



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

ANA JULIA FOGANHOLI CARVALHO FERNANDES

SÍNTESE E ESTUDO DE TAURINA CLORAMINA E COMPOSTOS CORRELATOS
COMO POTENCIAIS ANTISSÉPTICOS

BAURU

2017

ANA JULIA FOGANHOLI CARVALHO FERNANDES

**SÍNTESE E ESTUDO DE TAURINA CLORAMINA E COMPOSTOS CORRELATOS
COMO POTENCIAIS ANTISSÉPTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2017

Fernandes, Ana Julia Foganholi Carvalho

Síntese e estudo de taurina cloramina e compostos correlatos como potenciais antissépticos /
Ana Julia Foganholi Carvalho Fernandes, 2017. p. 67.

Orientador: Prof^o. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista,
Licenciatura em Química. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017.

1. Taurina 2. Antisséptico 3. Desinfetante 4. Cloraminas.

ANA JULIA FOGANHOLI CARVALHO FERNANDES

**SÍNTESE E ESTUDO DE TAURINA CLORAMINA E COMPOSTOS CORRELATOS
COMO POTENCIAIS ANTISSÉPTICOS**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Legendre

Me. Luiza de Carvalho Bertozo

Dedico este trabalho a minha família, que me apoiou e me deram base para a conclusão do curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me proporcionado todos os momentos felizes e tristes ao longo desse período, que me levou ao crescimento profissional e pessoal para toda uma vida.

Ao professor Valdecir, que desde o primeiro momento me prestou todo o auxílio necessário para o meu desenvolvimento e conclusão deste trabalho, entendendo minhas dificuldades e buscando me compreender. E ao professor Alexandre, que desde o início do curso sempre se prontificou em toda ajuda e auxílio durante a graduação.

À minha mãe, Vanessa, que sempre me deu todo o suporte necessário para que sempre tivesse forças para continuar, me auxiliando e compreendendo durante todo o tempo.

Ao meu pai, José Eduardo, por toda educação e apoio para o término do curso.

Às minhas irmãs, Maria Eduarda e Cecília, por toda compreensão e ajuda.

Ao meu namorado Marcelo, por toda a dedicação e apoio na qual me proporcionou um melhor desempenho durante todo o curso e na vida, ao saber me ouvir e me aconselhar nas decisões que por vezes tive que tomar, e a mim eram árduas.

Aos meus colegas de sala, em especial à minha amiga, Maria Laura, que desde o início esteve comigo em todos os momentos, sendo uma grande parceira de curso e de vida, na qual me ajudou em minha formação. E a Luiza, que me ajudou com todo o suporte no laboratório, e durante os experimentos.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram e torceram para que eu chegasse até o presente momento.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Diante do crescimento da demanda por novos produtos e técnicas para esterilização de ambientes e indivíduos, faz-se necessário estudos para o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade antisséptica. A taurina cloramina (Tau-Cl) é um dos diversos compostos que podem ser utilizados como antissépticos. A Tau-Cl apresenta bom poder de desinfecção e alta estabilidade quando utilizada para esses devidos fins. Na Tau-Cl, suas propriedades oxidantes são atribuídas ao grupo N-Cl. Neste sentido esta monografia apresenta estudos sobre propriedades químicas de moléculas correlatas a taurina visando o desenvolvimento de alternativas a Tau-Cl. Para isso, os compostos β -alanina cloramina, fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina foram sintetizados no intuito de analisar sua estabilidade na concentração, quando comparados com a taurina cloramina. Verificamos que apenas β -alanina cloramina apresentou estabilidade e reatividade semelhante Tau-Cl, sugerindo que a mesma possa ser utilizada como antisséptico.

Palavras chave: Taurina, antisséptico, desinfetante, cloraminas.

ABSTRACT

Faced with the growing demand for new products and techniques for sterilization of environments and requirements, studies are needed to develop new molecules with antiseptic capacity. A taurine chloramine (Tau-Cl) is one of several compounds that can be used as antiseptics. Tau-Cl has good disinfection power and high stability when applicable for these fins. At Tau-Cl, its assets are assigned to the N-Cl group. In this sense, this monograph presents studies on the chemical properties of molecules related to taurine aiming at the development of alternatives to Tau-Cl. For this, the compounds β -alanine chloramine, phosphoethanolamine chloramine and α -alanine chloramine were synthesized without the intention of analyzing their stability in concentration, when compared to taurine chloramine. We found that only β -alanine chloramine showed Tau-Cl stability and reactivity, suggesting that it is like being used as an antiseptic.

Keywords: Taurine, antiseptic, disinfectant, chloramines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da taurina	16
Figura 2 - Síntese da taurina	18
Figura 3 - Estrutura das cloraminas	21
Figura 4 - Mecanismo de ação do cloro e compostos clorados	24
Figura 5 - Classificação do poder oxidativo de compostos	36
Figura 6 - Estrutura molecular dos aminoácidos estudados	43
Figura 7 - Espectros da absorbância do ácido hipocloroso, por espectrofotômetro UV-Vis..	44
Figura 8 - Espectros da absorbância da taurina, por espectrofotômetro UV-Vis	44
Figura 9 - Espectros da absorbância da β -alanina, por espectrofotômetro UV-Vis	45
Figura 10 - Espectros da absorbância da fosfoetanolamina, por espectrofotômetro UV-Vis.	45
Figura 11 - Espectros da absorbância da α -alanina, por espectrofotômetro UV-Vis	46
Figura 12 – Decomposição da taurina cloramina em função do tempo.	47
Figura 13 - Decomposição da β -alanina cloramina em função do tempo.....	48
Figura 14 - Decomposição da fosfoetanolamina cloramina em função do tempo.	49
Figura 15 - Decomposição da α -alanina cloramina em função do tempo.	50
Figura 16 - Determinação da concentração das N-cloraminas, em determinado intervalo de tempo	51
Figura 17 - Emissão de luz da taurina, em determinado intervalo de tempo	52
Figura 18 - Emissão de luz da β -alanina, em determinado intervalo de tempo	53
Figura 19 - Emissão de luz da fosfoetanolamina, em determinado intervalo de tempo	53
Figura 20 - Emissão de luz da taurina cloramina, em determinado intervalo de tempo	54
Figura 21 - Emissão de luz da β -alanina cloramina, em determinado intervalo de tempo.....	54

Figura 22 - Emissão de luz da fosfoetanolamina cloramina, em determinado intervalo de tempo

.....55

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Mecanismo de ação antibacteriana de antissépticos e desinfetantes	26
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AFMK – N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina

Ca(ClO)₂ - hipoclorito de cálcio

Cl₂ - gás de cloro

COOH - grupamento carboxílico

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)

HCl – ácido clorídrico

HOCl – ácido hipocloroso

H₂O₂ – peróxido de Hidrogênio

KH₂PO₄ - fosfato monobásico de potássio

MPO – mieloperoxidase

Na₂HPO₄ - fosfato dibásico de sódio

NaOCl - hipoclorito de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NCT - N-clorotaurina

NH₂Cl - monocloramina

NO - óxido nítrico

O₂ - oxigênio molecular

¹O₂ – oxigênio singlete

PVP - polivinilpirrolidona

P5P - piridoxal-5'-fosfato

ROS - espécies reativas de oxigênio

-SO₃ - grupamento sulfônico

Tau-Cl – taurina cloramina

TNB - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 TAURINA	16
3.1.1 Síntese e produção	17
3.1.2 Função fisiológica.....	19
3.2 TAURINA CLORAMINA	20
3.3 ANTISSÉPTICOS	22
3.3.1 Mecanismos de ação	23
3.4 AMBIENTES DE UTILIZAÇÃO.....	27
3.4.1 Área hospitalar	28
3.5 TIPOS DE ANTISSÉPTICOS.....	29
3.5.1 Compostos de iodo	30
3.5.2 Compostos de cloro e derivados clorados	30
3.5.3 Álcool	31
3.5.4 Compostos oxidantes.....	31
3.5.5 Aldeídos.....	32
3.5.6 Sabões e detergentes.....	32
3.6 AÇÃO ANTISSÉPTICA DE SUBSTÂNCIAS DO GRUPO CLORAMINA.....	33
3.6.1 Taurina cloramina como antisséptico	35
3.8 ESTABILIDADE DA TAURINA CLORAMINA.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 COMPOSTOS QUÍMICOS	38
4.2 EQUIPAMENTOS	38

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	38
4.3.1 Solução tampão fosfato de sódio	38
4.3.2 Solução de taurina	39
4.3.3 Solução de β -alanina	39
4.3.4 Solução de fosfoetanolamina.....	39
4.3.5 Solução de α -alanina	39
4.3.6 Solução de ácido hipocloroso	39
4.3.7 Soluções para preparo das cloraminas	40
4.3.8 Solução DTNB (ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico]).....	40
4.3.9 Solução de peróxido de hidrogênio	40
4.4 PROCEDIMENTOS	40
4.4.1 Determinação da absorvância das soluções utilizando o espectrofotômetro UV-Vis	40
4.4.2 Determinação da concentração das cloraminas utilizando o ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB).....	41
4.4.3 Determinação da concentração das cloraminas com peróxido de hidrogênio e utilizando luminômetro	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA	42
5.1.1 Substâncias puras	42
5.1.2 Análise de concentração das cloraminas	46
5.2 CONCENTRAÇÃO DAS CLORAMINAS PELO REAGENTE ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS(2-NITROBENZÓICO) (DTNB)	50

5.3 CONCENTRAÇÃO DAS CLORAMINAS A PARTIR DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	52
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O crescimento do uso indiscriminado de antissépticos e desinfetantes nos mais variados meios de utilização pode acarretar problemas ligados à resistência bacteriana. Isto ocorre, pelo fato de que ao mesmo tempo que novos produtos buscam ampliar as opções de combate a possíveis infecções, a utilização errônea também contribui para o aumento da resistência de determinadas bactérias para uma série de substâncias. Nos hospitais, por exemplo, é frequente o agravamento do quadro clínico de pacientes devido a infecções contraídas durante o próprio tratamento (MORIYA; MÓDENA; 2008 e REIS et al., 2011).

É importante notar que para determinados tipos de antissépticos e desinfetantes, também há um determinado grupo de ação, isto é, a utilização de produtos que não são eficazes em um determinado ambiente, além de aumentarem a chance de contaminação dos indivíduos presentes, também contribui para o aumento da resistência das bactérias, tornando mais difícil a esterilização do ambiente. Desta forma, o emprego de substâncias eficazes no desenvolvimento destes produtos é extremamente importante para garantir a manutenção de locais suscetíveis à exposição bacteriana (DENYER; STEWART, 1998 e KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988)

Um das substâncias utilizadas para o desenvolvimento de antissépticos e desinfetantes é a taurina cloramina, na qual possui as condições necessárias para atuação como antisséptico, sendo eles o poder de desinfecção suficiente e notável série de compatibilidade; o NCT é um oxidante fraco, e detém alta estabilidade. Sendo assim, uma boa alternativa para o desenvolvimento de novos produtos é utilização de compostos N-cloramina (GOTTARDI; NAGL, 2010).

