicação de benzazolas e compostos relacionados como fluorocromos para estudos de morfologia microbiana por microscopia de
10 epifluorescência.

A invenção encontra aplicação na área médica, indústria farmacêutica, agrícola, industrial e biotecnológica para diagnóstico morfológico e funcional das estruturas celulares.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

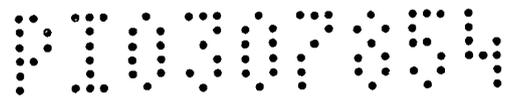
15 Técnicas de fluorescência tem se tornado uma ferramenta importante em microscopia para o estudo de aspectos morfológicos de estruturas celulares. À medida que equipamentos mais sofisticados são criados, simultaneamente surge a necessidade do desenvolvimento de novos fluorocromos com propriedades mais específicas quanto à
20 coloração de tecidos e quanto à estabilidade à luz, ao ar e à temperatura durante armazenagem do material biológico.

Em micologia a microscopia de epifluorescência (MEF) tem encontrado aplicações como método para avaliação da viabilidade celular de leveduras (Paula et al, 1978; Correa et al, 1986) e do
25 crescimento de fungos (Cohen et al, 1987) e a observação de fungos nematófagos no solo (Jensen e Lysek, 1991; Jensen e Lysek, 1995; Jensen et al 1997; Jensen et al, 1998). Vários fluorocromos têm sido utilizados nestes estudos incluindo brometo de etídio, diacetato de



fluoresceína e rodamina B. Outra classe de fluorocromos, disponível desde 1948, é a dos compostos diaminoestilbenos que têm sido empregados como branqueadores ópticos na indústria do papel. Representantes desta classe tais como Calcoflúor White e Brankophor, tem sido utilizados desde 1984 em procedimentos qualitativos de detecção microscópica de elementos fúngicos em espécimes clínicos (Monheit et al, 1984; Hageage e Harrington, 1984; Rüchel & Schaffrinski, 1999; Rüchel et al, 2000; Rüchel et al, 2001) e, mais recentemente, na avaliação de alterações de membrana celular de dermatófitos (BRASCH, J.; I. KREISELMAIER; E. CHRISTOPHERS. Inhibition of dermatophytes by optical brighteners. *Mycoses* 46, 120-125, 2003). Estes métodos se baseiam na coloração de células após o seu crescimento. Pouca atenção tem sido dada quanto à incorporação de fluorocromos durante o crescimento de células fúngicas.

Um dos maiores problemas de uso da fluoresceína para marcação de material biológico é o rápido foto-esmaecimento (photo-fading, photobleaching) da fluorescência, principalmente em maiores aumentos do campo de visualização (higher magnifications) (Handbook of fluorescent probes and research products. Web edition. <http://www.probe.com> (access verified on 08/12/03. Molecular Probes®, 2003). Esta propriedade limita o tempo disponível para observações e interfere pesadamente com a documentação fotográfica. (CORREA, B; A. PURCHIO; C.R. PAULA, W. GAMBALE. Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mycopathologia* 96, 91-96, 1986) e (JENSEN, C; G. LYSEK. Fluorescence microscopy of fungi in native soil – improvements by additional substances. *Microscopy and Analysis* 49, 7-9, 1995). Para



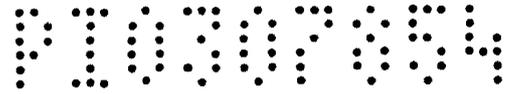
prevenir este efeito adicionam-se inibidores de photobleaching (antifading inhibitor) tais como citifluor AF3 (JENSEN, C; G. LYSEK. Fluorescence microscopy of fungi in native soil – improvements by additional substances. *Microscopy and Analysis* 49, 7-9, 1995).

5 Os compostos orgânicos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazolas são moléculas versáteis do ponto de vista fotofísico que apresentam ponte de hidrogênio intramolecular originando fluorescência decorrente de uma transferência protônica intramolecular no estado excitado (TPIEE) (HOLLER, M.G; L.F. CAMPO; A. BRANDELLI; V. STEFANI. Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 149, 217-225, 2002).
10 Este grupo de moléculas tem apresentado aplicações como estabilizantes de luz UV para polímeros (FOURNIER, T.; S. POMMERET; J.C. MIALOCQ; A. DEFLANDRE; R. ROZOT. Femtosecond laser studies of excited state intramolecular proton transfer in na ultraviolet-filter molecule. *Chemical Physics Letters* 325, 171-175, 2000), corantes para laser (STEFANI, V; A. A. SOUTO; A. U. ACUNA; F. AMAT-GUERRI. Synthesis of proton-transfer fluorescent dyes: 2,5-Bis (2'-Benzazolyl)hydroquinones and related compounds. *Dyes and Pigments* 20, 97-107, 1992) e (COSTELA, A.; GARCÍA-MORENO, R. MALLAVIA; F. AMAT-GUERRI; J. BARROSO; R. SASTRE. Proton-transfer lasers based on solid copolymers of modified 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazoles with methacrylate monomers. *Optics Communications* 152, 89-95, 1998) e ótica não linear (Hillebrand et al, 2001) na síntese de polímeros com propriedades fluorescentes (PLA-DALMAU, A. 2-(2'-Hydroxyphenyl) benzotiazoles, benzoxazoles and benzimidazoles for plastic scintillation applications. *Journal of Organic*

15
20
25



Chemistry 60, 5468-5473, 1995) e (CAMPO, L.F.; D.S. CORREA; M.A. ARAÚJO; V. STEFANI. New fluorescent monomers and polymers displaying na intramolecular proton-transfer mechanism in the electronically excited state (ESIPT), 1. Synthesis of benzazolylynylene derivatives and its copolymerization with methyl methacrylate (MMA). 5 Macromolecular Rapid Communications 21, 832-836, 2000) ou como *probe* para marcação de proteínas (HOLLER, M.G.; L.F. CAMPO; A. BRANDELLI; V. STEFANI. Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent 10 probes for proteins. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 149, 217-225, 2002). Particularmente 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazol (HBO) tem sido usado como *probe* para avaliação da estrutura do DNA (LECUBIN, F; R. BENHIDA; J.L. FOURREY, J.S. SUN. NMR recognition studies of CG base pairs by new easily acessible 15 heterobicyclic systems. Tetrahedron Letters 40, 8085-8088, 1999) e WANG, H; H. ZANG; O.K. ABOUT-ZIED; C. YU; F.E. ROMESBERG; M. GLASBEEK. Femtosecond fluorescence upconversion studies of excited-state proton-transfer dynamics in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole (HBO) in liquid solution and DNA. Chemical Physics Letters 367, 599- 20 608, 2003) e 2-(2'-hidroxi-5'-aminofenil) benzoxazol (HAMBO) como intermediário para a síntese de sondas biológicas (Holler et al, 2002) e de monômeros fluorescentes (CAMPO, L.F; D.S. CORREA; M.A. ARAÚJO; V. STEFANI. New fluorescent monomers and polymers displaying na intramolecular proton-transfer mechanism in the 25 electronically excited state (ESIPT), 1. Synthesis of benzazolylynylene derivatives and its copolymerization with methyl methacrylate (MMA). Macromolecular Rapid Communications 21, 832-836, 2000). Uma característica da fluorescência por TPIEE é o efeito solvatocrômico. Na



presença de solventes próticos ocorre a ruptura da ligação de hidrogênio intramolecular com um deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção e conseqüentemente no máximo de emissão, em relação aos solventes apróticos (Formosinho & Arnaut, 1993; Douhal et al, 1994; Roberts et al, 1997).

