

ENSAIO HEMOLÍTICO DO COMPOSTO CLORAMINA T PARA AVALIAÇÃO CITOTÓXICA FRENTE A ERITRÓCITOS

THOBIAS TONIOLI DE SOUZA¹, RAFAELY PICCIONI ROSADO², MATHEUS PEREIRA DE ALBUQUERQUE², ANALICE BARCELLOS BALHEGO² JANICE LUEHRING GIONGO², RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – thobias.toniolo@gmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – rafaelypiccioni@hotmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – matheusalbuquerque813@gmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – analiceisabel@hotmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – janicegiongo@hotmail.com*

³*Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM)-Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O ensaio hemolítico é um dos principais testes que são utilizados em laboratórios de pesquisa quando se trata da triagem (*screening*) de atividades de novos fármacos e substâncias. Sendo um teste laboratorial relativamente acessível quando se trata de custos, avalia a capacidade de um agente de causar a destruição de eritrócitos, determinando assim, a toxicidade frente a fármacos que são idealizados para aplicação intravenosa (KALAIVANI, 2010; PAGANO AND FAGGIO, 2015). Este ensaio, apesar de inúmeras variações, é centralizado em expor eritrócitos ao composto a ser utilizado (ANSARI et al., 2015). Esse cenário possibilita o uso desse teste para a determinação de concentrações padrão para novas fórmulas com compostos que já são encontrados no mercado atual.

Dentre estes inúmeros compostos, a Clorammina T (figura 1), sal sintético que apresenta grupamento clorina ativo conferindo alta capacidade de oxidação (ARNITZ et. al., 2009), possui destaque pois apresenta conhecidamente atividade antibacteriana (HASHMI et al, 2020). O composto vem sendo amplamente usado como desinfetante e bactericida nas áreas odontológicas (BUSSADORI et al., 2011; NOGUEIRA et. al. 2021; RANGEL, 2018), alimentícias (KRISHNA, 2013), veterinárias e agrícolas (MARTÍNEZ, 2017). A clorammina T também é usada em incubatórios devido ao seu potencial desinfetante conhecido (NAYAK et. al., 2021). Trabalhos recentes mostram que a Clorammina T possui atividade contra a erradicação de biofilmes de *Candida spp.* (FERREIRA, 2017), *Pseudomonas spp.* (KEKEÇ et. al., 2016) e *Staphylococcus spp.* (RAY, 2020).

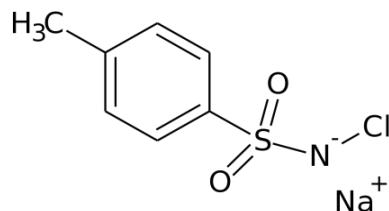


Figura 1: Estrutura química da Clorammina T

O uso da Clorammina T para diversas formulações, entretanto, é controverso. Apesar de seu baixo índice citotóxico, é considerada prejudicial quando inalada, ingerida ou quando entra em contato com mucosas, como mostra o estudo conduzido por Shim e colaboradores (2013) além de constar essas informações na ficha de informação do produto. No estudo citado anteriormente, observou-se que a intensidade da toxicidade desse composto é dose-dependente, além de ter acarretado danos no fígado e no pulmão de ratos que foram testados. Em um trabalho conduzido por Kloth e colaboradores (2007), demonstrou-se que em doses baixas, fibroblastos cultivados in vitro não sofreram mudanças significativas na sua formologia e viabilidade celular, porém, em doses altas, houve alterações significativas quanto aos dois parâmetros citados.

Tendo em vista novas formulações contendo clorammina T como composto ativo, o objetivo desse trabalho foi a realização do ensaio hemolítico para a determinação das concentrações padrão do composto, bem como a determinação da sua curva de dose letal em relação a esse ensaio.

2. METODOLOGIA

A clorammina-T (nº CAS 7080-50-4) foi obtido através da compra via internet diretamente do site da empresa Sigma – Aldrich.

O ensaio hemolítico foi realizado seguindo o protocolo descrito por Vaucher, Motta e Brandeli (2010) com alterações. Brevemente, o ensaio hemolítico foi realizado com sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) diluído em tampão fosfato-salino a 4%, distribuído 400µL em 8 microtubos cônicos tipo eppendorf. O ensaio foi realizado em duplicata e em diluições seriadas de base 2 do composto testado, com sua concentração-mãe em 200mM. Após as diluições seriadas, os tubos contendo o sangue já em tratamento com o composto foi submetido a incubação sob agitação em uma estufa do tipo shaker a 28°C durante 1h. Fez-se a centrifugação a 2000rpm dos tubos após a incubação, e, do sobrenadante destes, foi retirado 200 µL e distribuídos em uma placa de 96 poços, lida em uma leitora de microplacas a 405nm.