Neste contexto, é possível verificar a necessidade de desenvolvimento de novos antissépticos de maneira consciente. Este trabalho, portanto, teve seu enfoque na busca de formulações alternativas à taurina cloramina que possam apresentar um desempenho antisséptico semelhante. Baseado em suas propriedades antissépticas já conhecidas, o estudo em questão propôs o desenvolvimento de novas cloraminas (β -alanina cloramina, fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina) como antissépticos, aos quais foram analisadas o decaimento da concentração com o passar do tempo, com o objetivo de estudar o seu comportamento para posterior utilização como antissépticos; podendo ainda ser analisada em futuros trabalhos sua aplicação e eficácia diante de diferentes micro-organismos existentes em diversos meios.

2 OBJETIVO

Sintetizar e estudar a estabilidade e reatividade de cloraminas derivadas de taurina, α -alanina, β -alanina e fosfoetanolamina. Substâncias com potenciais aplicações como antissépticos.

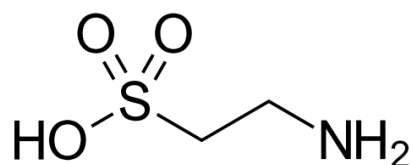
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 TAURINA

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico, Figura 1) é um aminoácido contendo enxofre derivado dos aminoácidos cisteína e metionina (STAPLETON et al., 1997). Trata-se de uma substância essencial para o desenvolvimento de mamíferos (BIRDSALL, 1998), consistindo em quase 0,1% do peso corporal na maioria dos mesmos, mas encontra-se ausente ou presente em níveis baixos em bactérias e plantas (KIM; CHA, 2014).

O que difere a taurina dos demais aminoácidos é a presença de um grupamento sulfônico ($-\text{SO}_3$) ao invés do grupamento carboxílico (COOH) (Figura 1). Apesar de apresentar características de um aminoácido, a taurina não participa da síntese proteica, no entanto é essencial para diversos processos biológicos como no desenvolvimento do sistema nervoso central e da retina, modulação de cálcio, estabilização da membrana, reprodução e imunidade (SCHULLER-LEVIS; PARK, 2003).

Figura 1 - Estrutura molecular da taurina



Fonte: Elaborado pelo autor.

A taurina foi isolada pela primeira vez em 1827 pelos cientistas alemães Friedrich Tiedemann e Leopold Gmelin, que investigavam a digestão e descobriram a presença dessa substância na bilis de boi (KIM; CHA, 2014). O nome, taurina, é derivado do taurus Latino do termo, que significa o touro ou o boi.

A taurina, é um aminoácido não essencial abundante no organismo de seres humanos, e está envolvida em diversas funções biológicas e fisiológicas (STAPLETON et al., 1997); encontrado principalmente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos, no coração e no cérebro, bem como nos intestinos e ossos esqueléticos, e também pode ser obtida na dieta alimentar. Embora a conjugação dos ácidos biliares seja a função mais conhecida da taurina, também existem outras finalidades em diferentes áreas do corpo humano. Desse modo, os baixos níveis de taurina estão associados a várias lesões patológicas, como retardo do crescimento, em especial se a deficiência ocorrer durante o desenvolvimento. A taurina tem sido usada em diversos tratamentos clínicos, sendo eles doenças cardiovasculares, epilepsia e outros distúrbios convulsivos, degeneração macular, doença de Alzheimer, entre outros (BIRDSALL, 1998).

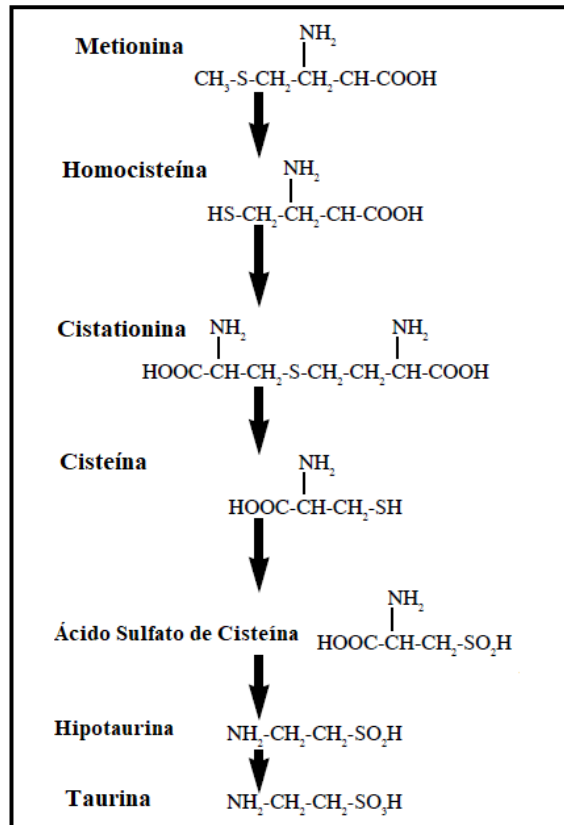
3.1.1 Síntese e produção

A taurina é considerada um aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada a partir de outros aminoácidos no organismo humano. Além disso, pode ser obtido a partir da ingestão de alimentos como, peixe, carne vermelha, frutos do mar, e alguns alimentos de origem vegetal, nos quais são fontes de taurina (BIRDSALL, 1998).

Para a síntese da taurina, existem três caminhos conhecidos (Figura 2), todas as três vias requerem piridoxal-5'-fosfato (P5P), a coenzima ativa da vitamina B6, como cofator. Considera-se que a atividade da descarboxilase de ácido sulfato de cisteína (CSAD), a enzima que converte o ácido sulfato de cisteína em hipotaurina e ácido cisteico em taurina, reflete a capacidade de síntese de taurina (BIRDSALL, 1998). Este processo bioquímico envolve duas enzimas diferentes. A primeira, uma cisteína dioxigenase, permite a oxidação da cisteína ao ácido cisteína sulfinico, que é descarboxilado pela cisteína-ácido sulfinico descarboxilase, a enzima controladora da taxa, para produzir a hipotaurina, e então a hipotaurina é oxidada em taurina (BOUCKENOOGHE; REMACLE; REUSENS, 2006 e LOURENÇO; CAMILO, 2002). Em comparação com outros mamíferos, os seres humanos têm atividade CSAD relativamente baixa e, portanto, possivelmente menor capacidade de síntese de taurina. No

entanto, estudos relacionados com gatos mostram que eles não sintetizam taurina, e assim devem consumi-la em sua dieta (BIRDSALL, 1998).

Figura 2 - Síntese da taurina



Fonte: Adaptado, LOURENÇO; CAMILO, 2002.

A biossíntese da taurina varia de acordo com as espécies, sendo elevada em roedores e baixa em seres humanos. A taurina presente no conteúdo corporal, pode ser derivada da ingestão direta de taurina da dieta, síntese de taurina pelo fígado e tecidos alternativos, e reabsorção renal. Dessa forma, veganos e indivíduos que não consomem taurina na alimentação, têm um baixo teor de taurina no plasma e podem necessitar de suplementos. Embora taurina não seja um componente de qualquer proteína de mamífero, ele desempenha um papel importante em seres humanos durante o desenvolvimento (BOUCKENOOGHE; REMACLE; REUSENS, 2006)

A distribuição da taurina no reino vegetal é esporádica, no entanto, quando encontrada as concentrações são baixas; diferentemente no reino animal (com exceção dos protozoários), que apresenta concentrações mais altas; e nos animais as concentrações de taurina são elevadas em plaquetas, tecidos eletricamente excitáveis e estruturas secretoras. Em geral, as

concentrações de taurina são altas em espécies com células que não possuem paredes celulares rígidas e são baixas ou ausentes em espécies com células com paredes celulares rígidas.

3.1.2 Função fisiológica

A taurina possui muitos papéis fisiológicos importantes, tais como osmorregulador, modulador de diabetes, antioxidante, hepatoprotetor, neurotransmissor, antiaterosclerótico, mas também desempenha muitos outros papéis (BOUCKENOOGHE; REMACLE; REUSENS, 2006)

A taurina pode atuar como osmólito intracelular e na regulação do volume celular através das membranas celulares os equilíbrios osmóticos devem ser mantidos, para que assim a maioria das células fiquem num volume constante que é mantido por muitos tipos de células durante a sua vida útil no sistema nervoso. Os osmólitos tendem a serem transportados, e a taurina atua nesse processo, se mostrando importante em muitos tipos de células para manter o volume celular nas mudanças na osmolaridade extracelular (HUXTABLE, 1989 e MORALES; SCHOUSBOE, 1988).

Na diabetes, são baixos os níveis de taurina plasmática e plaquetária em pacientes insulino-dependentes, mas após a suplementação oral desses pacientes com taurina, observou-se um aumento nesses níveis. A partir da suplementação de taurina também reduziu o efeito da agregação de plaquetas, experimentos *in vitro* comprovam essa teoria, e demonstraram que a taurina reduziu a agregação plaquetária em pacientes diabéticos de forma dependente da dose, sem ter efeito na agregação de plaquetas de indivíduos saudáveis (BIRDSALL, 1998)

Na diabetes os níveis elevados de glicose perturbaram a osmorregulação celular, e assim, a taurina deve atuar como osmolito, pois essa perturbação pode causar disfunções celulares. O aumento dos níveis extracelulares de glicose no diabetes, representa um estresse osmótico para as células, para manter o equilíbrio osmótico através da membrana celular, é necessária a produção ou o transporte de osmolitos intracelulares adicionais, nos quais podem atuar: taurina, betaína, mioinositol, sorbitol e glicerofosforilcolina (GPC), que são considerados os osmólitos intracelulares mais importantes (HANSEN, 2001)

A taurina também aparece no metabolismo do colesterol, quando o ácido cólico é conjugado com a taurina para formar ácidos biliares, ácido taurocólico. A administração oral de taurina mostrou aumentar a quantidade relativa de ácido taurocólico na bile (SJÖVALL, 1959)

Os sais biliares participam da absorção de gordura no intestino, mas são apenas parcialmente reabsorvidos, uma vez que 5-10% do grupo ácido biliar é perdido em fezes diariamente. Esta excreção de sais biliares constitui a única via de excreção do colesterol do corpo. Devido ao carácter hidrófilo e iônico do grupo ácido sulfônico no ácido taurocólico, os conjugados de taurina são solúveis em água, o taurocolato foi relatado principalmente para ser reabsorvido intestinalmente por meio de transporte ativo (SJÖVALL, 1959).

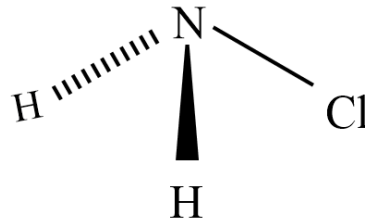
A conjugação de taurina com ácidos biliares tem um efeito significativo na solubilidade do colesterol, aumentando a sua excreção e a administração de taurina mostrou reduzir os níveis de colesterol no soro em seres humanos (BIRDSALL, 1998)

Muitos estudos sugeriram um papel antioxidante para a taurina. Como outros aminoácidos contendo enxofre, pensa-se que a taurina possui propriedades antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas durante o metabolismo e através da exposição a radiações ou compostos químicos ambientais que podem causar danos a vários componentes celulares devido à sua alta reatividade. A taurina não pode reagir com ROS diretamente, mas parece aumentar outras funções antioxidantes celulares. A taurina pode, contudo, unir diretamente o ácido hipocloroso, uma molécula reativa produzida em neutrófilos e monócitos de mamíferos pela enzima mieloperoxidase, para formar taurina cloramina (Tau-Cl), um composto mais estável e menos tóxico (BOUCKENOOGHE; REMACLE; REUSENS, 2006).