A análise micromorfológica de fungos é uma técnica que permite o estudo das diferentes fases de desenvolvimento do fungo.

SUMÁRIO

De um modo geral, a presente invenção diz respeito a métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas e compostos relacionados.

É característica da presente invenção a utilização de corantes fluorescentes da família das benzazolas (benzoxazolas, benzimidazolas e benzotiazolas) e compostos relacionados (pirimido-, naftaleno-, antraceno-, pirenoazolas, entre outros) para análise da morfologia microbiana por microscopia de epifluorescência.

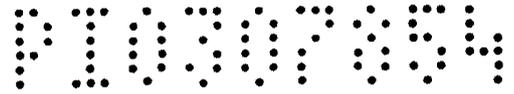
É característica da invenção a incorporação de corantes fluorescentes no micélio vegetativo e reprodutor de fungos e leveduras durante crescimento em microcultivo.

É característica da presente invenção a elevada durabilidade das amostras coradas, mesmo quando expostas à luz ou ar, não apresentando o efeito de fotoesmaecimento.

É característica da presente invenção a possibilidade de diagnóstico microbiológico uni e muticelulares, em diferentes estágios de desenvolvimento e organização celular.

É característica adicional a possibilidade de diferenciação entre células vivas e células mortas.

Ainda, é característica da presente invenção o desenvolvimento de



probes moleculares para avaliação *in situ* de atividades enzimáticas específicas, tais como amidase, nitrorredutase, azorredutase, oxidase, entre outros, de forma a selecionar microorganismos para a indústria farmacêutica e de alimentos, tratamento de efluentes e biodeterioração de estruturas metálicas e não metálicas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 apresenta a representação gráfica de espectros de ultravioleta de HBO em octanol, clorofórmio e dioxano.

A FIGURA 2 apresenta a representação gráfica de espectros de ultravioleta de HAMBO em octanol, clorofórmio e dioxano.

A FIGURA 3 apresenta imagens, com aumento de 400 vezes, de microscopia de epifluorescência de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO de acordo com método 1, sendo a FIGURA 3A microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1a, a FIGURA 3B microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1b, a Figura 3C microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1c, a FIGURA 3D microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1d, a FIGURA 3E microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-2} \text{M}$ pelo método 1e, a FIGURA 3F microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HBO $8 \times 10^{-2} \text{M}$ pelo método de microscopia ótica de epifluorescência.

A FIGURA 4 apresenta imagens, com aumento de 400 vezes, de microscopia de epifluorescência de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO, de acordo com o método 1, sendo a FIGURA 4A microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1a, a FIGURA 4B microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1b, a Figura 4C microcultivos de

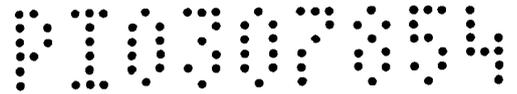
Fonsecaea pedrosoi corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1c, a FIGURA 4D microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ por microscopia ótica de C, a FIGURA 4E microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1d e a FIGURA 4F microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO 8×10^{-2} pelo método 1a.

A FIGURA 5 apresenta imagens, com aumento de 400 vezes, de microscopia de epifluorescência de microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO de acordo com o Método 1, sendo a FIGURA 5A microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1e, a FIGURA 5B microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com HAMBO $8 \times 10^{-2} \text{M}$ pelo método 1f, a Figura 5C microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com fluoresceína $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1d, a FIGURA 5D microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados com Rodamina B $8 \times 10^{-4} \text{M}$ pelo método 1d.

A FIGURA 6 apresenta imagem de microscopia de epifluorescência de microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi* corados através do método 2, sendo a FIGURA 6A imagem do resultado da coloração com PDA-fluoresceína com aumento de 100 vezes, e a FIGURA 6B imagem do resultado da coloração com BDA-HAMBO com aumento de 400 vezes.

A FIGURA 7 apresenta imagem, com aumento de 200 vezes, de microscopia de epifluorescência de microcultivos de *Aspergillus niger* CMMI 111 de acordo com o Método 3, sendo a FIGURA 7A imagem do resultado da coloração com HAMBO4, a FIGURA 7B corado com HAMBI, a FIGURA 7C corado com HAMBT.

A FIGURA 8 apresenta imagem, com aumento de 200 vezes, de microscopia de epifluorescência de microcultivos de *Candida albicans* de acordo com o Método 3, sendo a FIGURA 8A o resultado da



coloração com HAMBO4, a FIGURA 8B com HAMBI, a FIGURA 8C com HAMBT, a FIGURA 8D com BHMONO e a FIGURA 8E com BisBH.

A FIGURA 9 apresenta imagem, com aumento de 200 vezes, de microscopia de epifluorescência de microcultivos de *Criptococcus neoformans* de acordo com o Método 3, sendo a FIGURA 9A o resultado da coloração com HAMBO4, a FIGURA 9B com HAMBI, a FIGURA 9C com HAMBT, a FIGURA 9D com BHMONO e a FIGURA 9E com BisBH.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

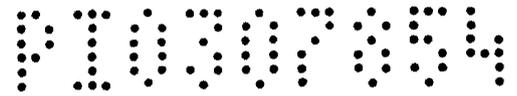
A presente invenção refere-se a métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas e compostos relacionados, para estudos de morfologia microbiana por microscopia de epifluorescência.

Como resultado do trabalho de pesquisa dos inventores, são descritos os métodos I, II e III que utilizam fluorocromos da família das benzazolas e compostos relacionados para corar fungos e leveduras.

MÉTODO I:

- Sintetização de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazol (HBO)

Em um balão de 50mL foram misturados e aquecidos até a solubilização 14,7 g de ácido fosfórico 85% e 15,3 g de pentóxido de fósforo. Em seguida foram adicionados 2,29g de 2-aminofenol e 3,01g de ácido salicílico, degaseificou-se com nitrogênio e aqueceu-se 2h a 185°C e 2h a 220-230°C. O material foi vertido em 50mL de água, neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio, filtrada, seco à temperatura ambiente e extraído em Soxhlet contendo sílica 70-230mesh por uma semana com hexano. Evaporação do solvente produziu cristais brancos de HBO com fluorescência verdeazulada à luz uv365nm.



