

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE CORANTE FLUORESCENTE EM HELMINTOS E  
PROTOZOÁRIOS DIAGNOSTICADOS POR FLUTUAÇÃO SIMPLES**

**RAQUEL GLASENAPP**

**PORTO ALEGRE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE CORANTE FLUORESCENTE EM HELMINTOS E  
PROTOZOÁRIOS DIAGNOSTICADOS POR FLUTUAÇÃO SIMPLES**

**Autor: Raquel Glasenapp**

**Trabalho apresentado à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
obtenção da graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientador: Valter Stefani**

**Coorientador: Sandra Márcia Tietz Marques**

**PORTO ALEGRE**

**2016**

Dedico este trabalho ao meu bebê Ian, que é a maior de todas as minhas conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Jorge e Maria Marlene, que fundamentaram meu caráter e me apontaram o caminho correto.

Ao meu marido, Emerson, que é minha segurança em todos os aspectos, meu companheiro incondicional, sempre presente me apoiando a conciliar trabalho, estudo e maternidade.

Ao professor e orientador deste trabalho, Valter, por ter aceitado me orientar mesmo eu sendo de outro curso.

Em especial a minha coorientadora, Sandra, que não mediu esforços para me apoiar, tendo sido crucial em todo o trabalho, sem ela nada seria possível.

## RESUMO

Corantes benzazólicos apresentam intensa emissão de fluorescência, além de estabilidade térmica e fotoquímica, tornando-os ideais para uso como marcadores biológicos, podendo ser usados para estudos morfológicos e estruturais de fungos e parasitos. São considerados, porém, limitados devido a baixa solubilidade em meio aquoso. O presente trabalho apresenta uma nova aplicação para um corante fluorescente denominado ácido 4-hidroxi-3- (6-metilbenzo[d]oxazol-2-il) benzenosulfônico (HB-9), recentemente descrito na literatura, que possui aumentada a solubilidade em água e a reatividade com biomoléculas devido a presença de radicais hidrofílicos em sua estrutura. Objetivou-se portanto testar o uso deste corante em ovos de helmintos e oocistos de protozoários observados sob diferentes filtros e diagnosticados pela técnica de flutuação simples (método de Willis-Mollay), sob microscopia óptica. As amostras positivas foram observadas em microscopia de epifluorescência. Ovos de *Acuaria spiralis*, *Capillaria spp.*, *Bertiella spp.* e oocistos de *Eimeria spp.* apresentaram fluorescência quando visualizados sob diferentes filtros. Ovos de *Strongyloidea* e *Strongyloides papillosus* não foram visíveis sob microscopia de fluorescência. Com base nestes resultados, o corante fluorescente HB-9 mostrou-se uma opção potencialmente interessante na marcação de ovos e oocistos de parasitos, podendo ser futuramente utilizado em técnicas de rotina.

**Palavras-chave:** Benzazóis. Corante fluorescente. Biomarcadores. Parasitos.

## **ABSTRACT**

*Benzazolic dyes present intense fluorescence emission, in addition to thermal and photochemical stability, making them ideal for use as biological markers, and can be used for morphological and structural studies of fungi and parasites. However, they are considered limited because of their low solubility in aqueous environment. The present study shows a new application for a fluorescent dye called 4-hydroxy-3-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-yl) benzenesulfonic acid (HB-9), recently described in the literature, which has increased solubility in water and reactivity with biomolecules due to the presence of hydrophilic radicals in their structure. The objective was to test the use of this dye in helminth eggs and protozoan oocysts observed under different filters and diagnosed by the simple flotation technique (Willis-Mollay method), under optical microscopy. The positive samples were observed under epifluorescence microscopy. Eggs of *Acuaria spiralis*, *Capillaria* spp., *Bertiella* spp. and *Eimeria* spp. oocysts presented fluorescence when viewed under different filters. Eggs of *Strongyloidea* and *Strongyloides papillosus* were not visible under fluorescence microscopy. Based on these results, the fluorescent dye HB-9 was shown to be a potentially interesting option in the marking of parasites eggs and oocysts, and could be used hereafter in routine techniques.*