3.2 TAURINA CLORAMINA

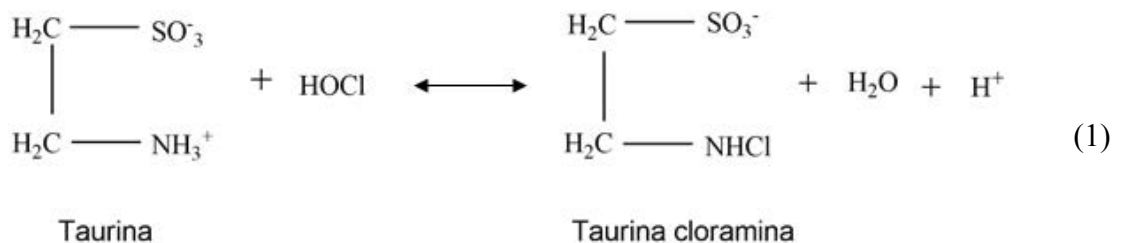
A taurina reage com ácido hipocloroso (HOCl) para formar taurina cloramina (Tau-Cl), um oxidante que é muito menos reativo e mais estável do que HOCl/CIO⁻. Embora a desintoxicação de HOCl/CIO⁻ pela formação de Tau-Cl tenha sido postulada para explicar os efeitos protetores da taurina, estudos sugerem que a Tau-Cl pode ser uma molécula efetora biológica significativa (BARUA; LIU; QUINN, 2001)

As cloraminas (Figura 3) são grupos oxidantes formadas a partir do ácido hipocloroso (HOCl), através da sua reação com aminas primárias ou secundárias, prontamente disponíveis em sistemas biológicos. Tais cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. A monocloramina (NH₂Cl), formada pela reação entre HOCl e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio HOCl (SCHULLER-LEVIS; PARK, 2003 e LEARN; FRIED; THOMAS, 1990).

Figura 3 - Estrutura das cloraminas

Fonte: Elaborado pelo autor.

O β -aminoácido taurina, reage com o HOCl formando taurina cloramina (Tau-Cl), de acordo com a Equação 1 (XIMENES; FONSECA; ALMEIDA, 2011 e LEARN; FRIED; THOMAS, 1990)



Por exemplo, em leucócitos, mas especialmente em neutrófilos, a taurina está presente em concentrações excepcionalmente altas (10 - 30 mM). A taurina pode ser um eliminador de oxidantes clorados, pois a reação de taurina com HOCl leva à formação de Tau-Cl de longa duração, um composto mais estável e menos tóxico para as células que o HOCl. Este processo protege as células da ação citotóxica e citolítica do ácido hipocloroso. A própria Tau-Cl, no entanto, pode exercer efeitos prolongados de oxidação e cloração muito depois do início da explosão respiratória e a alguma distância da célula de origem. (LEARN; FRIED; THOMAS, 1990 e MARCINKIEWICZ et al., 1995)

Os neutrófilos são células envolvidas nas respostas imunes não específicas e são os primeiros a chegar ao local da lesão, eles podem viver por várias horas após a ativação, e

contribuem para regulação da inflamação, liberando citocinas e outros mediadores inflamatórios (SOUZA et al., 2006 e LIMA, 2016)

Estes leucócitos têm como mecanismo básico de ação a fagocitose e posterior destruição dos agentes estranhos via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio. Estas células representam a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores, células infectadas com vírus e células tumorais. Em seres humanos saudáveis eles constituem 40-60% da população de células brancas do sangue (LIMA, 2016). Os neutrófilos são seguidos e eliminados por macrófagos em locais inflamatórios locais, e os macrófagos parecem ser as principais células alvo para agentes biologicamente ativos derivados de granulócitos, incluindo cloraminas. As proteínas cloradas são mais imunogênicas do que as nativas e a cloração aumenta a capacidade dos macrófagos para processar / apresentar os antígenos (MARCINKIEWICZ et al., 1995). Nas células a Tau-Cl inibe a produção de óxido nítrico (NO), ânions superóxido, e outros mediadores pró-inflamatórios por células ativadas de uma variedade de diferentes tecidos. No entanto, o mecanismo da ação de Tau-Cl não foi determinado e os efeitos de Tau-Cl em macrófagos alveolares ativados não foram relatados, exceto na forma preliminar (MARCINKIEWICZ et al., 1995).

3.3 ANTISSÉPTICOS

O uso de antissépticos vem de antigas eras, diversas substâncias químicas usadas para tratar de ferimentos e impedir a disseminação de doenças infecciosas, assim como a defumação, a salga e alimentos condimentados; tais práticas já ocorrem a muitos séculos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Os antissépticos são aqueles utilizados para destruir microrganismos ou inibir sua reprodução ou metabolismo, geralmente são aplicados nas superfícies cutâneas ou mucosas e em feridas infectadas, objetivando esterilizá-las (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Pode-se classifica-los de duas maneiras, como agentes bactericidas devido à capacidade de destruir as bactérias nas formas vegetativas, e como agentes bacteriostáticos porque inibem o crescimento do microrganismo sem destruí-lo. Outra característica dos antissépticos que se destaca é sua atividade residual, que se caracteriza por ser uma atividade química resistente sobre a pele (REIS et al., 2011). No entanto sua aplicação em feridas, não é recomendada por especialista, em sua grande maioria, pois retardam a cicatrização e podem danificar os tecidos.

Já o melhor processo a ser empregado é o mecânico, sendo ele, limpar as feridas e retirar o pus e o tecido necrótico por processos mecânicos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Os antissépticos destinados a utilização em objetos inanimados, em ambientes e em excretas designam-se por desinfetantes, sendo esses tipos, drogas muito utilizadas em tempos atuais (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Os antissépticos e desinfetantes podem ser referidos também por outros termos, que se diferenciam a partir do uso e finalidade de cada um, sendo eles: biocidas, esterilizantes e sanitizantes.

Os biocidas são substâncias capazes de impedir o crescimento de microorganismos como fungos, bactérias e leveduras, à materiais orgânicos que normalmente estão presentes na água, no ar e na atmosfera, tais como papel, madeira e tecidos. Os sanitizantes reduzem o número de bactérias a níveis relativamente seguros. E esterilizantes são meios físicos, como: calor, filtração, radiações, etc; capazes de matar os esporos e a forma vegetativa, ou seja, são substâncias que destroem todas as formas de vida (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

Os efeitos tóxicos estão presentes nos antissépticos, sua aplicação tópica pode irritar a pele e as mucosas, causando dermatite ou reações alérgicas; acarretando toxicidade sistêmica se houver absorção de tais drogas (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

O grau de eficácia dos antissépticos e desinfetantes é determinado por vários fatores, como o pH, temperatura, concentração, duração do contato com os microorganismos e presença de material orgânico (sangue, pus, tecido necrótico) (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Diversos antissépticos resultaram de processos de adição, duplicação ou hibridação molecular, podendo ser agrupados em diversas classes química.

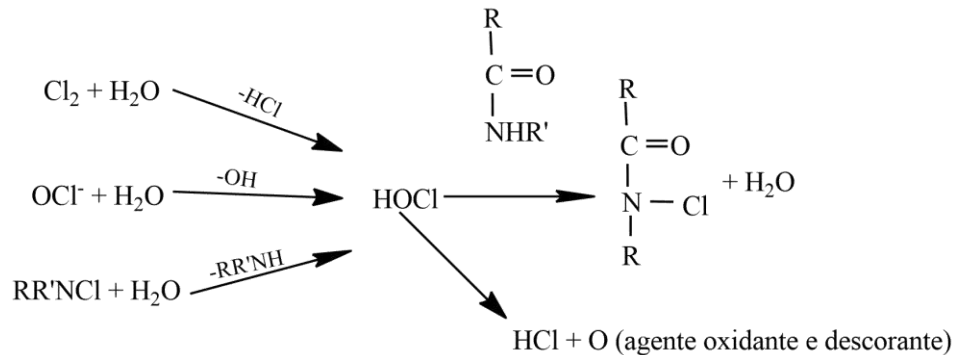
No Brasil a regulamentação dos biocidas é feita pelo Ministério da Saúde, e fica sujeita a comprovação de sua eficácia de acordo com a finalidade a ele proposta, sendo realizadas análises em laboratórios específicos, a fim de a partir dos resultados obtidos, ser liberados para o uso (REIS et al., 2011).

3.3.1 Mecanismos de ação

A ação germicida dos antissépticos e desinfetantes ocorre por diferentes mecanismos, variados e complexos. A inativação de certas enzimas é o mecanismo mais comum, por ele atuam os halogênios e halogenóforos, metais e seus compostos, uréias, amidas, carbamatos e nitrofuranos. O iodo, por exemplo, pode interagir com uma cadeia polipeptídica de vários modos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Já o cloro e os compostos clorados ao

serem transformados em ácido hipocloroso, podem se ligar pelo cloro a um segmento proteico e produzir HCl e oxigênio nascente, no qual atua então como oxidante; a Figura 4 exemplifica o mecanismo de ação do cloro e compostos clorados (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Figura 4 - Mecanismo de ação do cloro e compostos clorados



Fonte: Adaptado, KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988

A desnaturação de proteínas é outro mecanismo de ação germicida, os ácidos, álcoois, fenóis, metais e compostos metálicos, halogênios e halogenóforos, compostos de amônio quaternário e algumas outras drogas atuam desnaturando ou coagulando proteínas (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Normalmente há uma sequência comum dos acontecimentos de ação do antisséptico, seja qual for o tipo de célula microbiana. Pode-se considerar como a interação do antisséptico, por exemplo, com a superfície celular seguida de penetração na célula e ação no alvo. A natureza e a composição da superfície variam de um tipo de célula para outra, no entanto, também podem ser alteradas a partir de mudanças no ambiente (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

A interação dos agentes antimicrobianos, pode ocorrer tanto na superfície celular, produzindo um efeito significativo na viabilidade, ou agindo intracelularmente, como ocorre com a maioria dos agentes. As camadas mais externas das células microbianas podem assim ter um efeito significativo tanto sobre a sua susceptibilidade ou insusceptibilidade, aos antissépticos (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

Em geral todos esses agentes destroem células por coagulação ou desnaturação de proteínas protoplasmáticas, ou lise celular pela alteração estrutural da membrana celular,

ocasionando desse modo, o vazamento dos componentes celulares (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Na interação célula-biocida, a célula bacteriana vegetativa possui regiões para interação biocida, que são a parede celular, membrana citoplasmática e citoplasma. O material extracelular, a morfologia celular e composição química celular, determinam o acesso do biocida às regiões citadas acima. A resistência existente, a interação do biocida com as regiões da célula bacteriana, tem relação com a variação fenotípica na fisiologia celular (DENYER; STEWART, 1998).