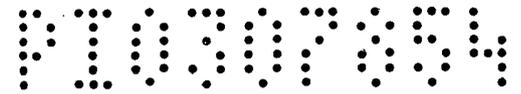
- Sintetização de 2-(2'-hidroxi-5'-aminofenil) benzoxazol (HAMBO)

Em um balão de 50mL foram misturados e aquecidos até a solubilização 14,7 g de ácido fosfórico 85% e 15,3 g de pentóxido de fósforo. Em seguida foram adicionados 2,29g de 2-aminofenol e 3,01g de ácido salicílico, degaseificou-se com nitrogênio e aqueceu-se 2h a 185°C e 2h a 220-230°C. O material foi vertido em 50mL de água, neutralizado com solução 25% de hidróxido de sódio, filtrada, seco à temperatura ambiente e purificado em cromatografia em coluna contendo sílica-gel 70-230mesh e eluente diclorometano. Obteve-se produto amarelo com fluorescência laranja sob exposição à luz uv 365nm. As estruturas foram confirmadas por ponto de fusão e dados espectroscópicos (IV, $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$). Espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Nicolet modelo Magna IR550 e processados com software OMNIC E.S.P. versão 4.1. Análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e de carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) foram realizadas em espectrômetro Varian VXR-200 de 200MHz diluindo-se as amostras em clorofórmio deuterado ou dimetilsulfóxido deuterado e tendo tetrametilsilano como padrão interno à temperatura ambiente. Espectros de absorção no ultravioleta foram obtidos com espectrofotômetro GBC UV/vis 918 e processados com software GBC/Spectral versão 1.5 usando concentrações de $1 \times 10^{-4}\text{M}$ de HBO ou HAMBO em octanol, clorofórmio ou dioxano. Espectros de fluorescência foram medidos com um espectrofotômetro Hitachi modelo F-4500.

- Método de coloração

O método de coloração foi realizado com dois tipos de amostras: microcultivos e suspensões de hifas, sob diferentes formas, sendo:

a) Tratamento direto com Soluções $8 \times 10^{-2}\text{mol-L}$ de corantes em



dimetilsulfóxido ou $8 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ com etanol 90-95% sem secagem na chama.

b) Imersão em etanol 70% por 12h, secagem à temperatura ambiente seguida por coloração com solução $8 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ com etanol 90-95% e
5 secagem na chama.

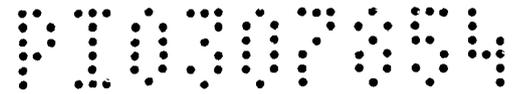
c) Imersão em etanol 70% por 12h, secagem à temperatura ambiente, tratamento com octanol 10% em etanol comercial(5-10min), seguida por coloração com solução $8 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ com etanol 90-95% e secagem na chama.

10 d) Tratamento com octanol 10% sem secagem na chama e coloração com solução $8 \times 10^{-2} \text{mol-L}$ de corantes em dimetilsulfóxido ou $8 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ com etanol 90-95%.

e) Tratamento com octanol 10%, secagem na chama e coloração com solução $8 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ com etanol 90-95%, e secagem na chama sem
15 posterior lavagem com etanol.

f) Tratamento direto com soluções $8 \times 10^{-2} \text{mol-L}$ de corantes em dimetilsulfóxido com secagem na chama sem posterior lavagem com etanol.

Após tratamentos, as células foram analisadas em microscópio de
20 epifluorescência Optiphot-2/Nikon, completado com uma unidade de fluorescência Microflex UFX-DX equipada com uma lâmpada Hg 100w Osram de alta pressão de mercúrio utilizando filtros UV-2A (330-380nm) para derivados benzoxazólicos, G-1A (546/10nm) para rodamina B e B-2A (450-490nm) para fluoresceína. O equipamento fotográfico consistiu
25 de uma câmera Nikon FX-35DX conectada a um sistema de registro UFX-DX de regulação automática de exposições equipada com Filme Kodak Ultra. O processamento das fotos foi realizado em sistema HP Modelo Scanjet 4C equipado com software Deskscan II formato Sharp



Million of Collors com padrão 100x100dpi de resolução.

MÉTODO 2

HBO e HAMBO foram sintetizados por condensação dos ácidos salicílico e 5-aminosalicílico, respectivamente, com 2-aminofenol, em
5 presença de ácido polifosfórico. Fluoresceína e rodamina B foram adquiridas da Vetec^R. O ágar contendo fluorocromos foi preparado pela mistura de 0,1 mL de soluções 8×10^{-2} mol/L em dimetilsulfóxido com 9,9 mL de ágar de dextrose de batata. O material foi colocado em placas de Petri de 6 cm e deixado solidificar. Lâminas de vidro contendo três
10 fragmentos (um de cada ágar) foram inoculados com uma suspensão de células de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 crescida durante 15 dias em ágar Sabouraud a 36,5°C. O material foi encubado a 36,5°C durante 15 dias e analisado sob um microscópio de epifluorescência (Optiphot-2/Nikon) usando filtros UV-2A (330-380 nm).

15 MÉTODO 3

Foi preparada uma solução 8×10^{-2} molL⁻¹ dos fluorocromos 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazola (HAMBO 4), 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazola (HAMBI); 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazola (HAMBT), 2-(2'-benzoxazolil)-5-etoxicarbonil-
20 hidroquinona (MONO-HBO) e 2,5-bis-(2'-benzoxazolil)-hidroquinona (*bis*-HBO) em dimetilsulfóxido sendo em seguida diluída 1:100 em solução alcoólica de octanol a 10%.

No caso do fungo *Aspergillus niger*, o material celular foi preparado utilizando a técnica de microcultivo para geração de micélio. Para
25 *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* foi utilizada a técnica de esfregaço em lâmina onde uma cultura em ágar inclinado de cada uma das amostras foi recolhida e suspendida em uma gota de água destilada

sobre lâmina de microscopia e desidratada previamente no calor da chama para em seguida ser corada.

A técnica de coloração baseou-se no gotejamento de solução $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fluorocromo sobre o material celular, em quantidade
5 suficiente para cobrir o material celular, sendo em seguida levado ao calor da chama para evaporação do solvente.

Análise da micromorfologia de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 sob tratamento com HAMBO, HBO, fluoresceína e Rodamina B através do Método 1

10 *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo negro pertencente à família *Herpotrichielaceae* (ALEXOPOULOS, C.J.; C.W. MIMS; M. BLACKWELL. Introductory Mycology. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 869p, 1996) relacionado com o desenvolvimento de cromoblastomicose em seres humanos (KERN, M.E.; K.S. BLEVINS.
15 Micologia médica: texto & atlas. Editorial Premier: São Paulo, 2^a ed., 256p, 1999). O fungo apresenta vários padrões de conidiogênese sendo importante uma análise morfológica correta para fins diagnósticos e terapêuticos (Lacaz et al, 1998; Caligiorne et al, 1999).

A amostra do fungo foi mantida em ágar Sabouraud (DIFCO) a
20 36,5°C. A produção de células vegetativas para estudos de fluorescência foi realizada através de microcultivo em ágar BDA (DIFCO) com Tween 80 a 1%, por 30 dias a 36,5°C ou por cultivo em caldo Sabouraud (DIFCO) a 30°C por 7 dias (células em suspensão).

- Avaliação do espectro de absorção do derivado HBO em
25 microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi*

Para o HBO, conforme apresentado na Figura 1 anexa, observa-se um aumento no deslocamento para o azul de máximos de absorção na região de 320 e 330nm, um decréscimo na intensidade de absorção e

uma simplificação da estrutura vibracional com o aumento da polaridade do solvente.