**Keywords:** *Benzazoles. Fluorescent dye. Biomarkers. Parasites.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Espectros de absorvância e de emissão de fluorescência do corante HB-9 em solução aquosa, usando comprimento de excitação de 324 nm.....	16
<b>Figura 2</b> –	Imagens de microscopia óptica e de epifluorescência de ovos de <i>Acuaria spiralis</i> , após marcação com o corante HB-9 e aumento de 20X.....	16
<b>Figura 3</b> –	Imagens de microscopia óptica de oocisto de <i>Eimeria</i> spp. e de epifluorescência de oocistos de <i>Eimeria</i> spp. e <i>Bertiella</i> spp., após marcação com corante HB-9 na concentração de 1 mM. Filtro UV. 10X.....	17
<b>Figura 4</b> –	Imagens de microscopia óptica e de epifluorescência de ovos de <i>Capillaria</i> spp, após marcação com o corante HB-9 na concentração de 1mM. 40X e 20X.....	17
<b>Figura 5</b> –	Imagem de microscopia óptica de ovos de <i>Strongyloides papillosus</i> e <i>Strongyloidea</i> pela técnica de Willis.....	17

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	9
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	19



## 1 INTRODUÇÃO

Algumas biomoléculas apresentam fluorescência intrínseca, que permite investigações por métodos de medição de fluorescência; ao contrário, muitos sistemas biológicos não são fluorescentes ou apresentam uma fraca fluorescência. Corantes fluorescentes como derivados cumarínicos, isotiocianato de fluoresceína e outros, têm sido sintetizados e conjugados a sistemas biológicos para agirem como sondas fluorescentes, capazes de mostrar detalhes das estruturas celulares e de organismos microscópicos (MASON, 1993; RODEMBUSCH *et al.*, 2005). Alguns compostos, como os heterocíclicos da família dos benzazóis são muito atraentes uma vez que exibem diversas e importantes propriedades biológicas. Estes compostos têm mostrado diferentes atividades farmacológicas, tais como antiviral (SONG *et al.*, 2005), antibiótico (EVANS *et al.*, 1979), antifungo (YAMATO, 1992), anticancer (KUMAR *et al.*, 2002), antimicrobial (YILDIZ-OREN *et al.*, 2004), e anti-Parkinson (BENAZZOUZ *et al.*, 1995).

Estes corantes têm se mostrado muito eficazes para uso em técnicas de determinação, qualificação e quantificação na parasitologia (BARROS; MARQUES; STEFANI, 2016). Além disso eles possuem alta estabilidade fotoquímica, fotofísica e térmica, elevado rendimento quântico de fluorescência, grande estabilidade nos meios biológicos facilitando as análises por microscopia, sua captura fotográfica e o armazenamento das amostras coradas por longos períodos sem alterar sua cor e fluorescência. Sua elevada fluorescência tem motivado também pesquisas visando aplicações como corantes para laser e ótica não linear, monômeros para a síntese de polímeros fluorescentes ou como sondas para marcação de proteínas (HOLLER *et al.*, 2002; STEFANI *et al.*, 2003; CORBELLINI, 2004).

As técnicas baseadas em fluorescência provêm um meio eficiente para qualificar e quantificar o diagnóstico, significando suficiência na detecção de uma simples célula ou microorganismo, quando as condições são otimizadas, tendo-se apenas o cuidado de discriminar daquelas de autofluorescência. Técnicas de seleção espectral são úteis para suprimir a autofluorescência, mas nem sempre são aplicáveis, por causa da abundância e alcance espectral de autofluoróforos (CONNALLY; JIN; PIPER, 2006).

Este trabalho de conclusão de curso tem como objetivo apresentar resultados do corante HB-9 a ser utilizado no estudo de parasitos que acometem os animais. O trabalho é apresentado no formato de artigo científico e está formatado para submissão na Revista *Parasitología Latinoamericana* (ISSN: 0719-6326).

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Avaliação de corante fluorescente em helmintos e protozoários diagnosticados por flutuação simples**

#### **Benzazolic fluorescent dye evaluation in helminth and protozoa diagnosed by simple flotation**

MARQUES SMT.<sup>1</sup>, GLASENAPP R.<sup>1</sup>, BARROS HL.<sup>2</sup>, STEFANI V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Helminthoses, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Novos Materiais Orgânicos e Química Forense (LNMO-QF), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.  
Correspondência: Sandra Márcia Tietz Marques

#### **RESUMO**

Este relato mostra a marcação de helmintos e oocistos de protozoários, diagnosticados em animais domésticos, pelo corante fluorescente denominado ácido 4-hidroxi-3-(6-metilbenzo[d]oxazol-2-il) benzenosulfônico (HB-9), usando microscopia de epifluorescência. Foram testados ovos de *Acuaria spiralis*, *Strongyloides papillosus*, *Capillaria* spp., *Bertiella* spp., *Strongyloidea* e oocistos de *Eimeria* spp. identificados previamente através da técnica de Willis. As amostras positivas foram observadas em microscópio BEL Photonics INV-100 FL Plus com sistema de Epi-Fluorescência. Ovos de *Acuaria spiralis*, *Capillaria* spp., *Bertiella* spp. e oocistos *Eimeria* spp. apresentaram fluorescência. O corante mostrou ser capaz de marcar as estruturas parasitárias de modo seletivo, facilitando a visualização, de forma simples e rápida, do material de interesse, com exceção de ovos *Strongyloidea* e de *Strongyloides papillosus* que não foram visíveis sob microscopia de fluorescência.