A interação inicial com a célula bacteriana ocorre com a temperatura constante de absorção. Para que tenha uma ação efetiva do biocida, é necessário que o mesmo seja absorvido no alvo certo, e ainda, seguido de acumulação de níveis prejudiciais (DENYER; STEWART, 1998).

Quando os biocidas avançam para seus alvos, encontram uma variedade de estruturas, e a membrana lipídica externa da bactéria Gram-negativa é dominante entre elas, uma vez que são naturalmente mais resistentes aos biocidas do que as suas homólogas Gram-positivas; o peso molecular da estrutura, indicará um obstáculo considerável a passagem (POOLE, 2002). A ação da absorção e adsorção ocorrendo simultaneamente, e o avanço para o alvo e a acumulação em alvo raramente são eventos instantâneos, assim, podem ser influenciadas por fatores como a concentração de biocidas, a temperatura a formulação e o pH. Desse modo, esses fatores podem influenciar consideravelmente a taxa e a extensão do prejuízo celular sem necessariamente proporcionar qualquer efeito direto sobre o mecanismo de ação (DENYER; STEWART, 1998).

Para determinar um mecanismo de ação (Tabela 1) fundamenta-se no estabelecimento de uma correlação entre as concentrações que iniciam efeitos bactericidas e aquelas que precipitam mudanças bioquímicas ou fisiológicas específicas, assim, há uma causa quando essa correlação acontece (DENYER; STEWART, 1998).

Tabela 1 - Mecanismo de ação antibacteriana de antissépticos e desinfetantes

Alvo	Antisséptico ou Desinfetante	Mecanismo de ação
Envelope celular (parede celular, outras membranas)	Glutaraldeído	Reticulação de proteínas
	EDTA, outros permeabilizantes	Bactéria Gram-negativa: remoção de Mg^{2+} lançamento de alguns LPS
Membrana citoplasmática (interna)	clorexidina	Baixas concentrações afetam a integridade da membrana, altas concentrações causam congelamento do citoplasma
Efeitos no DNA	Halogêneos	Inibição da síntese de DNA
	Peróxido de hidrogênio, íons de prata	Quebra de cadeia de DNA
Agentes oxidantes	Halogêneos	Oxidação de grupos tiol em dissulfuretos, sulfóxidos ou disulfoxidos
	Peroxigêneos	Peróxido de hidrogênio: atividade decorrente da formação de radicais hidróxilos livres (OH), que oxidam grupos tiol em enzimas e proteínas; PAA: ruptura de grupos tiol em enzimas e proteínas

Fonte. Adaptado, MCDONNELL; RUSSELL, 1999.

Como já foi destacado, as condições experimentais podem afetar efetivamente o início de concentração de acontecimentos celulares inteiros e tomando sempre cuidado para um esclarecimento correto dos produtos experimentais (DENYER; STEWART, 1998).

A partir de uma grande variedade de classes químicas, surgem os compostos biocidas, que a partir de diferentes mecanismos de interação se formam. Os danos podem ser manifestados das seguintes maneiras, conforme apresentado por Denyer; Stewart, 1998:

- ruptura da força motora do próton transmembranar que conduz a um desacoplamento da fosforilação oxidativa e à inibição do transporte ativo através da membrana;
- inibição da respiração ou reações catabólicas/anabolizantes;
- interrupção da replicação;
- perda de integridade da membrana, resultando em vazamento de constituintes intracelulares essenciais, como o cátion de potássio, fosfato inorgânico, pentoses, nucleotídeos e proteínas;
- coagulação do material intracelular.

3.4 AMBIENTES DE UTILIZAÇÃO

Os antissépticos são empregados de diferentes modos, sejam ele isoladamente, ou incorporados a detergentes, sabões, desodorantes, aerossóis, talcos, dentifrícios, conservantes, anti-infecciosos urinários e variadas outras preparações. Sendo estes usados amplamente para matar bactérias, esporos, fungos, vírus e protozoários em infecções ou infestações locais e para preparar a pele em operações cirúrgicas (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Os desinfetantes, nos quais são da mesma classe dos antissépticos, mas com diferentes locais de aplicação; estes são muito empregados em saneamento caseiro e hospitalar para desinfetar água e utensílios em geral e para esterilizar vacinas, produtos sanguíneos e enxertos teciduais (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

O uso dos desinfetantes na área hospitalar e em outros serviços de saúde tem uma vasta importância devido às suas propriedades bactericidas, virucidas e fungicidas que causam a inativação de microrganismos na forma vegetativa (não esporulada) em superfícies inanimadas (REIS et al., 2011).

3.4.1 Área hospitalar

O hospital concentra hospedeiros mais suscetíveis e microrganismos mais resistentes, ao qual, se torna intrínseco sua nocividade (MORIYA; MÓDENA; 2008). Os microrganismos estão presentes em todas as áreas e atividades do hospital, contaminam objetos hospitalares, colonizam pacientes e podem agravar os quadros de saúde (MORIYA; MÓDENA; 2008).

Alguns fatores influenciam no risco de contrair esses microrganismos, esses dependem do número e da virulência (capacidade de um vírus ou bactéria de se multiplicar dentro de um organismo, provocando doença) dos microrganismos presentes, deve-se contar ainda com a resistência anti-infecciosa local, sistêmica e imunológica do paciente e da consciência daqueles que atuam no hospital (MORIYA; MÓDENA; 2008).

De acordo com a Portaria nº 2.616/98, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que normatiza as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares, o uso de antissépticos, desinfetantes e esterilizantes nos serviços de saúde deve ser orientado pelas determinações da Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde (MS) e pela publicação Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde/ do MS de 1994, ou outras que as complementem ou substituam (REIS et al., 2011).

Nas incidências de infecções hospitalares, é apontado como uma das causas, o uso indiscriminado de antibióticos que por sua vez, provocaram a resistência das raças de germes que surgiram, aos agentes antimicrobianos. O humano é também grande uma fonte dessas infecções, uma vez que a maioria das infecções hospitalares é transmitida pelo contágio direto, através de mãos contaminadas; esse problema pode ser resolvido, por exemplo, com a lavagem das mãos com o detergente adequado para a eliminação dos microrganismos presentes (TIBIRIÇÁ, 1974).

Normalmente também é atribuído o aparecimento de infecção pós-operatória a falhas na esterilização do material cirúrgico que, embora seja um fator crítico, não é o único responsável pelas infecções em cirurgias. É necessário se investigar em qual etapa do processo operatório a infecção se originou, isto é, no transoperatório, por falhas no Centro Cirúrgico como, manipulação errada das técnicas de esterilização de instrumental cirúrgico, roupas, outros materiais e utensílios em geral, entre outros; ou no pré e pós-operatório, por falhas nas medidas de diagnóstico, de tratamento médico e nos cuidados de enfermagem executados nas unidades de internação (TIBIRIÇÁ, 1974).

Um material hospitalar deve passar por um processo de descontaminação, isto é, um processo ou tratamento que o torna seguro para o manuseio e o uso (SOUZA; PEREIRA; RODRIGUES, 1998).

No entanto, um processo de descontaminação não nos dá a total certeza que o material está seguro para sua utilização no paciente, pois o procedimento pode variar desde um processo de esterilização ou desinfecção até a simples lavagem com água e sabão (SOUZA; PEREIRA; RODRIGUES, 1998).

A descontaminação prévia ocorre pela imersão dos materiais médico-cirúrgicos com presença de matéria orgânica, microrganismos e outros resíduos decorrentes do uso, em uma solução desinfetante por um tempo de exposição que varia de 15 a 30 minutos, com o objetivo de eliminar ou reduzir dos microrganismos presentes; esse processo ocorre antes de os mesmos passarem por uma limpeza mecânica com água e sabão, para que minimize ao máximo os riscos existentes. Nessa descontaminação prévia, ou também a chamada desinfecção prévia, reduz-se consideravelmente carga biológica dos materiais médico-cirúrgicos, e mais seguros para o manuseio (SOUZA; PEREIRA; RODRIGUES, 1998).

A limpeza mecânica com água e sabão, objetiva-se à remoção de materiais orgânicos, como sangue, pus, e outras secreções, reduzindo os microrganismos presentes nos materiais médico-cirúrgicos (SOUZA; PEREIRA; RODRIGUES, 1998).

A matéria orgânica presente nesses materiais pode interferir com a atividade antimicrobiana dos desinfetantes ou ainda atuar como uma barreira física de proteção aos microrganismos durante os processos de desinfecção e/ou esterilização por meios físicos ou químicos. Essa limpeza que é feita nos materiais médico-cirúrgicos, antes que os mesmos passem pelo processo de desinfecção e/ou esterilização, é um procedimento universal (SOUZA; PEREIRA; RODRIGUES, 1998).

3.5 TIPOS DE ANTISSÉPTICOS

Diversos compostos são utilizados para finalidades antissépticas, desinfetantes, ou correlatas a elas; e cada uma usada para um melhor fim de eliminação dos microrganismos, abaixo são destacadas alguns destes compostos, dentre outros existentes.

3.5.1 Compostos de iodo

O iodo livre é mais bactericida do que bacteriostático, e dá um poder residual à solução. É um agente fungicida e também, bactericida com certa atividade esporicida, dependendo das condições ambientais, como a quantidade de material orgânico e o grau de desidratação. Um halogênio pouco solúvel em água, e facilmente solúvel em álcool e em soluções aquosas de iodeto de potássio. Dentre os compostos de iodo mais usados, está o álcool iodado a 0,5% ou 1% (MORIYA; MÓDENA; 2008 e MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

O iodo dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP), é chamado de iodóforo e esse libera o iodo lentamente, permitindo uma estabilidade maior para a solução. Ele em relação as soluções alcoólicas e aquosas de iodo, não queima, não mancha tecidos, possui baixos índices de reações alérgicas, não interfere no metabolismo e mantém ação germicida residual; além disso possui propriedades com ação bactericida, fungicida e virucida. O iodóforo mais utilizado para finalidades antissépticas das mãos é a solução degermante, de PVPI a 10% (1% de iodo ativo), em solução etérea (MORIYA; MÓDENA; 2008).

3.5.2 Compostos de cloro e derivados clorados

Dentre o mais forte dos germicidas que existe, está o cloro, ele é tóxico para todo tipo de matéria viva. Este pode ser usado sob forma de gás ou derivado clorados que despreendem ácido hipocloroso, pois é este o agente germicida que interage com a matéria orgânica e destrói tecidos normais. A ação bacteriana do cloro é anulada pela matéria orgânica e pH alcalino, e pode apresentar propriedades corrosivas, dependendo do material em que for utilizado. Na área da saúde o derivado clorado mais usado é a solução de hipoclorito 0,5 % (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

A clorexidina é um germicida do grupo das biguanidas, age mais efetivamente com um pH de 5 a 8, e normalmente contra bactérias Gram-positivas, comparadas com as Gram-negativas e fungos, mas ainda assim apresenta ação contra elas; e ainda possui ação imediata e efeito residual. Apresenta baixo potencial de toxicidade e de fotossensibilidade ao contato, sendo pouco absorvida pela pele integra. As soluções normalmente utilizadas são a de gluconato de clorexidina a 0,5%, em álcool a 70% e solução detergente não iônica de clorexidina a 4%, contendo 4% de álcool isopropílico ou álcool etílico (MORIYA; MÓDENA; 2008). Em soluções aquosas de clorexidina em concentrações inferiores a 4% de álcool, com ou sem

cetrimida, são mais facilmente contamináveis, se caracterizando de uso inadequado para hospitais (MORIYA; MÓDENA; 2008).