Nas fotos de microscopia de epifluorescência de *Fonsecaea pedrosoi* com HBO, conforme apresentado na Figura 3, foi possível observar a marcação das células com os fluorocromos diferenciando-se apenas quanto à cor, à intensidade e à distribuição da fluorescência sobre as estruturas celulares avaliadas (hifas e conídios).

Os tratamentos com HBO mostraram uma marcação dos elementos fúngicos com fluorescência branco azulada a branco amarelada dependendo do tratamento e que se intensificou com a desidratação das hifas com etanol.(Figuras 3A e 3B). A intensidade da fluorescência foi maior nos conídios do que nas hifas, sendo que nas hifas houve predomínio de fluorescência na vizinhança dos septos, sendo possível perceber a tridimensionalidade das estruturas fúngicas, principalmente das hifas. A impregnação com octanol levou a uma diminuição das fluorescência nas hifas previamente tratadas com etanol (Figura 3C) e a um efeito de dispersão da fluorescência perdendo-se nitidez na definição da microestrutura nas hifas não tratadas com etanol conforme Figura 3D. A marcação direta com fluorocromo dissolvido em dimetilsulfóxido na concentração de $8 \times 10^{-2}M$ com posterior lavagem leva à impregnação irregular, com deposição de cristais sobre a superfície das estruturas fúngicas e com excessiva fluorescência e perda da nitidez da imagem. Já o mesmo processo após tratamento prévio do micélio com etanol gera um padrão com melhor definição de imagem (Figura 3E) com maior fluorescência em conídios e em alguns relevôs da superfície das hifas havendo uma relação direta com regiões mais escuras quando a mesma imagem é visualizada por microscopia ótica (Figura 3F).

Durante a armazenagem das lâminas, o material corado com HBO não apresentou alterações na intensidade de fluorescência, mantendo-se estável à temperatura ambiente e exposto à luz e ao ar.

• Avaliação do espectro de absorção do derivado HAMBO em microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi*

A introdução do grupo NH_2 na posição 5' do radical fenila (HAMBO) altera o perfil de absorção das bandas de comprimento de onda longo (320-380nm) levando a uma diminuição na intensidade, um deslocamento para o vermelho e uma simplificação da estrutura vibrônica com sobreposição dos máximos de absorção e em relação ao HBO. Por outro lado o aumento da polaridade dos solventes causa efeitos semelhantes aos observados com o HBO.

Nas fotos de microscopia de epifluorescência de *Fonsecaea pedrosoi* com HAMBO, conforme apresentado nas Figuras 4 e 5, foi possível observar a marcação das células com os fluorocromos diferenciando-se apenas quanto à cor, à intensidade e à distribuição da fluorescência sobre as estruturas celulares avaliadas (hifas e conídios).

Os tratamentos com HAMBO permitiram a visualização das estruturas fúngicas com fluorescência amarelo dourada (Fig 4A-F), verde amarelada (Fig 5A) ou alaranjada (Fig 5B). O aumento do grau de desidratação e impregnação hidrofóbica das hifas (seqüência de métodos I, II e III) coincidiu com emissão de maior fluorescência e maior definição da microestrutura fúngica para a concentração de $8 \times 10^{-4} \text{M}$ (Fig 4A-C). Já o aumento da concentração do fluorocromo para $8 \times 10^{-2} \text{M}$ sem tratamento desidratante ou hidrofobizante (Método I) leva a uma diminuição da fluorescência e da definição de imagem do material celular (Fig 4F) em relação ao mesmo método na concentração de $8 \times 10^{-4} \text{M}$ (Fig 4 A). Comparando-se com a MO, a microscopia de fluorescência

com HAMBO ofereceu melhor visão tridimensional da microestrutura fúngica, revelando detalhes do relevo das hifas que normalmente não aparecem na MO (Fig 4C e D). A impregnação direta das hifas com octanol (tratamento IV) seguida pela coloração com solução $8 \times 10^{-4} \text{M}$ levou a uma maior definição de imagem com visualização tridimensional do corpo de frutificação (Fig 4E) quando comparado com os tratamentos I, II e III, não sendo observado o efeito de dispersão de fluorescência semelhante ao encontrado com HBO (Figura 3D). Por fim, a impregnação direta do micélio com octanol seguida por secagem, coloração com HAMBO a $8 \times 10^{-4} \text{M}$ e nova secagem sem lavagem posterior com etanol leva também a uma perda da nitidez da imagem e da fluorescência com desvio da tonalidade da cor (Fig 5 A), semelhante ao verificado no método IV com HBO na mesma concentração.

Durante a armazenagem das lâminas, o material corado com HAMBO não apresentou alterações na intensidade de fluorescência, mantendo-se estável à temperatura ambiente e exposto à luz e ao ar.

- Avaliação do espectro de absorção de fluoresceína em microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi*

Os tratamentos com fluoresceína apresentaram padrão praticamente semelhante, praticamente independente da concentração do fluorocromo, diferenciando-se apenas na intensidade da distribuição do fluorocromo ao longo da superfície das estruturas celulares (Figura 5C). Elementos intracelulares não foram observados sendo que a impregnação com o fluorocromo forneceu às estruturas fúngicas uma visualização parcialmente tridimensional, semelhante àquelas observadas em microscopia eletrônica de varredura. Nas condições em que se utilizou a maior diluição do fluorocromo, verificou-se uma melhor nitidez da imagem, sendo que os conídios apresentaram intensa

fluorescência com prejuízo da definição da imagem o mesmo acontecendo na área septal.

- Avaliação do espectro de absorção de Rodamina B em microcultivos de *Fonsecaea pedrosoi*

5 Os tratamentos com Rodamina B geraram padrões alterados de estrutura fúngica com excessiva fluorescência e baixa nitidez, alterações estas que se intensificaram com a diluição do fluorocromo (Figura 5D).

Células em suspensão não se mostraram apropriadas para a
10 identificação de aspectos micromorfológicos de *Fonsecaea pedrosoi* mostrando apenas hifas que se coraram fracamente com as benzoxazolas.

- Resultados referentes aos métodos de coloração empregando HBO e HAMBO em comparação com rodamina B e fluoresceína

15 Os resultados referentes aos métodos de coloração empregando HBO e HAMBO em comparação com rodamina B e fluoresceína indicaram algumas vantagens dos derivados benzoxazólicos em relação aos padrões principalmente no que se refere à identificação de detalhes da topografia celular da hifas e de corpos de frutificação em *Fonsecaea*
20 *pedrosoi*. Colorações com rodamina B e diacetato de fluoresceína associados ou não ao Calcofluor White já têm sido utilizadas para a identificação de aspectos morfofisiológicos de fungos nematófagos no solo, tais como *Arthrobotrys oligos* (Jensen et al, 1998). Nesta espécie de fungo diacetato de fluoresceína (um *probe* não fluorescente) tem sido
25 utilizado para diferenciar células com alta taxa metabólica tornando-as fluorescentes por hidrólise intracelular da ligação éster dos grupos acetatos. Os derivados utilizados neste trabalho não apresentam esta propriedade uma vez que não contêm grupos acetatos. Entretanto