**Palavras-chave:** Benzazóis, corante fluorescente, biomarcadores, parasitos.

#### **ABSTRACT**

This report shows the marking of helminth eggs and protozoa oocysts diagnosed in domestic animals, by fluorescent dye named 4-hydroxy-3-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-yl) benzenesulfonic acid (HB-9), using epifluorescence microscopy. Eggs of *Acuaria spiralis*, *Strongyloides papillosus*, *Capillaria* spp., *Bertiella* spp., *Strongyloidea* and *Eimeria* spp. oocysts were tested, previously identified by the Willis technique. Positive samples were analyzed in BEL Photonics INV-100 FL Plus microscope with an Epi-fluorescence system. Eggs of *Acuaria spiralis*, *Capillaria* spp., *Bertiella* spp. and *Eimeria* spp. oocysts showed fluorescence. The dye revealed to be able to mark parasitic structures selectively, making it easy to view the material of interest in a quick and simple way, except for *Strongyloidea* and *Strongyloides papillosus* eggs, which were not visible by fluorescence microscopy.

**Keywords:** Benzazoles; fluorescent dye; biomarkers; parasites.

## INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são seculares, cosmopolitas, de prevalência variada, algumas re-emergentes acometendo animais e seres humanos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que as parasitoses humanas são responsáveis por dois a três milhões de óbitos por ano no mundo, e existindo cerca de 84 milhões de indivíduos infectados por *Ascaris lumbricoides* e de 100 milhões por *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos (Hotez et al. 2008). Em termos globais, aproximadamente 300 milhões de pessoas sofrem algum grau de severidade, entretanto o maior impacto das helmintíases transmitidas pelo solo decorre do mau desenvolvimento físico e mental em crianças (World Health Organization 2012). Em animais domésticos e silvestres, parasitoses tem relevância em saúde pública pelo caráter zoonótico. Os parasitos ocorrem praticamente em todos os níveis tróficos e sua transmissão pode depender da presença de uma variedade de hospedeiros intermediários, paratênicos e definitivos dentro do ecossistema. Essa complexidade de fatores exerce importantes efeitos sobre as populações de seus hospedeiros, alterando o comportamento, sucesso reprodutivo e mortalidade. Os efeitos também são econômicos no caso de muitas espécies animais silvestres são considerados importantes indicadores ambientais (Godoy & Cubas 2011), podendo representar uma ameaça para os programas de manejo e recuperação de populações animais, o que assume particular importância para espécies ameaçadas. Por isso, a identificação da fauna parasitária é exigida em protocolos de reintrodução e na rotina clínica de animais silvestres (Godoy & Cubas 2011, Bandelj et al. 2015, Santos et al. 2015).

Fluoróforos são compostos de ampla aplicação tecnológica, uma vez que possuem grande sensibilidade de detecção e são facilmente observáveis. Na área de sondas biológicas, possui potencialidades apreciáveis, pois facilita e acelera as leituras microscópicas. Compostos heterocíclicos benzazólicos apresentam intensa emissão de fluorescência, além de alta estabilidade térmica e fotoquímica, antes e depois de sua utilização. Estes compostos têm