3.5.3 Álcool

Dentre vários álcoois com ação antimicrobiana efetiva, destacam-se com ação praticamente imediata, os álcoois etílico e isopropílico, em concentrações de 70 a 92 % em peso (80 a 95% em volume a 25 °C). Apresentam amplo espectro contra bactérias vegetativas (incluindo micobactérias), vírus e fungos, no entanto, não apresentam nenhuma ação residual. Normalmente, a atividade antimicrobiana dos álcoois é significativamente menor em concentrações abaixo de 50% e é ideal na faixa de 60 a 90% (MCDONNEL; RUSSELL, 1999 e MORIYA; MÓDENA; 2008). Devido à falta de atividade esporicida, os álcoois não são recomendados para a esterilização, mas são amplamente utilizados tanto para a desinfecção da superfície dura quanto para a antisepsia da pele (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

Em geral, o álcool isopropílico é considerado um pouco mais eficaz contra bactérias e o álcool etílico é mais potente contra os vírus; no entanto, isto é dependente das concentrações tanto do agente ativo como do microrganismo de teste (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

Não se sabe ao certo o modo de ação específico dos álcoois, mas com base na eficácia aumentada na presença de água, geralmente se acredita que eles causam danos à membrana e desnaturação rápida de proteínas, com subsequente interferência no metabolismo e lise celular (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

3.5.4 Compostos oxidantes

Esses compostos apresentam ação germicida, eles se caracterizam pela produção de oxigênio nascente que possui essa ação. A água oxigenada ou peróxido de hidrogênio é o padrão dos peróxidos, podendo se destacar os peróxidos de sódio, zinco e benzila (MORIYA; MÓDENA; 2008).

O peróxido de hidrogênio é um biocida amplamente utilizado para desinfecção, esterilização e assepsia e demonstra eficácia de largo espectro contra vírus, bactérias, leveduras e esporos bacterianos. Em geral, uma maior atividade é vista contra bactérias gram-positivas

do que gram-negativas; no entanto, a presença de catalase ou outras peroxidases nestes organismos pode aumentar a tolerância na presença de concentrações mais baixas (MCDONNEL; RUSSELL, 1999). Ele se decompõe rapidamente, e libera oxigênio quando entra em contato com a catalase, enzima encontrada no sangue e maioria dos tecidos, no entanto esse efeito pode ser reduzido na presença de matéria orgânica. Apresenta maior ação na remoção de material infectado através da ação mecânica do oxigênio liberado (MORIYA; MÓDENA; 2008). Atua como oxidante produzindo radicais livres hidroxila ($\bullet\text{OH}$) que atacam componentes celulares essenciais, incluindo lipídios, proteínas e DNA (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

3.5.5 Aldeídos

O formaldeído, é resultado da oxidação parcial do álcool metílico. Tem um grande poder desinfetante, e também de penetração relativamente alto e baixa toxicidade. Grande potencial redutor, reage com substâncias orgânicas e precipita as proteínas (MORIYA; MÓDENA; 2008). Possui ação germicida e age ainda sobre os esporos. Uma solução utilizada é a do formaldeído 1% com sabão a 10%, formando o lisoformio, este tem na sua composição essencialmente estes compostos (MORIYA; MÓDENA; 2008).

O glutaraldeído é um dialdeído importante que encontrou uso como desinfetante e esterilizante, normalmente para desinfecção e esterilização a baixa temperatura, equipamentos cirúrgicos, entre outros. Possui um amplo espectro de atividade contra bactérias e seus esporos, fungos e vírus (MCDONNEL; RUSSELL, 1999).

3.5.6 Sabões e detergentes

Os sabões antimicrobianos contêm antissépticos em concentração suficiente para ser desodorante, por exemplo, usados para lavar as mãos antes de procedimentos cirúrgicos. Com a finalidade de remover a sujeira, impurezas e outros tipos de substâncias, normalmente eles apresentam formação de espuma, e extraem e facilitam essa limpeza, e também contribuem num fator psicológico que está associado na limpeza, com a formação de espumas (MORIYA; MÓDENA; 2008).

Esses sabões são sais que se formam pela reação de ácidos graxos, obtidos de gorduras vegetais e animais, com metais ou radicais, e são detergentes ou surfactantes aniônicos porque agem através de moléculas de carga (MORIYA; MÓDENA; 2008).

O uso desses sabões em ambientes hospitalares e unidades de saúde, é de preferência que os mesmos sejam líquidos, pois evitam a contaminação entre os usuários (MORIYA; MÓDENA; 2008).

3.6 AÇÃO ANTISSÉPTICA DE SUBSTÂNCIAS DO GRUPO CLORAMINA

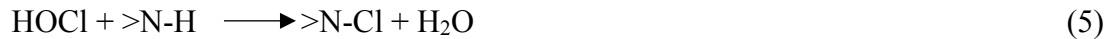
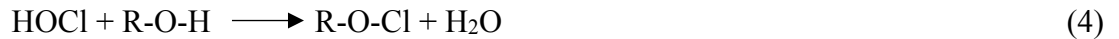
Em 1774, Scheele descobriu o cloro, já os hipocloritos foram descritos pela primeira vez por Berthollet em 1789, e então suas propriedades germicidas não demoraram para serem descobertas e utilizadas um pouco mais tarde (LABARRAQUE, 1828). Labarraque (1828), também relatou sucesso no tratamento de úlceras e queimaduras cobertas com curativos com solução diluída de hipoclorito, o que significa essencialmente o primeiro relatório sobre o uso anti-infeccioso de um composto de cloro ativo.

Os halogêneos normalmente são apontados com propriedades antissépticas, principalmente o cloro, por proporcionarem compostos estáveis de O-Cl e N-Cl, os chamados compostos de cloro ativos, que atuam como agentes germicidas com base em suas qualidades oxidantes. Em comparação a ele, o iodo ao formar compostos O-I e N-I análogos não são estáveis num sistema aquoso, não sendo tão úteis nessa finalidade (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013).

A partir da Equação 2, pode-se observar que a partir do gás de cloro (Cl_2) que atua como um oxidante muito forte e reage com a água, formando ácido hipocloroso (HOCl), que, como composto de cloro ativo mais poderoso, é relativamente estável em condições biológicas de pH (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013).



Os hipocloritos foram analisados a partir do seu bom desempenho em combater superfícies infectadas por microrganismos, e então feitas modificações nas suas soluções comum de hipoclorito de sódio, capazes de dar resultados úteis quando empregados corretamente (DAKIN et al., 1916). A partir de HOCl derivam todos os compostos de cloro ativos de acordo com as equações 3 a 5.



Sais como hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂) e o ácido hipocloroso HOCl, são formados a partir de ânions da espécie OCl⁻. O símbolo N-Cl abrange todos os compostos de nitrogênio-cloro, podendo ser dividido entre as cloramidas, que possuem um ou dois carbonilos, -CO-NCl- e -CO-NCl-CO-, respectivamente; e as cloraminas com um átomo de carbono saturado adjacente à função N-Cl, -CH₂-NCl- (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013). As cloraminas são produzidas pela reação de HOCl com uma amina, amida, imida ou imina. As cloraminas orgânicas são as N-cloro derivadas de grupo sulfonamidas, entre outros (DAKIN et al., 1916).

As cloraminas e as cloramidas também podem ser substituídas por um segundo átomo de cloro, formando compostos N-dicloro com o elemento estrutural -NCl₂ (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013).

Diversas substâncias orgânicas contendo grupos (NH) reagem com hipocloritos para dar compostos do grupo cloramina, isto é, substâncias que contêm o radical :NCl (DAKIN et al., 1916).

O meio e o tratamento da interação de um agente bactericida com a bactéria limitam a interação entre os mesmos, as bactérias sendo carregadas negativamente, a polaridade do agente desempenha um papel importante, podendo ser considerados; os agentes que estão presentes como ânions, moléculas neutras, e agentes carregados positivamente (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013).

É provável dizer que a eliminação de microrganismos por antissépticos deve-se a alterações químicas provocadas em alguns dos compostos da célula viva, na qual pode ser por ação direta do antisséptico ou pela ação de produtos forçados do antisséptico pela combinação com substâncias presentes no meio em que os organismos estão suspensos (DAKIN et al., 1916).

As proteínas apresentam um comportamento capaz de reagir com hipocloritos, dominante, comparado com as substâncias químicas presentes nas células vivas; provocando assim a ação do antisséptico nesse meio proteico (DAKIN et al., 1916).

A ação nas proteínas por parte dos hipocloritos, consiste na substituição do hidrogênio de alguns dos grupos (NH) pelo cloro, formando substâncias do grupo cloramina (DAKIN et al., 1916).

Os halogênios cloro, o bromo e o iodo não se diferenciam muito quando ao seu poder germicida, mas quando o halogênio é convertido em hipoclorito, por exemplo, aparece uma diferença muito acentuada entre eles. Essa diferenciação pode estar relacionada com a fraca ação germicida de hipobromito e hipiodito pela sua lentidão em reagir com proteínas e aminoácidos em comparação com a atividade dos hipocloritos (DAKIN et al., 1916).

Propriedades importantes das cloraminas são as de, não possuir ação corrosiva mesmo em soluções concentradas, e também não precipitar nem coagular proteínas, propriedade na qual, é de grande importância prática no tratamento de pessoas infectadas (DAKIN et al., 1916).

A introdução de uma cloramina na forma do composto natural N-clorotaurina, gerou um novo conceito anti-infeccioso após ser utilizado com sucesso em vários estudos clínicos, em relação ao tempo melhora e a dor causada no tratamento (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013).

3.6.1 Taurina cloramina como antisséptico

Os fagócitos humanos são usados para atacar e matar agentes patogênicos através da mieloperoxidase (MPO) geram HOCl. O HOCl oxida os grupos NH, e então, são gerados os oxidantes de longa duração (cloraminas), compostos R-NHCl, com diferentes propriedades (NAGL et al., 2000). Os oxidantes N-cloro, são derivados de aminoácidos e peptídeos, estes estão envolvidos na ação do sistema de defesa humano, como também no controle a resposta inflamatória (GOTTARDI; NAGL, 2010).

Um exemplo a ser citado é a N-clorotaurina (NCT), comumente chamada de taurina cloramina, na qual apresenta concentração relativamente alta e alta estabilidade. A taurina cloramina detém condições necessárias para atuar como antisséptico, que são o poder de desinfecção suficiente e notável série de compatibilidade (GOTTARDI; NAGL, 2010).

O sal de sódio de NCT, ao qual o ânion sofre hidrólise (Equação 6), formando inicialmente uma solução alcalina fraca que posteriormente, em parte pela ação do CO₂ no ar, é neutralizada, equilibrando-se o pH.