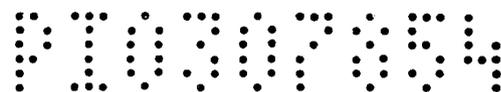
verificou-se inicialmente que tanto fluoresceína quanto rodamina B bem como os derivados HBO e HAMBO mostraram capazes de marcar as células em estudo de maneira diferenciada. Uma primeira observação efetuada demonstrou que benzoxazolas apresentaram melhores propriedades fluorescentes que rodamina B e fluoresceína quanto à resolução (definição) da parede celular. Na figura 3 e 4 pode se observar a marcação com HBO e HAMBO respectivamente, sobre micélio produzido por microcultivo em presença de solução de fluorocromos. Pôde-se visualizar a presença de septos bem como a formação de corpos de frutificação em padrão *Cladophialohora* com maior fluorescência sobre os conídios, sendo este efeito mais intenso para HAMBO. A desidratação das hifas com etanol levou a uma melhor definição da imagem em relação às hifas, porém comprometeu a visualização dos conídios devido à excessiva fluorescência neles observada. Cabe salientar que o princípio de marcação esperado baseou-se na impregnação ou na deposição de corantes sobre a superfície do micélio e em menor extensão na absorção através da membrana uma vez que a presença de solvente etanol favoreceria a desidratação da membrana e a penetração de metabólitos lipídicos por difusão.

O tratamento com octanol sem posterior aquecimento (método IV) gerou fluorescência difusa sobre a superfície das células comprometendo a definição da micromorfologia para a coloração com HBO (Figura 3D) porém melhorou em muito a resolução tridimensional quando corado com HAMBO. A coloração com HAMBO (Figura 4E), neste caso, evidenciou detalhes tridimensionais da vizinhança dos septos, semelhante ao comportamento observado com derivados de branqueadores ópticos e dermatófitos (Brasch, 2003). Uma variação no

método incluindo posterior secagem após impregnação com octanol (método V) comprometeu a definição de imagem sugerindo que, nestas condições, houve excessiva absorção de octanol pelo micélio, levando a um efeito de dispersão da fluorescência com embaçamento da imagem e que o tratamento com agente hidrofobizante deva ser controlado.

O emprego de HBO, HAMBO e fluoresceína permitiu a observação de morfologia microscópica variada de *Fonsecaea pedrosoi* à microscopia de epifluorescência comum a este representante da família *Herpotrichielaceae* (Lacaz, 1998; Kern & Blevins, 1999). Segundo Kern & Blevins (1999), a forma distintiva caracteriza-se por apresentar blastoconídios primários localizados na extremidade dos conidióforos que sustentam de um a quatro conídios secundários os quais, por sua vez, podem produzir de um a quatro conídios terciários. Por fim surgem cabeças de conídios esparsos. Podem estar ainda presentes, com menor frequência, outras três formas: cadeias ramificadas de blastoconídios (tipo *Cladosporium*); conídios unicelulares que emergem opostos uns aos outros na ponta do conidióforo (tipo *Rhinocladiella*) ou fiálides vasiformes com esferas de fialoconídios (tipo *Phialophora*). No presente estudo foi observada predominantemente a forma distintiva sendo melhor caracterizada pela marcação com fluorocromos à base de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazolas.

O fato da coloração com benzoxazolas apresentar maior fluorescência sobre os conídios terminais e sobre a área septal nas hifas pode ser explicado considerando-se dois fatores. Um primeiro fator seria um maior acúmulo de lipídios na membrana celular de conídios aumentando o caráter hidrofóbico e manifestando o efeito de hipercromia de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazolas (Formosinho & Arnaut, 1993; Douhal et al, 1994; Roberts et al, 1997). Um segundo fator seria



um maior espessamento da membrana levando a uma maior absorção local de fluorocromo. Para os conídios o primeiro caso parece ser a melhor explicação uma vez que já se tem verificado que conídios de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, quando cultivados em caldo Czapeck-Dox com 1% de extrato de levedura apresentam uma maior proporção de lipídios totais que as respectivas hifas (Gomes & Resende, 1991). No caso das regiões septais os dois efeitos estariam associados uma vez que pode se observar um maior espessamento da parede celular. A impregnação com octanol favoreceria um maior acúmulo deste reagente na vizinhança dos septos levando a um aumento da hidrofobicidade e, conseqüentemente, da fluorescência nesta região. Entretanto a presença de octanol em torno do material celular pode diluir o corante, como no caso do HBO ou HAMBO, aumentando a fluorescência por diminuição da autossupressão do estado excitado gerando embaçamento da estrutura. Este fenômeno é comumente observado com marcações com rodamina B, que cora principalmente material lipídico (Pearce 1984) e cuja intensidade de fluorescência aumenta à medida que se dilui o fluorocromo, levando a um quase total embaçamento da imagem. A validade de sua utilização parece estar relacionada com o seu uso em combinação com outros fluorocromos como Calcoflúor White permitindo então a diferenciação de conídios em relação às hifas como no caso do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* (Jensen & Lysek, 1995).

Um dos maiores problemas de uso da fluoresceína para marcação de material biológico é o rápido foto-esmaecimento (photo-fading, photobleaching) da fluorescência. Para prevenir este efeito adicionam-se inibidores de photobleaching (antifading inhibitor) tais como citifluor AF3 (Jensen & Lysek, 1995). Benzoxazolas, ao contrário, apresentam photo-

fading praticamente nulo devido ao mecanismo de fotoexcitação e fotoemissão que rapidamente regenera a população de moléculas no estado fundamental mesmo em exposição continuada de excitação, o que facilita a análise microscópica do material fúngico marcado por maior tempo (Campo, 1999). É interessante observar que a introdução do grupo amino leva a uma melhor definição da imagem com maior intensidade da fluorescência. Esta característica sugere uma interação com grupos polares ácidos e de resíduos de glicosídeos da superfície da parede celular de *Fonsecaea pedrosoi* que interagem com o grupo amino por ligação iônica ou ponte de hidrogênio.

O fato do material fúngico corado com HBO e HAMBO ter apresentado estabilidade durante a sua armazenagem mesmo exposto à oscilações naturais de umidade, luz, ar e temperatura ambiente reflete uma característica da estabilidade química do sistema 2-hidroxifenilbenzoxazólico. Nesta classe de moléculas, a presença da ponte de hidrogênio intramolecular protege o nitrogênio sp^2 de oxidação radicalar que, em caso contrário, poderia levar à perda da fluorescência.

Análise da micromorfologia de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 sob tratamento com fluoresceína e HAMBO através do Método 2

A Figura 6A apresenta os resultados obtidos com fluoresceína e a Figura 6B os resultados obtidos com HAMBO. Em ambos os casos, é possível observar a deposição de fluorocromos na parede das células, predominantemente nas extremidades de hifas jovens e na área septal. As imagens de fluoresceína e HAMBO ficaram parcialmente transparentes com contornos verde amarelado e azul esbranquiçado, respectivamente, com deposição localizada de fluoresceína em hifas mais velhas (parede celular e área septal) e frequência mais baixa de fruiting body do que aquela obtida com HAMBO. Na parece celular do



microorganismo corado com HAMBO, pode ser observada uma estrutura bilaminar, conforme detalhe na Figura 6B.