mostrado diferentes atividades farmacológicas, tais como antiviral (Song et al. 2005), antibiótico (Evans et al. 1979), antifungo (Yamato 1992), anticancer (Kumar et al. 2002), antimicrobial (Yildiz-Oren et al. 2004), e anti-Parkinson (Benazzouz et al. 1995). Nós mostramos aqui o uso de um corante fluorescente com grupos hidrofílicos que aumentam a solubilidade em água e reatividade com biomoléculas, já relatado previamente no diagnóstico de *Oxyurisequipelo* pelo teste de Graham (Barros & Stefani 2016, Barros et al. 2016). Dentre suas diversas aplicações possíveis, está a coloração fluorimétrica de amostras parasitológicas para visualização rápida e precisa de cistos, ovos e larvas de helmintos e protozoários de interesse para diagnóstico e/ou de pesquisa. Diferente das técnicas imunofluorimétricas, os corantes sintetizados aderem diretamente aos parasitos, o que possibilitaria seu uso em rotina clínica. O diagnóstico parasitológico através de técnicas apropriadas, com rapidez, sensibilidade, especificidade e custo baixo são fundamentais para fazer frente aos desafios de controle e poder monitorar as taxas de infecção com rapidez e custo baixo. Portanto o objetivo deste estudo é avaliar a compatibilidade de impregnação/fixação do corante fluorescente ácido 4-hidroxi-3- (6-metilbenzo[d]oxazol-2-il) benzenosulfônico (HB-9) na visualização de estruturas parasitárias em microscopia de fluorescência, facilitando o diagnóstico parasitológico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Procedimentos gerais para síntese de benzazol fluorescente solúvel em água***

Todos os reagentes e solventes utilizados na síntese foram adquiridos na Sigma-Aldrich, Acros ou Merck e foram usados sem qualquer purificação. A síntese do composto foi obtida conforme patente número BR102014030942 (Stefani & Barros 2014), descrito com o ácido 4-hidroxi-3- (6-metilbenzo[d]oxazol-2-il) benzenosulfônico, denominado HB-9.

A Figura 1 mostra os espectros de absorção e de emissão corante HB-9, usando o comprimento de excitação de 324nm. Esse corante é solúvel em água e apresenta o máximo

de absorção a comprimento de onda de 350 nm e emissão de fluorescência a 450 nm. Uma intensa emissão de fluorescência (verde) é observada, tanto no estado sólido como em solução, quando o corante é excitado sob luz ultravioleta de 365 nm.

### ***Exames coprológicos pela técnica de Willis (1921) e análises microscópicas***

Amostras de fezes de rouxinol (*Luscinia megarhynchos*), ovinos (*Ovis aries*), bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) e galinha raça Rhode Island Red foram recebidas para exame parasitológico de fezes (EPF) no Laboratório de Helmintoses da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e processadas no prazo máximo de 24 horas do recebimento. O método diagnóstico rotineiro se baseia no princípio da flutuação com solução saturada de cloreto de sódio (Willis 1921). Os ovos e oocistos foram identificados de acordo com suas características morfológicas (Hendrix & Robinson 2012, Bowman 2014). O material foi examinado em microscópio óptico (MO), de marca Olympus CX 40, com objetivas de 10X, 20X e 40X. Após a visualização em MO, as amostras positivas foram observadas em microscópio de marca BEL Photonics INV-100 FL Plus com sistema de Epi-Fluorescência (MF) com filtros Verde, Azul, Violeta e Ultravioleta, e equipado com câmera CCD Blacklight. No momento da leitura da lâmina, acrescentou-se 100µl da solução HB-9. Primeiramente, o material é examinado usando objetiva de 10X e de 20X com luz reduzida. As amostras positivas em MO foram observadas em seguida por MF.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram diagnosticados ovos de *Acuaria spiralis* em rouxinol, *Capillaria* spp. em galinha, *Strongyloides papillosus* e ovos tipo Strongyloidea em fezes de ovinos, oocistos de *Eimeria* spp. e ovos de *Bertiella* spp. em bugio-ruivo. Ovos de *Acuaria spiralis* (Figura 2),

*Bertiella* spp. e oocistos de *Eimeria* spp. (Figura 3) e ovos de *Capillaria* spp. (Figura 4) apresentaram fluorescência e melhor visualização nos filtros Ultravioleta e Azul. Como se pode ver na Figura 2 foi possível observar a presença da larva em *Acuaria spiralis*, demonstrando assim que o corante HB-9 foi capaz de atravessar a parede de *A. spiralis*. O corante mostrou ser capaz de marcar as estruturas parasitárias de modo seletivo, facilitando a visualização do material de interesse.

Ovos tipo Strongyloidea e *Strongyloides papillosus* presentes na amostra fecal de ovino não foram visíveis sob microscopia de fluorescência (Figura 5). Os ovos de *Strongyloides papillosus* apresentam-se embrionados por larva infectante -L1- (assim como ovos de *A. spiralis*) entretanto o corante HB-9 não marcou a parede dos ovos ou atravessou-a, porém marcou L1 bem como a parede de *A. spiralis*. Embora as amostras fecais de ovinos ou de rouxinol eram frescas (recebidas e processadas no mesmo dia), não foram marcadas, provavelmente, devido à ausência de proteínas na sua composição, que interagiriam com os corantes utilizados. Por outro lado, mostrou seletividade, não corando debris, esporos de fungos, por exemplo, que normalmente estão presentes na flutuação obtida com material fecal. No entanto, o fato de outras estruturas tornarem-se fluorescentes não representa uma desvantagem do método, pois a morfologia dos ovos e oocistos é facilmente distinguível.