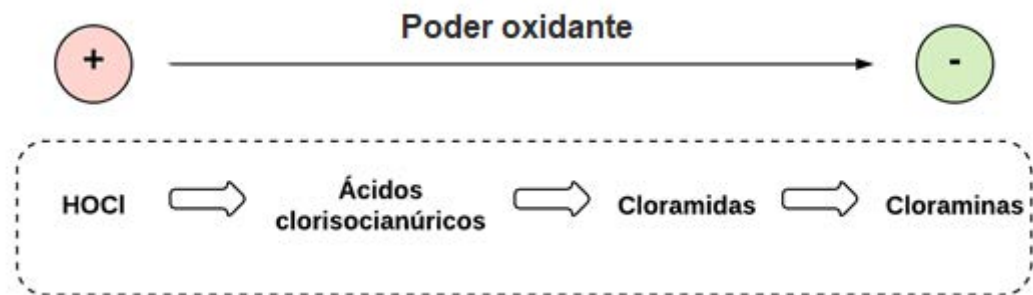


No NCT, suas propriedades oxidantes são atribuídas ao grupo N-Cl, como a Equação 7 mostra abaixo (GOTTARDI; NAGL, 2010).



A taurina cloramina é um oxidante fraco, de acordo com a Figura 6, pode-se observar a partir da sequência, que a Tau-Cl encontra-se na parte com menor poder de oxidação (vista como cloraminas), classificando-se como oxidante mais fraco, diferentemente do HOCl que encontra-se na extremidade oposta da sequência (GOTTARDI; NAGL, 2010).

Figura 5 - Classificação do poder oxidativo de compostos

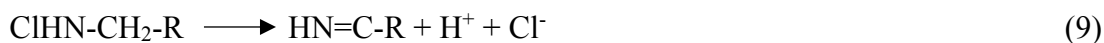


Fonte: Elaborado pelo autor.

O equilíbrio alcançado nos compostos e N-cloro deve-se a transalogenação, que trata da transferência do halogênio do composto de N-cloro para outro composto N-H, exemplificado na Equação 8, no qual, normalmente é alcançado a temperatura ambiente em poucos minutos e que não precisa de catalisador; isso sugere que na presença de compostos de N-H (aminoácidos, peptídeos), não apenas um, mas diversos agentes de cloração podem ser responsáveis por uma reação definida (GOTTARDI; NAGL, 2010).



O elemento de estrutura $\text{R-CH}_2\text{NHCl}$ que compõe os compostos de N-cloro, sofrem espontaneamente uma degradação pela primeira divisão de HCl seguida por hidrólise da imina intermediária, que produz um aldeído e amoníaco, representado essas etapas de degradação pelas Equações 9 e 10, respectivamente (GOTTARDI; NAGL, 2010).



A capacidade de oxidação é perdida facilmente com ácidos N-cloro- α -aminocarbônicos, diminui com N-cloro- β -alanina e é mais lenta com NCT. Isso pode ser observado e explicado pela dissimilaridade do carboxilato e sulfonato das moléculas isostéricas N-cloro- β -alanina e NCT, enquanto o grupo CH_2 interjacente melhora a estabilidade da N-cloro- β -alanina em comparação com N-cloro- α -alanina (GOTTARDI; NAGL, 2010).

3.8 ESTABILIDADE DA TAURINA CLORAMINA

Com ação química diferente do HOCl, as cloraminas variam em estabilidade e reatividade, podendo então reagir mais rapidamente ou lentamente de acordo com o composto em questão. Desse modo, seus efeitos nas células podem variar, dependendo de cada sítio de acesso nas células (PESKIN et al., 2005). De acordo com Peskin et al. (2005), pesquisas sobre tratamento com HOCl e cloraminas, mostram que ambos podem se combinar, formando diferentes cloraminas em um mesmo meio e ainda essas cloraminas podem clorar outras aminas, resultando em uma complexa resposta celular. Segundo Gottardi; Nagl (2010), a atividade microbicida do NCT é aumentada na presença de compostos de NH, que podem anular os efeitos de consumo e degradação, a partir dos compostos glicina ~ α -alanina < β -alanina, que aumentam esse efeito nessa ordem. A temperatura ambiente, os derivados N-cloro de ácidos α -aminocarbônicos, como glicina e alanina, por exemplo, rapidamente desintegram-se.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

Os reagentes e soluções utilizadas: ácido hipocloroso (HOCl), fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), taurina, β-alanina, fosfoetanolamina, α-alanina, ácido 5,5' -ditio-bis-[2-nitrobenzóico] (DTNB), peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para desenvolvimento desse trabalho, foram: balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA); medidor de pH (Analyser modelo 300m Digital - São Paulo, Brasil); espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA); luminômetro para microplacas centro XS³ LB 960 (Berthold Technologies Bioanalytic).

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

4.3.1 Solução tampão fosfato de sódio

Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 7,0 foram preparadas duas soluções: uma solução de fosfato dibásico de sódio 50,0 mM (Massa Molar = 141,96 g.mol⁻¹) foram pesados 7,098 g em 1,0 L de água, e uma solução de fosfato monobásico de sódio 50,0 mM (Massa Molar = 119,98 g.mol⁻¹) foram pesados 5,999 g em 1,0 L de água. Em um béquer foram adicionados 400 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 50,0 mM. O ajuste do pH foi realizado adicionando-se a solução de fosfato dibásico de sódio 50,0 mM.

4.3.2 Solução de taurina

Para o preparo de 50,0 ml da solução de taurina 4,0 mM (Massa Molar = 125 g.mol⁻¹) foram pesados 0,0257 g e dissolvidos em solução tampão fosfato, pH 7,0. Armazenou-se em geladeira.

4.3.3 Solução de β-alanina

Para o preparo de 50,0 ml da solução de β-alanina 4,0 mM (Massa Molar = 89,09 g.mol⁻¹) foram pesados 0,0178 g e diluídos em solução tampão fosfato, pH 7,0. Armazenou-se em geladeira.

4.3.4 Solução de fosfoetanolamina

Para o preparo de 50,0 ml da solução de fosfoetanolamina 4,0 mM (Massa Molar = 141,06 g.mol⁻¹) foram pesados 0,0282 g e dissolvidos em solução tampão fosfato, pH 7,0. Armazenou-se em geladeira.

4.3.5 Solução de α-alanina

Para o preparo de 50,0 ml da solução de α-alanina 4,0 mM (Massa Molar = 89,09 g.mol⁻¹) foram pesados 0,0178 g e dissolvidos em solução tampão fosfato, pH 7,0. Armazenou-se em geladeira.

4.3.6 Solução de ácido hipocloroso

A solução de ácido hipocloroso (HOCl) foi preparado a partir de uma solução a 1,11 M, e feita uma diluição em tampão fosfato de sódio, para de obter uma solução 2 mM. A concentração desta solução foi determinada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis, a partir da Lei de Lambert-Beer e sabendo-se que $\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o HOCl dissolvido em NaOH 0,01 M, calculou-se a concentração real. A solução foi mantida em geladeira.

4.3.7 Soluções para preparo das cloraminas

Para o preparo das cloraminas, utilizou-se as soluções previamente preparadas de taurina, β -alanina, fosfoetanolamina e α -alanina 4 mM cada, e em quatro tubos distintos preparou-as a partir de 5,0 ml de solução e 5,0 ml de HOCl 2 mM, portanto, em uma proporção de 2:1, respectivamente. Armazenou-as em geladeira.

4.3.8 Solução DTNB (ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico])

Para o preparo de 100 ml da solução de DTNB 2,0 mM, pH 7,0 (Massa Molar = 396,35 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) foram pesados 0,0793 g de DTNB e diluído em tampão fosfato, pH 7,0. O pH foi ajustado em um medidor de pH, primeiramente elevou-se o pH até aproximadamente 12,0 com uma solução de NaOH 1 M, esperou 5 minutos e ajustou o pH para 7,0 com solução de HCl 1M. Armazenou a solução em vidro âmbar, borbulhou-se argônio para regredir o processo de oxidação por parte do oxigênio, no qual é inerente à solução, e manteve-a em geladeira.

4.3.9 Solução de peróxido de hidrogênio

Para o preparo de 10 mL da solução de peróxido de hidrogênio 100 mM, diluiu-se 100 μL em tampão fosfato, pH 7,0, para se obter o H_2O_2 a 1 mM. A solução foi armazenada em geladeira.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Determinação da absorbância das soluções utilizando o espectrofotômetro UV-Vis

Inicialmente foram realizadas medições das absorvâncias no espectrofotômetro UV-Vis dos reagentes puros em solução com tampão fosfato, pH 7,0; com o ácido hipocloroso, taurina, β -alanina, fosfoetanolamina, α -alanina, para que pudesse determinar a curva de absorvância do composto sozinho.

A partir das soluções de cloramina previamente preparadas na proporção de 2:1 (PESKIN et al., 2005), foi realizada a absorvância das amostras em um intervalo de tempo, correspondente a 6 medidas, ao qual, a cada dois dias eram realizadas as medidas de absorvância para cada amostra de taurina cloramina, β -alanina cloramina, fosfoetanolamina cloramina, α -alanina cloramina; afim de compreender o decaimento das concentrações das soluções, a partir da absorvância das amostras.

4.4.2 Determinação da concentração das cloraminas utilizando o ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB)

Para determinação das concentrações das cloraminas, a partir do reagente DTNB, foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis, de modo que ele medisse a absorvância das amostras, preparadas em proporção de 2:1, DTNB e cloraminas, respectivamente (KETTLE; WINTERBOURN, 1994). Os testes foram realizados no tempo de 10 dias, realizadas, a cada 2 dias.

4.4.3 Determinação da concentração das cloraminas com peróxido de hidrogênio e utilizando luminômetro

No método de determinação da concentração das cloraminas pelo peróxido de hidrogênio, foi utilizado o luminômetro para microplacas, onde em quatro compartimentos da microplaca, foram preparadas soluções para a leitura no aparelho. Em cada compartimento foi adicionado 100 μ l da cloramina 4 mM a ser analisada, taurina cloramina, β -alanina cloramina, fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina; e 10 μ l de melatonina, e então o equipamento adicionou 100 μ l de peróxido de hidrogênio.

Em um segundo modo, foi analisado o comportamento das cloraminas, diante a retirada de algumas soluções, no entanto mantendo as mesmas quantidades já utilizadas. No primeiro momento, foi adicionado a cloramina, melatonina e o H₂O₂, pelo equipamento; em

segundo apenas a cloramina com o H_2O_2 ; e por fim apenas a melatonina e H_2O_2 , seguindo esse mesmo métodos para todas as cloraminas.