Análise da micromorfologia de *Aspergillus niger* sob tratamento com HAMBO4, HAMBI e HAMBT através do Método 3

5 Na amostra de *Aspergillus niger* os derivados 2-(2'-hidroxifenil)benzazolas permitiram a coloração de corpos de frutificação (conídios) de maneira diferenciada, onde se observa um aumento de intensidade nas extremidades das células conidiais (Figura 7). Com relação às hifas, observa-se um delineamento do contorno da
10 membrana celular em relação ao material citoplasmático, indicando a dupla camada da parede celular, sendo possível, em algumas células, a identificação de estruturas intracelulares.

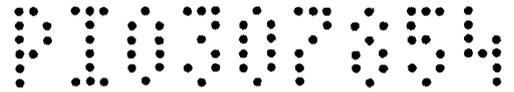
Análise da micromorfologia de *Candida albicans* sob tratamento com HAMBO4, HAMBI, HAMBT, BHMONO e BisBH através do 15 Método 3

Em *Candida albicans*, observa-se a fluorescência do material celular com diferentes cores, sendo possível identificar a gemulação (blastósporos) nas células mães em células mais isoladas, conforme apresentado na Figura 8.

20 O corante BHMONO (Figura 8D) mostrou diferentes tonalidades (laranja, catanho-claro, bege, azul) entre as células, o que pode estar relacionado com alterações da composição da membrana ao longo do ciclo celular, evidenciando o potencial deste fluorocromo na identificação da idade da célula.

Análise da micromorfologia de *Cryptococcus neoformans* sob tratamento com HAMBO4, HAMBI, HAMBT, BHMONO e BisBH através do Método 3

Em *Cryptococcus neoformans* também foi possível observar diferentes padrões de coloração intracelular, sendo identificadas apenas as cápsulas polissacarídicas, que praticamente não se coram, gerando um halo escuro em torno das células leveduriformes com um contorno fluorescente na periferia deste halo quando utilizado o fluorocromo HAMBO4 (Figura 9A), indicando a seletividade do fluorocromo HAMBO4 para outras biomoléculas que não os polissacarídeos. Os demais fluorocromos apresentaram também capacidade de diferenciar em maior ou menor extensão células em diferentes estágios do ciclo vital (Figuras 9B, 9C, 9D e 9E).



Reivindicações

MÉTODOS PARA CORAR MICROORGANISMOS UTILIZANDO FLUOROCROMOS DA FAMÍLIA DAS BENZAZOLAS E COMPOSTOS RELACIONADOS

1. Composição colorante para microscopia de fluorescência de microrganismos, caracterizada por compreender pelo menos um composto selecionado de um grupo de composto da família das benzazolas ou compostos relacionados.
2. Método de coloração de microrganismos para microscopia de fluorescência, caracterizado por contactar os referidos microrganismos com pelo menos um composto selecionado de um grupo que compreende compostos da família das benzazolas ou compostos relacionados.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelos microrganismos pertencerem ao reino *Fungi*.
4. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela amostra de microrganismo ser escolhida dentre microcultivo, suspensão de hifas e mistura das mesmas.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender adicionalmente pelo menos uma etapa de secagem.
6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela referida secagem ser feita com chama ou em temperatura ambiente.
7. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o referido corante ser dissolvido em um solvente selecionado do grupo que consiste de dimetilsulfóxido, etanol, octanol e mistura dos mesmos.
8. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender pelo menos uma etapa adicional de lavagem.
9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de a referida lavagem ser realizada com etanol.
10. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender adicionalmente pelo menos uma etapa de imersão das amostras em um solvente.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o referido solvente ser selecionado do grupo que compreende etanol, octanol, dimetilsulfóxido e mistura dos mesmos.
12. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela concentração do corante estar compreendida na faixa de $8,00 \times 10^{-1}$ M a $8,00 \times 10^{-5}$ M.
13. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo corante estar imobilizado em um suporte.
14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo suporte ser agar de dextrose de batata.