Não houve diferença na qualidade das estruturas parasitárias visualizadas quando a solução era gotejada diretamente na lâmina, imediatamente após a análise por MO, porque o corante não reage de modo especial com a solução saturada de cloreto de sódio (densidade é igual a 1.20). O tempo de um minuto é suficiente para a visualização. Algumas espécies de helmintos não coraram, possivelmente devido a diferenças em suas estruturas. Os fluoróforos usados apresentam vantagens sobre a imunofluorescência, pois não necessitam de anticorpos para aderência nos parasitos, e a metodologia é relativamente simples e barata.

No caso dos oocistos de coccídeos detectados e avaliados neste estudo, não foram identificados ao nível das espécies, embora as amostras positivas tenham sido posteriormente submetidas à esporulação. O tamanho, forma, cor, textura e tipo de conteúdo interno são importantes características utilizadas na identificação de oocistos de coccídeos. Em estudos posteriores serão avaliados oocistos esporulados na tentativa de caracterizar os esporocistos e a presença ou não do corpo Stieda, um tampão proteináceo encontrado em uma extremidade do esporocisto. Estudos do ciclo de vida indicam que espécies de *Isospora* com um corpo Stieda são geralmente monoxenos e confinado aos intestinos, ao passo que as espécies que não possuem um corpo Stieda frequentemente podem usar hospedeiros paratênicos, podem ter estágios latentes no hospedeiro, e podem ser facultativamente heteroxenos. Todas as espécies importantes de *Isospora* que infectam os seres humanos, primatas não humanos, cães, gatos, e mamíferos domesticados não têm um corpo Stieda em seus esporocistos.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados mostram o potencial de utilização do HB-9 como sonda biológica na marcação de ovos e oocistos de parasitos. Houve marcação e visualização de ovos morilados e embrionados. Entretanto, estudos de tempo de impregnação, concentração e quantidade de corante são alguns pontos que devem ser avaliados. Estes resultados são significantes, indicando perspectivas de estudo para o desenvolvimento de um novo método para o diagnóstico laboratorial.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao PEC-PG/CNPq pela bolsa de Programa de Estudante Convênio de Pós-graduação (Hélio Barros).

## REFERÊNCIAS

- Bandelj P, Blagus R, Trilar T, Vengust M, Rataj AV. Influence of phylogeny, migration and type of diet on the presence of intestinal parasites in the faeces of European passerine birds (*Passeriformes*). *Wildl Biol*. 2015; 21(4):227-33.
- Barros HL, Stefani V. A new methodology for the visualization of latent finger marks on the sticky side of adhesive tapes using novel fluorescent dyes. *Forensic Sci Int*. 2016; 263:83-91.
- Barros HL, Marques SMT, Stefani V. The use of epifluorescence microscopy and fluorescent dyes for visualization of *Oxyuris equi* eggs. *Vet Parasitol*. 2016; 226:162-6.
- Benazzouz A, Boraud T, Dubedat P, Boireau A, Stutzmann JM, Gross C. Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *Eur J Pharmacol*. 1995; 284(3):299-307.
- Bowman DD. *Georgi's parasitology for veterinarians*. 10th ed. St. Louis: Elsevier, 2014.
- Evans DA, Sacks CE, Kleschick WA, Taber TR. Polyether antibiotics synthesis: total synthesis and absolute configuration of the ionophore A-23187. *Am Chem Soc*. 1979; 101(22):6789-91.
- Godoy SN, Cubas ZS. Doenças virais e parasitárias em Psittaciformes: revisão. *Clín Vet*. 2011; 16(90):32-44.
- Hendrix CM, Robinson E. *Diagnostic parasitology for veterinary technicians*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2012.
- Hotez PJ, Bottazzi MA, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of latin america and the caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2008; 2(9):e300[11 pp.]. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553488/pdf/pntd.0000300.pdf>.
- Kumar D, Jacob MR, Reynolds MB, Kerwin SM. Synthesis and evaluation of anticancer benzoxazoles and benzimidazoles related to UK-1. *Bioorg Med Chem*. 2002; 10(12):3997-4004.
- Santos PMS, Silva SGN, Fonseca CF, Oliveira JB. Parasitos de aves e mamíferos silvestres em cativeiro no estado de Pernambuco. *Pesq Vet Bras*. 2015; 35(9):788-94. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015000900004>.
- Song X, Vig B S, Lorenzi P L, Drach JC, Towensend LB, Amidon GL. Amino acid ester prodrugs of the antiviral agent 2-bromo-5,6-dichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)benzimidazole as potential substrates of hPEPT1 transporter. *Eur J Med Chem*. 2005; 48(4):1274-7.
- Stefani V, Barros HL inventores; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, depositante. Método de obtenção de derivados benzazólicos fluorescentes e sua aplicação em ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes, Patent Pending, BR1020140309420.

