

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CLORAMINA T FRENTE A CEPAS BACTERIANAS QUE APRESENTAM MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

THOBIAS TONILO DE SOUZA¹, MILENA MATTES CERVEIRA¹, LUÍZE GARCIA DE MELO¹, CRISTIANE TELLES BAPTISTA¹, JANICE LUEHRING GIONGO², RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas - thobias.toniolo@gmail.com, cerveiramm@gmail.com, luizegarmel@gmail.com, pequenatellesbaptista@gmail.com

² Faculdade Anhanguera – janicegiongo@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, certos compostos utilizados em indústrias têm como objetivo a esterilização e a desinfecção de materiais e alimentos (NASCIMENTO; ALENCAR, 2014). Compostos como o hipoclorito de sódio e a clorexidina são conhecidamente usados em ambientes hospitalares, odontológicos e alimentícios (HORTENSE, et al, 2010) (SILVA; CADIMA, 2010). Outro composto amplamente utilizado nesses ramos é o sal Cloramina T, um sal sintético que pertence a classe de liberadores do grupamento clorina (ARNITZ et. al., 2009), garantindo ao composto um alto poder oxidativo, e, por isso, é amplamente empregada nas áreas odontológicas (BUSDADORI et al., 2011) (NOGUEIRA et. al. 2021) (RANGEL, 2018), alimentícias (KRISHNA, 2013), veterinárias e agrícolas (MARTÍNEZ, 2017), e incubatórios (NAYAK et. al., 2021) como desinfetante e bactericida.

O estudo sobre estes compostos conhecidamente com ações antibacterianas, em especial a Cloramina T, torna-se importante frente à incidência de cepas bacterianas com mecanismos de resistência, as quais estão se tornando alarmantes, pois são associadas a diversos fatores e são listadas como ameaças em potencial para a saúde humana (WHO; 2020). Um dos principais exemplos destes mecanismos são cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), documentada desde a década de 60 (GELATTI; et al, 2009) e tendo bastante incidência na área hospitalar (MENEGOTTO; PICOLI, 2007). Outro exemplo são cepas bacterianas formadoras de biofilme, sendo este último uma estrutura heterogênea que é capaz de defender células de antibacterianos, e é um dos principais mecanismos de resistência encontrado na área hospitalar, porém havendo relatos em outras áreas além desta, tendo como uma das principais representantes de produtoras de biofilme cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (LAILA; SANTOS, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade da Cloramina T frente a duas cepas bacterianas com mecanismos de resistência conhecidos: uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), através da técnica de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton.

2. METODOLOGIA

As concentrações da solução da cloramina T (SIGMA – ALDRICH) utilizadas foram estabelecidas a partir de resultados de outros trabalhos (FERREIRA, et al. 2017) (CINCAROVA et al, 2016), sendo estas: 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM e 0,5 mM realizadas em água destilada estéril. A cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) foi obtida através de um



isolado clínico; a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) foi recuperada da bacterioteca do LaPeBBioM. Ambas foram, primeiramente, enriquecidas em caldo BHI (Himedia) em um tempo entre 18 e 24 horas entre 35°C e 37°C. Após, as cepas foram cultivadas em ágar Nutriente (MRSA) (Himedia), e agar MacConkey (PA01) (Himedia) em um tempo entre 18 e 24 horas entre 35°C e 37°C. Para a realização do ensaio de disco-difusão em ágar, foi seguido o protocolo de disco-difusão pelo método Kirby-Bauer. Resumidamente, inóculos das cepas testadas foram preparados em uma escala de turbidez 0,5 McFarland (absorbância de 0,08 a 0,1 em 600nm). Os inóculos foram semeados em placas contendo meio Mueller-Hinton, e, após a semeadura, discos brancos (LB) foram distribuídos na placa. Como controle positivo, a cepa MRSA teve como controle um disco de Oxacilina 1 µg; a cepa PA01 teve como controle um disco de Imipenem 10 µg. Foi pipetado nos discos brancos, após fixados na placa, 10µL de cada solução de Cloramina T, e, após, foi incubado entre 35°C e 37°C em um tempo de 18 a 24 horas. Os halos de inibição foram lidos em milímetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma das concentrações de Cloramina T foi detectada atividade antibacteriana nos ensaios de disco difusão. Esperava-se qualquer tamanho de halos nos ágar, pois, de acordo com a literatura, a Cloramina T tem atividade antimicrobiana, porém até o presente momento, não há resultados padronizados de halos para comparação em cepas resistentes utilizadas. Os discos de oxacilina não formaram halo na placa semeada com MRSA, comprovando ser uma cepa resistente a meticilina. Na placa semeada com PA01, o disco controle de Imipenem teve um tamanho de halo de 12 mm, indicando que essa cepa é resistente ao antibiótico testado como controle.