FIGURA 1

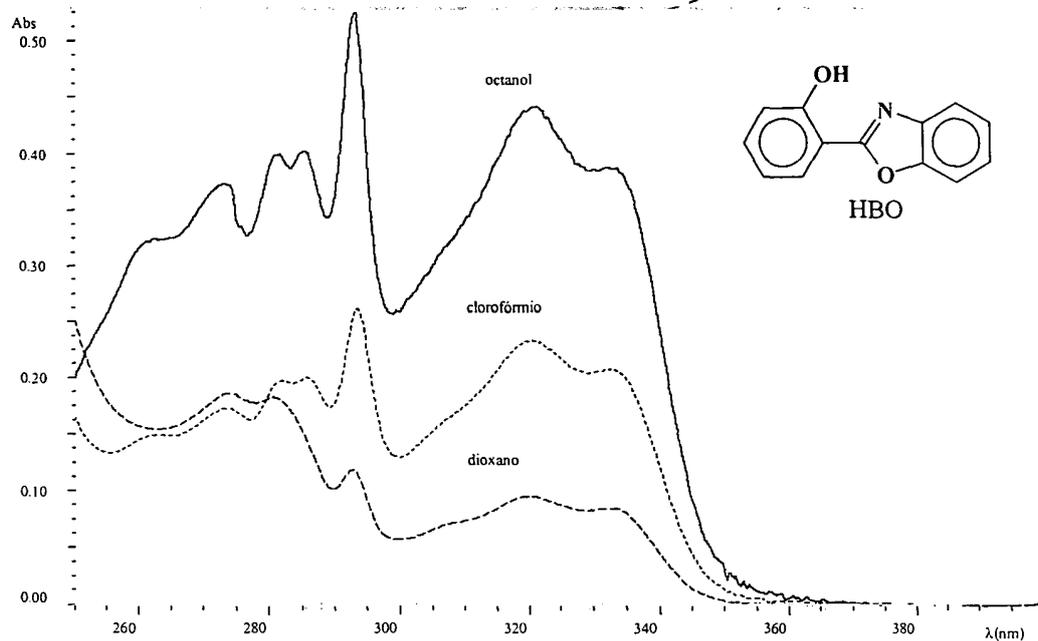


FIGURA 2

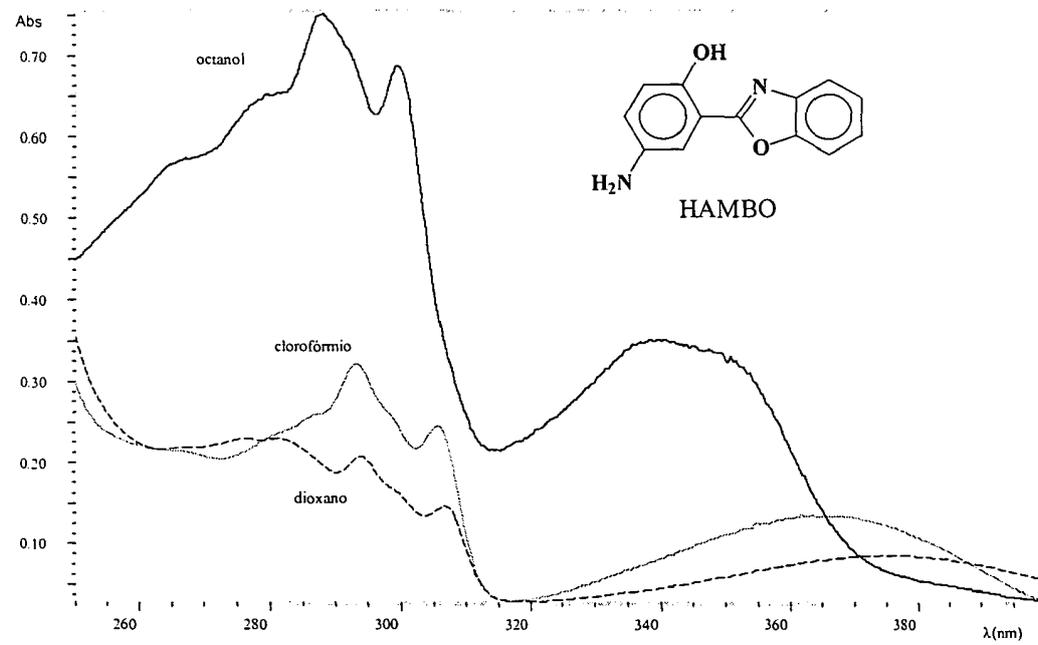


FIGURA 3

FIGURA 3A



FIGURA 3B

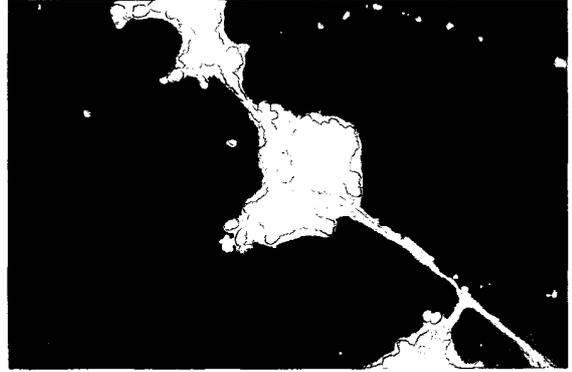


FIGURA 3C

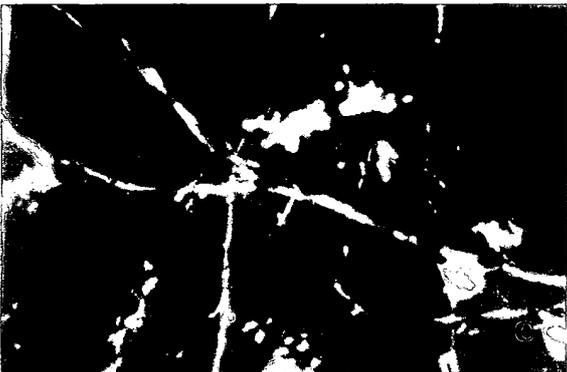


FIGURA 3D



FIGURA 3E

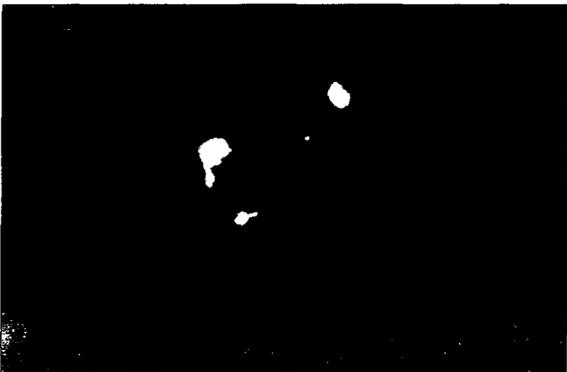


FIGURA 3F



FIGURA 4

FIGURA 4A



FIGURA 4B



FIGURA 4C

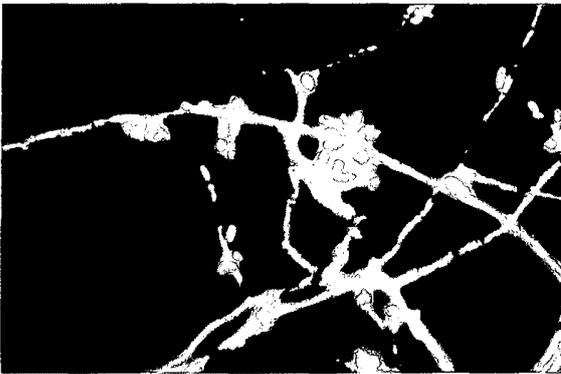


FIGURA 4D



FIGURA 4E



FIGURA 4F

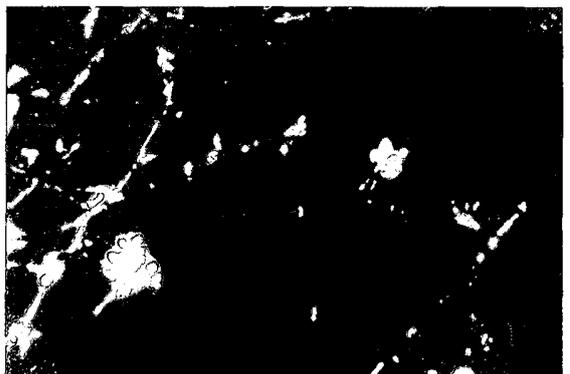


FIGURA 5

FIGURA 5A



FIGURA 5B



FIGURA 5C



FIGURA 5D



FIGURA 6

FIGURA 6A

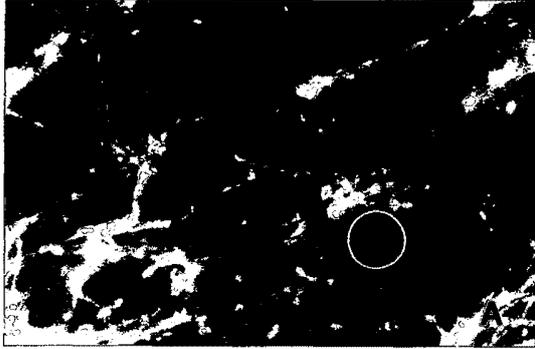


FIGURA 6B

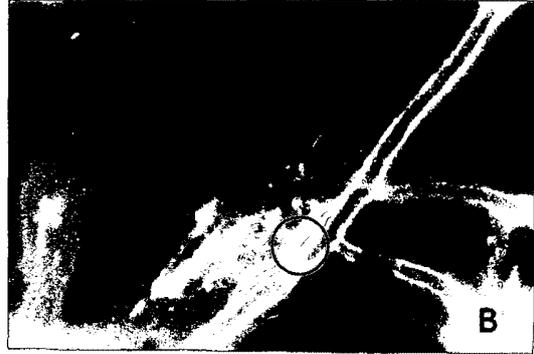


FIGURA 7

FIGURA 7A



FIGURA 7B

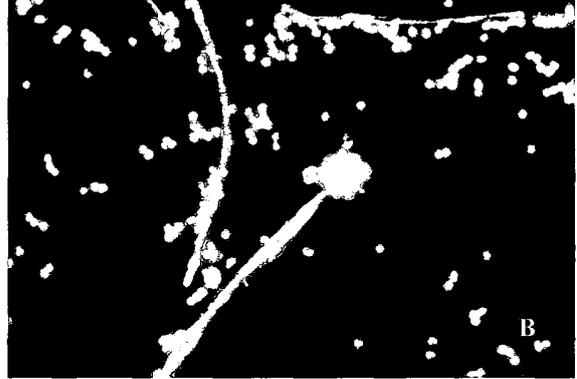


FIGURA 7C



FIGURA 8

FIGURA 8A



FIGURA 8B



FIGURA 8C



FIGURA 8D

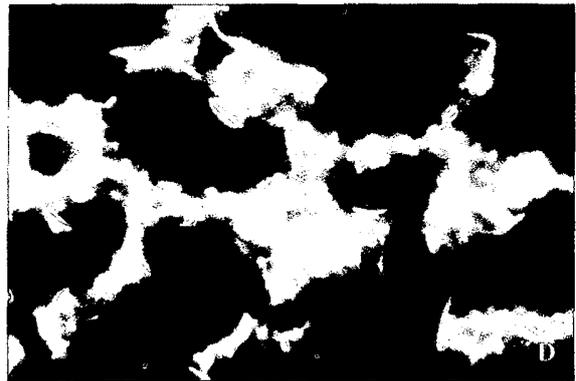
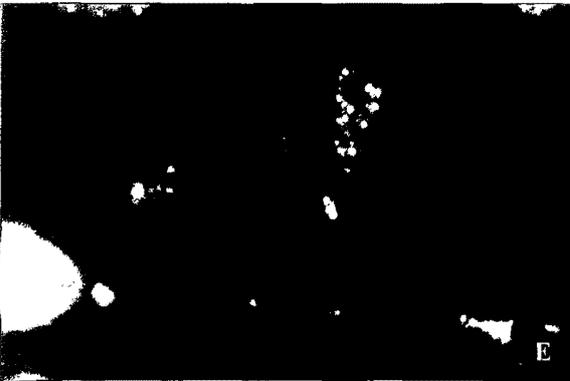


FIGURA 8E



P0307054

FIGURA 9

FIGURA 9A

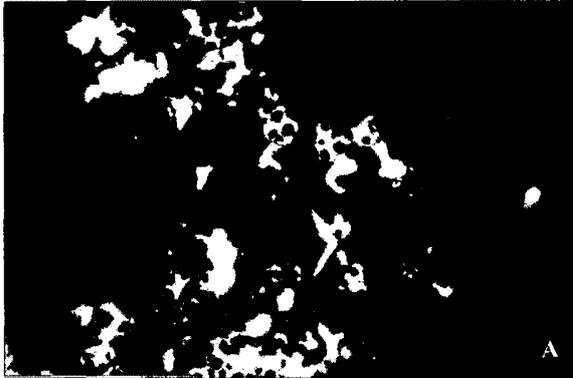


FIGURA 9B

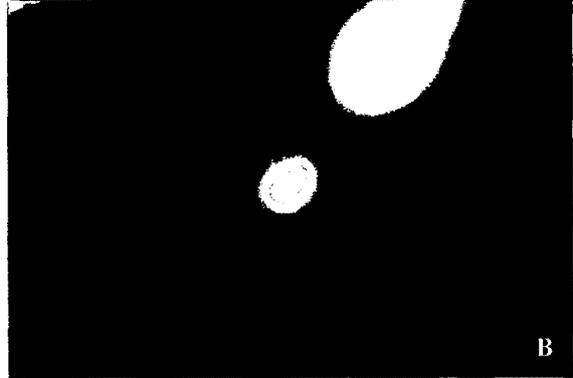


FIGURA 9C

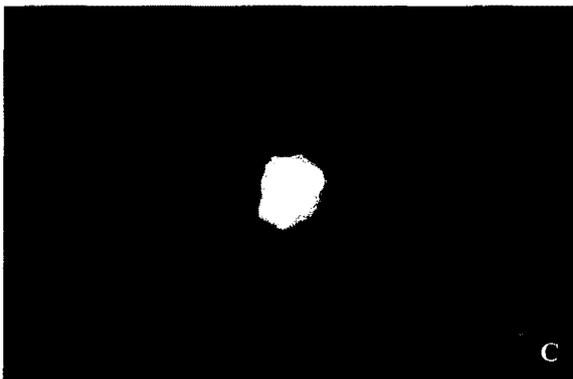


FIGURA 9D

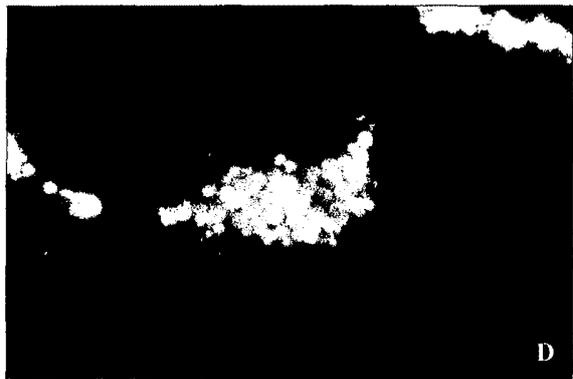