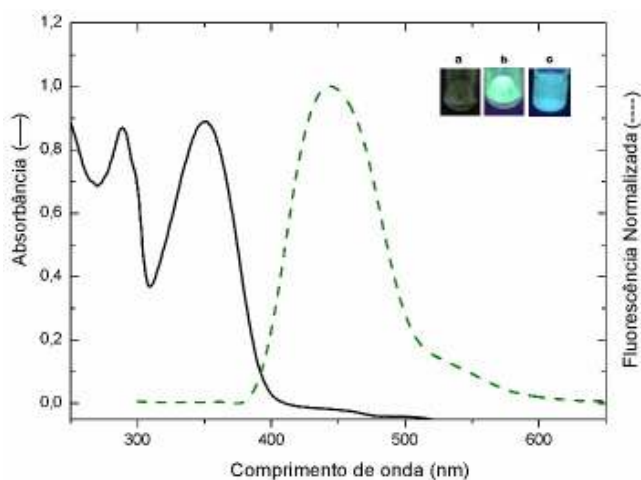


2014 dec 10. [cited 2016 Oct 5]. Available from:  
<https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>.

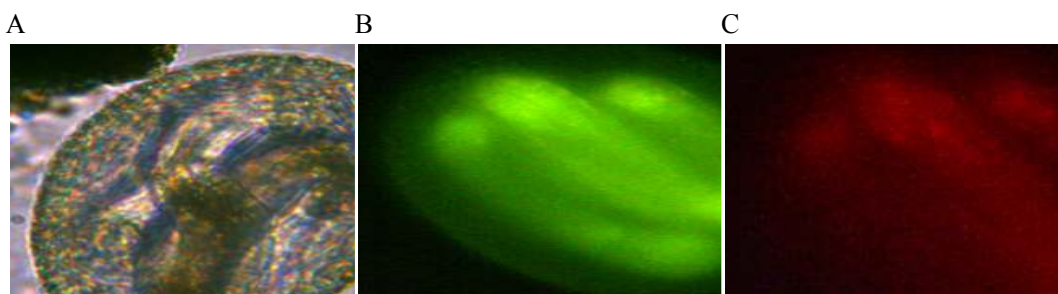
World Health Organization. Research priorities for helminth infections: technical report of the TDR disease reference group on helminth infections [Internet]. Geneva, 2012. 196 p. WHO Tech Report Ser 972. [cited 2016 Oct 5]. Available from:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO\\_TRS\\_972\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO_TRS_972_eng.pdf).

Yamato M. Study on the development of biological-active compounds after the model of natural products. J Pharm Soc Japan. 1992; 112(2):81-99.

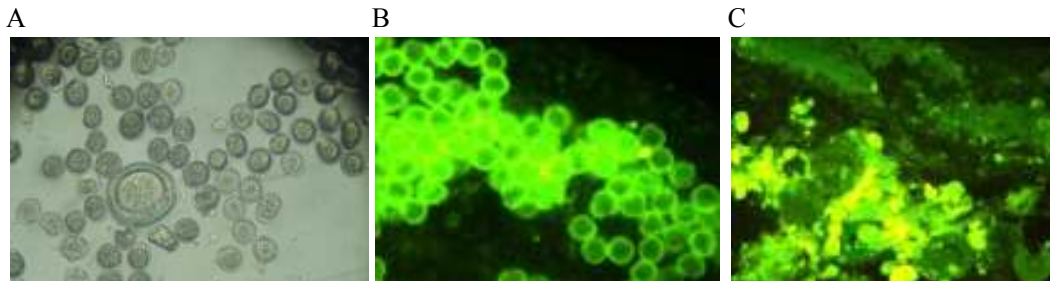
Yildiz-Oren I, Yalcin I, Aki-Sene E, Ucarturk N. Synthesis and structure-activity relationships of new antimicrobial active multisubstitue benzazole derivatives. Eur J Med Chem. 2004; 39(3):291-8.