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism v.8.0.1, analisados através de ANOVA de 1 via. Após, para a obtenção dos gráficos de IC50, foi utilizado o método de regressão não linear com uma curva variável em função de dose resposta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Ensaio hemolítico da clorammina T revelou que o composto possui uma capacidade citotóxica dose-dependente, como previsto e observado no trabalho de Shim e colaboradores (2013). Nas concentrações de 100mM a 3,125mM o composto apresentou alta capacidade hemolítica, com resultados iguais ou similares estatisticamente ao controle positivo. A figura abaixo (figura 2) mostra todas as concentrações testadas, assim como evidencia as concentrações que não obtiveram atividade hemolítica.

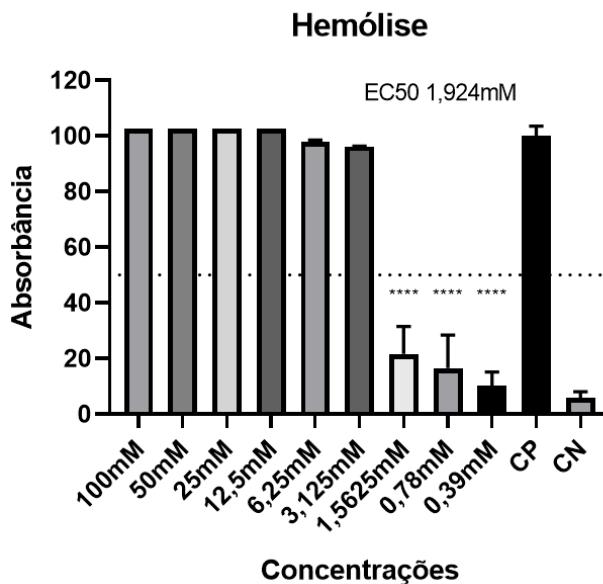


Figura 2: Concentrações testadas de cloramina T no ensaio hemolítico.

Outros autores também já utilizaram a cloramina T em ensaios hemolíticos, como Ferreira e colaboradores (2017), que obtiveram atividade hemolítica entre demonstraram atividade hemolítica entre 61% e 67,7% em concentrações que variam de 88.75 a 2.70 mmol/L. Isso corrobora com o resultado obtido, visto que não obtivemos valores altos de absorbância da hemólise em valores abaixo de 1,5625mM, e, após as análises estatísticas, obteve-se o valor de IC50 de 1,924mM.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, conclui-se que a cloramina T possui uma atividade hemolítica expressiva quando avaliada através do ensaio hemolítico, visto que a concentração em que foi avaliada uma redução desta atividade foi de 1,5625mM. Além disso, a concentração da IC50, de 1,924mM reafirma o potencial hemolítico para com eritrócitos.

Novos ensaios de citotoxicidade precisarão ser performedos para a definição de uma concentração visando a realização de uma nova formulação contendo o composto. Ensaio esses como MTT e Vermelho Neutro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARI, Fariheen Aisha; ALI, Shaikh Nisar; MAHMOOD, Riaz. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology In Vitro*, [S.L.], v. 29, n. 7, p. 1878-1886, out. 2015.

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 Pediatric Dentistry*, v. 3, n. 35, p. 251-254, 2011.

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, 15 p, 2017.



HASHMI, A. et al. Chloramine-T/N-Bromosuccinimide/FeCl₃/KIO₃ Decorated Graphene Oxide Nanosheets and Their Antibacterial Activity. **Nanomaterials**, v. 10, n. 105. 17 p, 2020.

KALAIIVANI, T., et al. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2011, 8p., 2010

KEKEÇ, Ö. et al. Effects of Chlorine Stress on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Analysis of Related Gene Expressions. **Current Microbiology**, 2016.

KLOTH, L. C. et al. Bactericidal and Cytotoxic Effects of Chloramine-T on Wound Pathogens and Human Fibroblasts In Vitro. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 20, n. 6, p. 331-345.

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.

MARTINEZ, C. S. et al. Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish. **Biophysical Reviews**, v. 9, p. 775-791, 2017.

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 de controle do estresse na odontopediatria. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12. 6 p, 2021

PAGANO, M., FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**. v.33, p. 351-355, 2015

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.

RAY, A. et al. *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory protein A (GbaA) is a monothiol-dependent electrophile sensor. **Biochemistry**. 40 p, 2020.

SHIM, I. et al. Inhalation exposure to chloramine T induces DNA damage and inflammation in lung of Sprague-Dawley rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 6, p. 937-946, 2013.

VAUCHER, R. A.; MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. **Cell biology international**, v. 34, n. 3, p. 317-323, 2010.