5 RESULTADOS

5.1 ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA

5.1.1 Substâncias puras

Esta seção trata das substâncias puras, antes de serem transformadas em suas respectivas cloraminas (Figura 6). Para isso, foram obtidos os espectros de absorvância, os quais poderiam ser comparados posteriormente com os espectros das cloraminas. Na Figura 7, pode-se analisar e verificar o espectro de absorvância do ácido hipocloroso (HOCl), no comprimento de onda de 292 nm, e seu coeficiente de absorção molar é de $350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (PESKIN et al., 2005), e então a partir da Lei de Lambert-Beer que relaciona a absorção de luz com as propriedades das soluções analisadas (Equação 11), realizar o cálculo das concentrações das soluções propostas nos experimentos.

$$A = \mathcal{E} \cdot l \cdot c, \text{ onde} \tag{11}$$

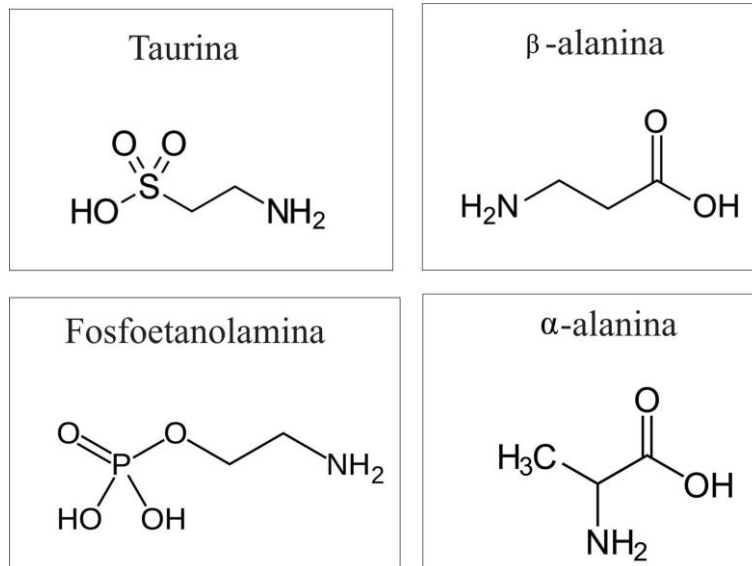
A = absorvância

l = distância que a luz atravessa pelo corpo

c = concentração de substância absorvente no meio ($\text{M}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)

\mathcal{E} = absorvidade molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), específica de cada substância

Figura 6 - Estrutura molecular dos aminoácidos estudados



Fonte: Elaborado pelo autor.

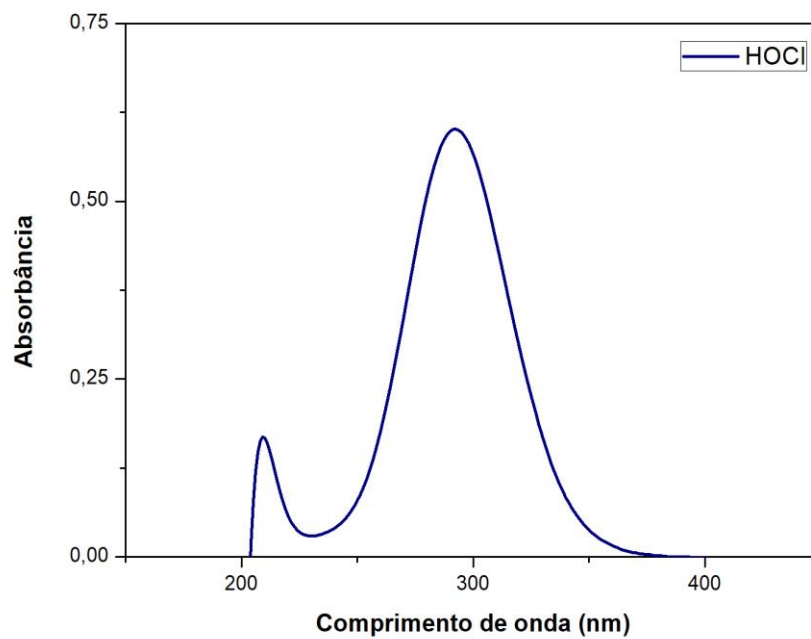
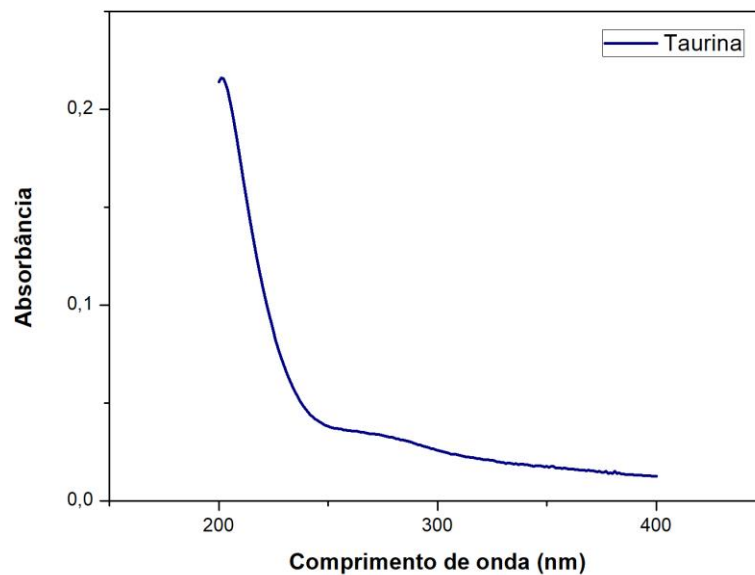


Figura 7 - Espectros da absorbância do ácido hipocloroso, por espectrofotômetro UV-Vis

Fonte: Elaborado pelo autor.

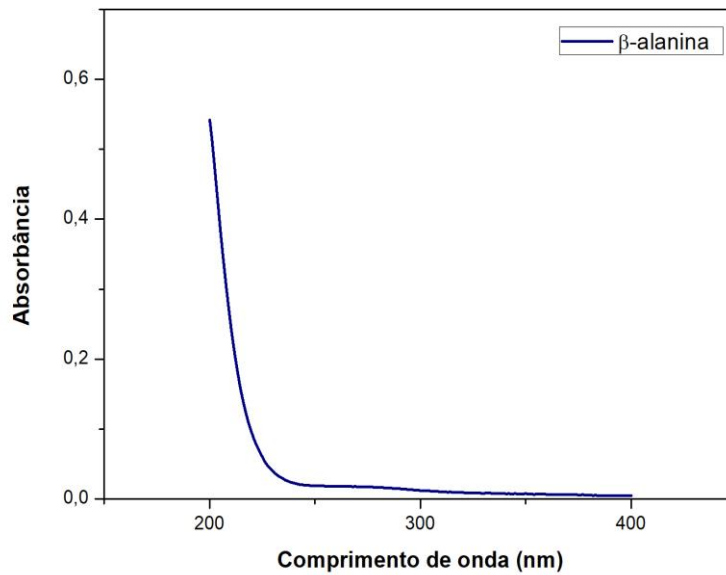
As Figuras 8, 9, 10 e 11 representam gráficos das substâncias puras, taurina, β -alanina, fosfoetanolamina e α -alanina, respectivamente. As mesmas foram realizadas a fim de mostrar a diferença dos espectros de absorbância das substâncias puras, para as cloraminas.

Figura 8 - Espectros da absorbância da taurina, por espectrofotômetro UV-Vis



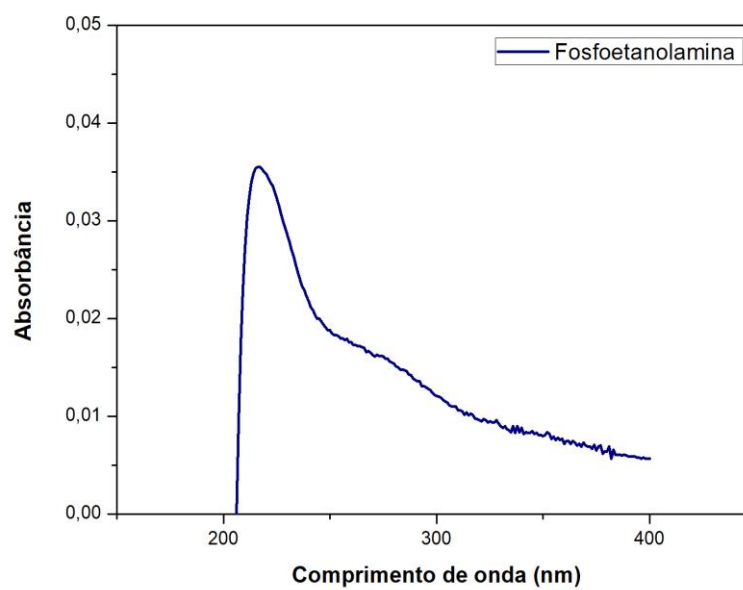
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Espectros da absorbância da β -alanina, por espectrofotômetro UV-Vis



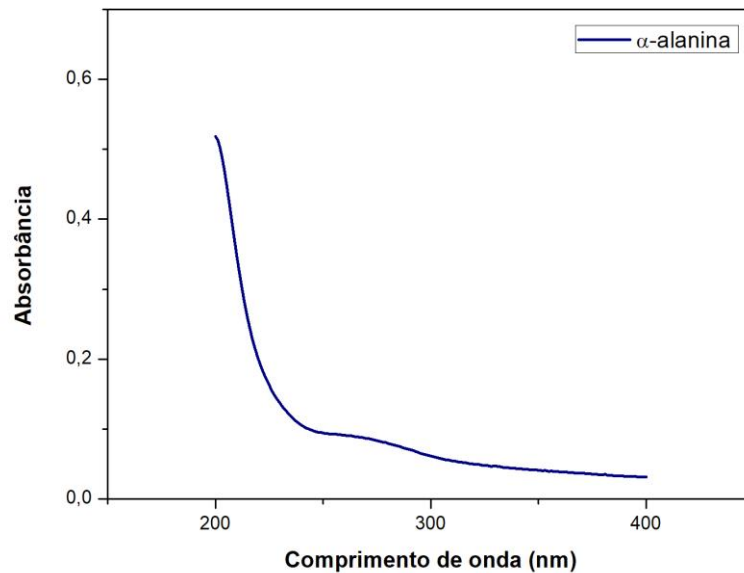
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Espectros da absorbância da fosfoetanolamina, por espectrofotômetro UV-Vis



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Espectros da absorbância da α -alanina, por espectrofotômetro UV-Vis

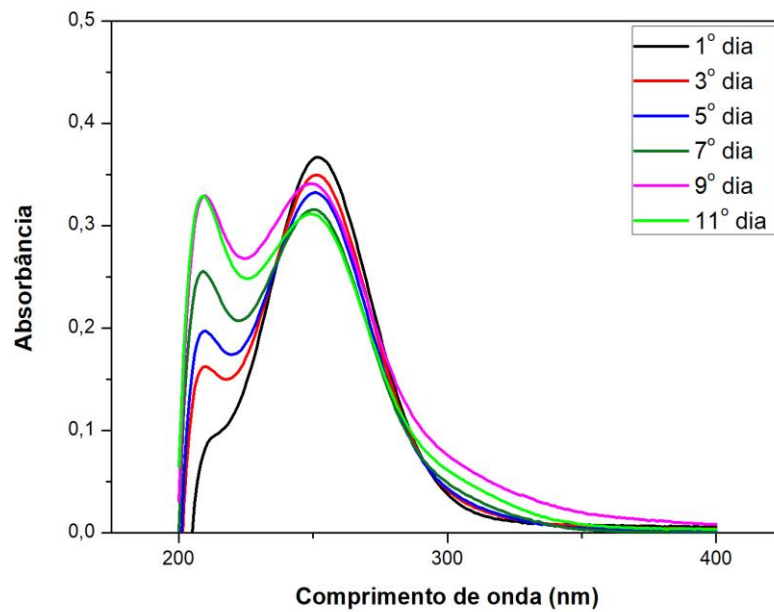


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Análise de concentração das cloraminas

As cloraminas foram preparadas pela reação entre os aminoácidos e HOCl como apresentado em Materiais e Métodos. A partir do comprimento de onda conhecido de 252 nm para taurina cloramina, e seu coeficiente de absorção molar de $429 \text{ M}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (PESKIN et al., 2005), foi possível a partir da Equação 11, o cálculo das concentrações obtidas a cada análise feita, de acordo com o gráfico representado pela Figura 12, que mostra o espectro de absorção em função do tempo, obtido para uma mesma solução mantida em geladeira.