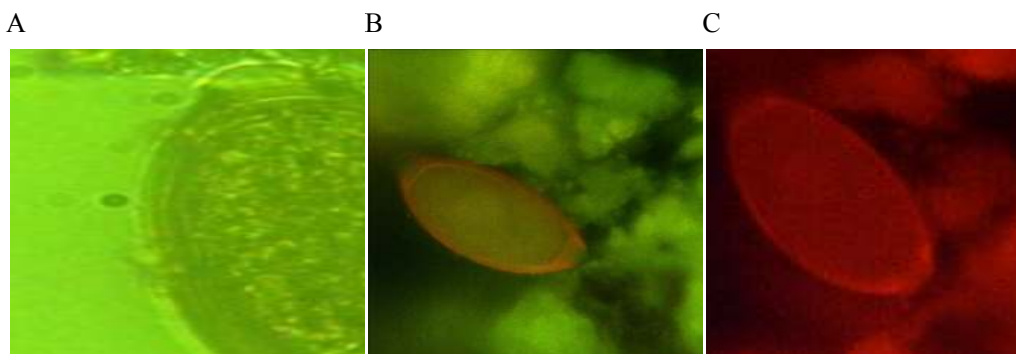
**Figura 1.** Espectros de absorvância e de emissão de fluorescência do corante HB-9 em solução aquosa, usando comprimento de excitação de 324 nm. a) corante no estado sólido sob luz visível, b) corante no estado sólido sob luz ultravioleta - 365nm, e c) corante em solução aquosa sob luz ultravioleta – 365nm.



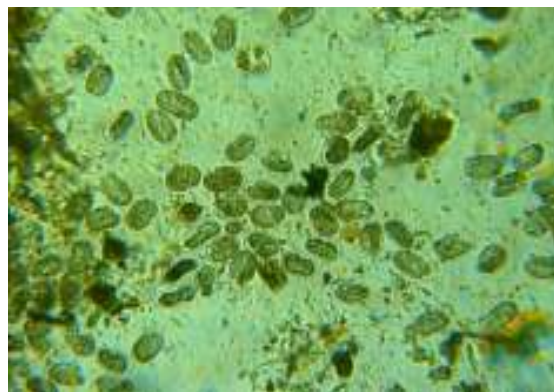
**Figura 2.** Imagens de microscopia óptica (A) e de epifluorescência (B – filtro azul e C-filtro verde) de ovos de *Acuarina spiralis*, após marcação com o corante HB- e aumento de 20X.



**Figura 3.** Imagens de microscopia óptica de oocisto de *Eimeria* spp. (A) e de epifluorescência de oocistos de *Eimeria* spp.(B) e *Bertiella* spp. (C), após marcação com o corante HB-9 na concentração de 1 mM. Filtro UV. 10X



**Figura 4.** Imagens de microscopia óptica (A) e de epifluorescência (B – filtro ultravioleta e C-filtro verde) de ovos de *Capillaria* spp, após marcação com o corante HB-9 na concentração de 1mM. 40X (A/C) e 20X (B)



**Figura 5.** Imagem de microscopia óptica de ovos de *Strongyloides papillosus* e *Strongyloidea* pela técnica de Willis. Nesse caso, o corante HB-9 não foi eficiente na marcação dos ovos. 10X

### **3 CONCLUSÃO**

O novo corante benzazólico HB-9 apresentou bom resultado na marcação de helmintos e oocistos de protozoários, diagnosticados em animais domésticos. Como vantagem em relação à técnica de imunofluorescência, é o fato de aderir diretamente no parasito, facilitando a rotina clínica.

O corante apresenta baixo custo de produção e grande estabilidade das amostras marcadas.

Os resultados deste trabalho sinalizam o corante fluorescente HB-9 como uma opção potencialmente interessante na marcação de ovos e oocistos de parasitos.