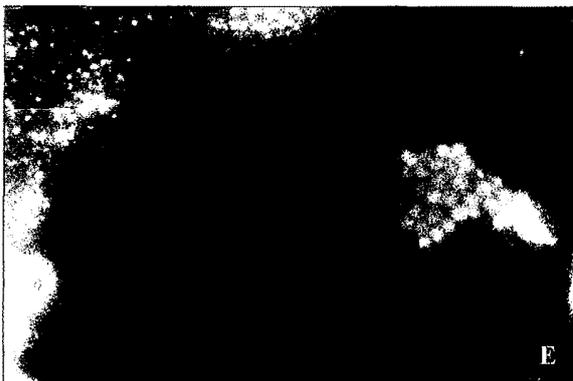


FIGURA 9E



RESUMO**MÉTODOS PARA CORAR MICROORGANISMOS UTILIZANDO
FLUOROCROMOS DA FAMÍLIA DAS BENZAZOLAS E COMPOSTOS
RELACIONADOS**

5 São descritos métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas (benzoxazolas, benzimidazolas e benzotiazolas) e compostos relacionados (pirimido-, naftaleno-, antraceno-, pirenoazolas, entre outros) para estudos de morfologia microbiana por microscopia de epifluorescência.

10 Os corantes fluorescentes são incorporados no micélio vegetativo e reprodutor de fungos e leveduras durante crescimento em microcultivo, sendo possível o diagnóstico microbiológico uni e multicelulares, em diferentes estágios de desenvolvimento e organização celular, a possibilidade de diferenciação entre células vivas e células mortas e o desenvolvimento de probes moleculares para avaliação *in situ* de
15 atividades enzimáticas específicas, tais como amidase, nitrorredutase, azorredutase, oxidase, entre outros, de forma a selecionar microorganismos para a indústria farmacêutica e de alimentos, tratamento de efluentes e biodeterioração de estruturas metálicas e não
20 metálicas.