Embora estudos apontem positivamente a utilização da Cloramina T para uso antibacteriano e antibiofilme, foram observados resultados em que cepas de *Staphylococcus aureus* aumentaram a produção de biofilme na utilização da substância em doses sub-letais (CINCAROVA, 2016) (SLANY, 2017). Além disso, o composto, apesar de seu alto potencial oxidativo, possui uma molécula maior que outros desinfetantes, como por exemplo, a monocloroamina e o hipoclorito de sódio o que acaba influenciando em seu potencial biocida (ARNITZ et. al., 2009). Esses dados levantam hipóteses do porquê a cloramina T não ter causado nenhum efeito nos testes realizados.

Além disso, mecanismos de resistência bacterianas estão relacionados a genes que expressam proteínas que garantem essa característica às células bacterianas. O MRSA possui o gene *mecA*, que altera proteínas ligadoras de penicilina (PBP2a) diminuindo a afinidade a penicilinases, do qual faz parte o antibiótico meticilina, utilizado em última linha de defesa contra *Staphylococcus aureus* (GELATTI; et al, 2009). Também contribuem para um suposto aumento da resistência, os mecanismos de produção de biofilme, já bem consolidados na literatura (RATHER, et al, 2021). Estes são conhecidamente capazes de blindar as células bacterianas frente a antimicrobianos e desinfetantes. Assim, é possível supor que os mecanismos citados possam ter impedido a ação do composto neste estudo.

4. CONCLUSÕES

Devido aos resultados não condizerem com a literatura, serão necessários mais estudos frente a outras cepas de microorganismos para o entendimento dos

resultados contraditórios aos relatados atualmente. Por fim, através dos resultados expostos apresentados neste estudo preliminar, observou-se que a Cloramina T não teve atividades antimicrobianas frente as cepas bacterianas multirresistentes testadas (MRSA e PA01) no teste de disco-difusão em ágar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antibiotic resistance. World Heath Organization. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- ARNITZ, R. et al. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 164-170, 2009.
- BUSSSADORI, S.K. et al. Clinical and Radiographic Study of Chemical-Mechanical Removal of Caries Using Papacárie: 24-Month Follow Up. **Journal of Clinical Pedi-atric Dentistry**, v. 3, n. 35, p. 251-254, 2011.
- CINCAROVA, L. et al. Changes in the Expression of Biofilm-Associated Surface Proteins in *Staphylococcus aureus* Food-Environmental Isolates Subjected to Sub-lethal Concentrations of Disinfectants. **BioMed Research International**, v. 2016. 12 p, 2016.
- FERREIRA, G. L. S. et al. Antibiofilm Activity and Mechanism of Action of the Disinfectant Chloramine T on *Candida* spp., and Its Toxicity against Human Cells. **Molecules** v.22 n. 1527, 15p. 2017
- GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 84, n. 5, p. 501-506, out. 2009.
- HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, São Paulo, v.22, n2, p178-184, 2010.
- KRISHNA, K. C. B. et al. Microbial community changes with decaying chloramine residuals in a lab-scale system. **Water Research**, v. 47, p. 4666-4679, 2013.
- LAILA, H. J. E. A; SANTOS, R. C. V. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.
- MARTÍNEZ, M. A. et al. Induction of cytochrome P450-dependent mixed function oxidase activities and peroxisome proliferation by chloramine-T in male rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- MENEGOTTO, F. R., PICOLI, S. U. Staphylococcus aureus oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**.v.39, n.2, p 147 – 150, 2007.
- NASCIMENTO, E. D. do; ALENCAR, F. L. S. Eficiência antimicrobiana e antiparasitária de desinfetantes na higienização de hortaliças na cidade de natal - RN. **Ciência e Natura**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 92-106, 2014.
- NAYAK, Y. N. et al. Chloramine-T (N-chloro-p-toluenesulfonamide sodium salt), a versatile reagent in organic synthesis and analytical chemistry: An up to date review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26. 32 p, 2021.
- NOGUEIRA, E. C. P. et al. O uso do Papacárie®como estratégia do controle do estresse na odontopediatria. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12. 6 p, 2021.
- RANGEL, M.L.R. et al. Ação antifúngica da cloramina t em cepa de *Candida albicans*. **Revista Campo do Saber**, v. 4, n. 5, p. 47-70, 2018.

RATHER, M. A. et al. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1701-1718, 2021.

SILVA, G; DUTRA, P.R.S; CADIMA, I.M. Higiene na indústria de alimentos. Sergipe: EDUFRPE, 2010, 132p.

SLANY, M. et al. Formation of *Staphylococcus aureus* biofilm in the presence of sub-lethal concentrations of disinfectants: a transcriptomic analysis using RNA -seq. **Applied and Environmental Microbiology**. 36 p, 2017.