## REFERÊNCIAS

- BANDELJ, P. *et al.* Influence of phylogeny, migration and type of diet on the presence of intestinal parasites in the faeces of European passerine birds (*Passeriformes*). **Wildlife Biology**, Washington, DC, v. 21, n. 4, p. 227-233, June, 2015. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/pdf/10.2981/wlb.00044>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- BARROS, H. L.; MARQUES, S. M.; STEFANI, V. The use of epifluorescence microscopy and fluorescent dyes for visualization of *Oxyurisequi* eggs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 226, p. 162-166, Aug. 2016.
- BARROS, H. L.; STEFANI, V. A new methodology for the visualization of latent fingerprints on the sticky side of adhesive tapes using novel fluorescent dyes. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 263, p. 83-91, June 2016.
- BENAZZOZ, A. *et al.* Riluzole prevents MPTP-induced Parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 284, n. 3, p. 299-307, Sept. 1995.
- BOWMAN, D. D. **Georgi's parasitology for veterinarians**. 10<sup>th</sup> ed. St. Louis: Elsevier, 2014. 477 p.
- CONNALLY, R.; JIN, D.; PIPER, J. High intensity solid-state UV source for time-gated luminescence microscopy. **Cytometry A**, Hoboken, v. 69, n. 9, p. 1020-1027, Sept. 2006.
- CORBELLINI, V. A. **Síntese e avaliação de propriedades fotofísicas e biológicas de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazolas e cumarinas em fungos de interesse clínico**. 2004. 273 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- EVANS, D. A. *et al.* Polyether antibiotics synthesis. Total synthesis and absolute configuration of the ionophore A-23187. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 101, n. 22, p. 6789-6791, Oct. 1979.
- GODOY, S. N.; CUBAS, Z. S. Doenças virais e parasitárias em Psittaciformes: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 90, p. 32-44, jan./fev. 2011.
- HENDRIX, C. M.; ROBINSON, E. **Diagnostic parasitology for veterinary technicians**. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2012. 392 p.
- HOLLER, M. G. *et al.* Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2'-hydroxyphenyl) benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Amsterdam, v. 149, n. 1/3, p. 217-225, June 2002.
- HOTEZ, P. J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Bethesda, v. 2, n. 9, e300 [11 p.], Sept. 2008. doi:10.1371/journal.pntd.0000300. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553488/pdf/pntd.0000300.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2016.

KUMAR, D. *et al.* Synthesis and evaluation of anticancer benzoxazoles and benzimidazoles related to UK-1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 10, n. 12, p. 3997-4004, Dec. 2002.

MASON, W. T. (Ed.). **Fluorescent and luminescent probes for biological activity: a practical guide to technology for quantitative real-time analysis**. London: Academic Press, 1993. 433 p.

RODEMBUSCH, F. S. *et al.* Synthesis and spectroscopic characterization of new ESIPT fluorescent protein probes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 254-259, Mar. 2005.

SANTOS, P. M. S. *et al.* Parasitos de aves e mamíferos silvestres em cativeiro no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 9, p. 788-794, set. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n9/1678-5150-pvb-35-09-00788.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2016.

SONG, X. *et al.* Amino acid ester prodrugs of the antiviral agent 2-bromo-5,6-dichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)benzimidazole as potential substrates of hPEPT1 transporter. **Journal of Medical Chemistry**, Washington, DC, v. 48, n. 4, p. 1274-1277, Feb. 2005.

STEFANI, V. *et al.* **Métodos para corar microorganismos utilizando fluorocromos da família das benzazolas e compostos relacionados**. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. PI0307854-0. Depósito: 10 nov. 2003. Publicação: 13 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/m-todos-para-corar-microorganismos-utilizando-fluorocromos-da-fam-lia-das-benzazolas-143768.html>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

STEFANI, V.; BARROS, H. L. B. **Método de obtenção de derivados benzazólicos fluorescentes e sua aplicação em ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes**. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR1020140309420. Depósito: 10 dez. 2014, Publicação: 5 jul. 2016. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>>. Acesso em: 10 set. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research priorities for helminth infections: technical report of the TDR disease reference group on helminth infections**. Geneva: WHO Press, 2012. 174 p. (WHO Technical Report Series, 972). Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO\\_TRS\\_972\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO_TRS_972_eng.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2016.

YAMATO, M. Study on the development of biological-active compounds after the model of natural products. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 112, n. 2, p. 81-99, Feb. 1992

YILDIZ-OREN, I. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of new antimicrobial active multisubstituted benzazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 39, n. 3, p. 291-298, Mar. 2004. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0223523404000029/1-s2.0-S0223523404000029-main.pdf?\\_tid=aa02c9e0-bbd7-](http://ac.els-cdn.com/S0223523404000029/1-s2.0-S0223523404000029-main.pdf?_tid=aa02c9e0-bbd7-)

11e6-8a3d-0000aacb362&acdnat=1481044742\_946263e4f739889c9c0af77dcbc126ca>.  
Acesso em: 23 set. 2016.