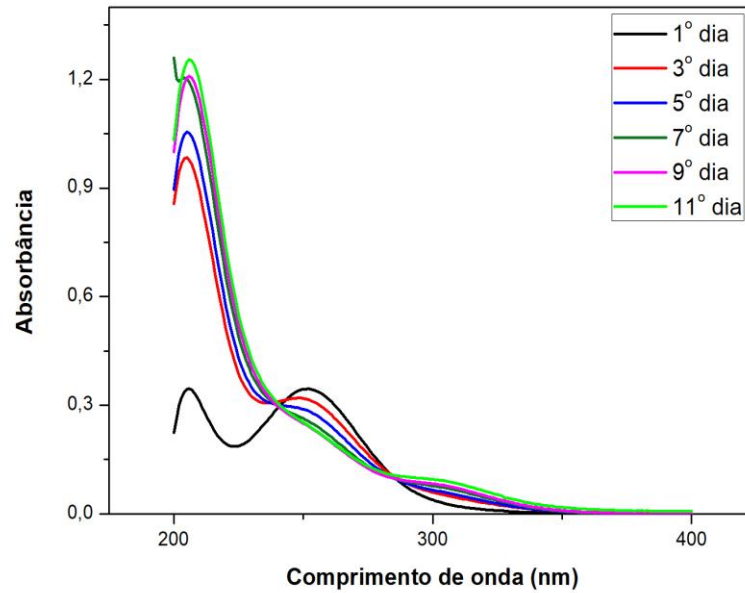
Figura 12 – Decomposição da taurina cloramina em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para as demais cloraminas não foi possível realizar o mesmo cálculo, devido ao desconhecimento do coeficiente de absorção molar, o qual é específico para cada composto. Desse modo, é possível uma análise qualitativa das Figuras 13, 14 e 15, que representam graficamente os compostos β -alanina cloramina, fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina, respectivamente. Essa análise é possível, pois, segundo Peskin et al. (2005) as cloraminas têm um comprimento de onda, de aproximadamente 252 nm. Na Figura 13 é possível observar o comportamento de decaimento da β -alanina cloramina, o qual foi muito parecido com a taurina cloramina.

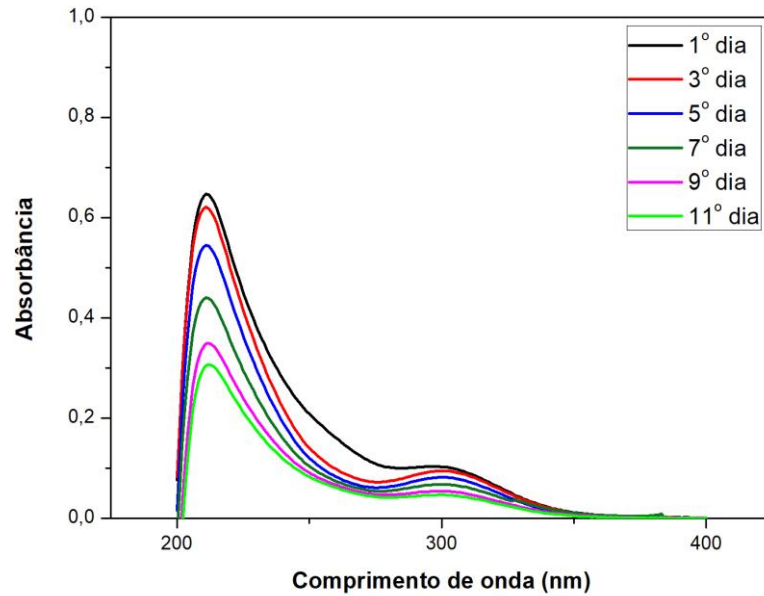
Figura 13 - Decomposição da β -alanina cloramina em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A cloramina da fosfoetanolamina apresentou-se mais instável se comparado com a taurina cloramina (Figura 14). Apresentou maior absorbância e um menor comprimento de onda, diferentemente do comportamento esperado para as cloraminas, que é de um comprimento de onda na faixa de 252 nm.

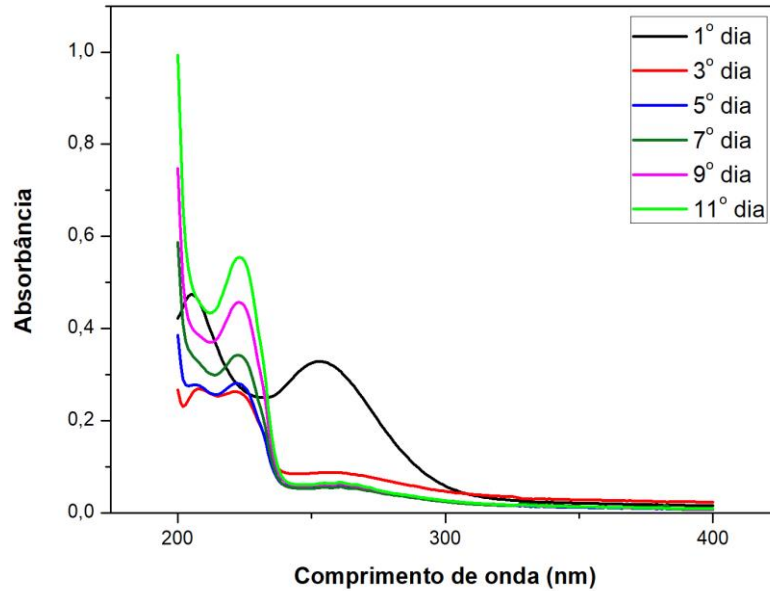
Figura 14 - Decomposição da fosfoetanolamina cloramina em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Já a α -alanina cloramina foi a mais instável das cloraminas estudadas, apresentando-se decomposta já na segunda medida (Figura 15). A faixa de comprimento de onda se mantém próxima de 252 nm.

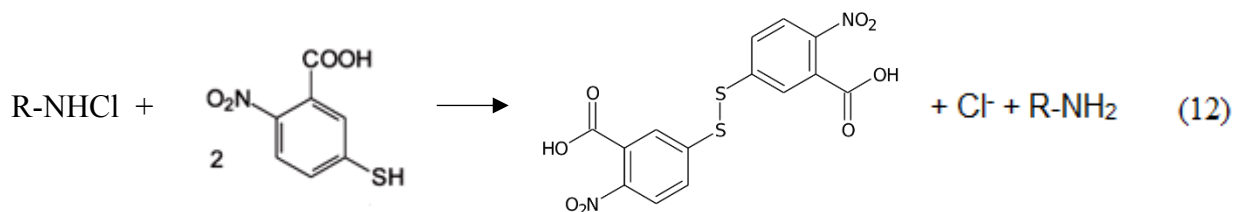
Figura 15 - Decomposição da α -alanina cloramina em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

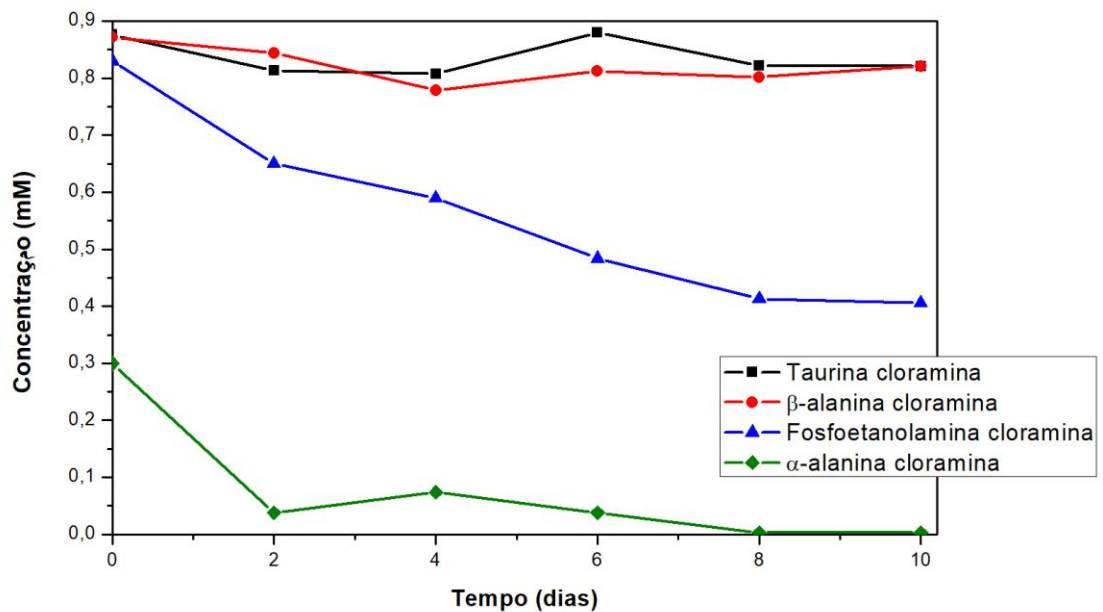
5.2 CONCENTRAÇÃO DAS CLORAMINAS PELO REAGENTE ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS(2-NITROBENZÓICO) (DTNB)

Neste experimento, as concentrações foram determinadas pela reação das cloraminas com ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). A Equação 12 apresenta a oxidação do 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) com as cloraminas, à ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), medindo o decréscimo da absorvância de TNB.



Os cálculos das concentrações obtidas no experimento foram realizados a partir da Lei de Lambert-Beer (Equação 11), na qual relaciona a absorção obtida nas análises feitas no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 412 nm para as amostras e o coeficiente de absorção molar para o TNB é de $14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (KETTLE; WINTERBOURN, 1994). A figura 16, ilustra o gráfico obtido com base nos resultados das absorbâncias, no intervalo de tempo de 10 dias.

Figura 16 - Determinação da concentração das N-cloraminas, em determinado intervalo de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

A taurina cloramina e a β -alanina cloramina, apresentaram concentrações muito semelhantes com o passar do tempo. A taurina cloramina tem características antissépticas já conhecidas na literatura. Interessante notar que a β -alanina cloramina, substância não utilizada para este propósito, obteve resultados muito semelhantes aos esperados para uma ação antisséptica.

Os compostos que apresentam uma maior velocidade de decomposição foram a fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina. No entanto, a α -alanina cloramina tem um

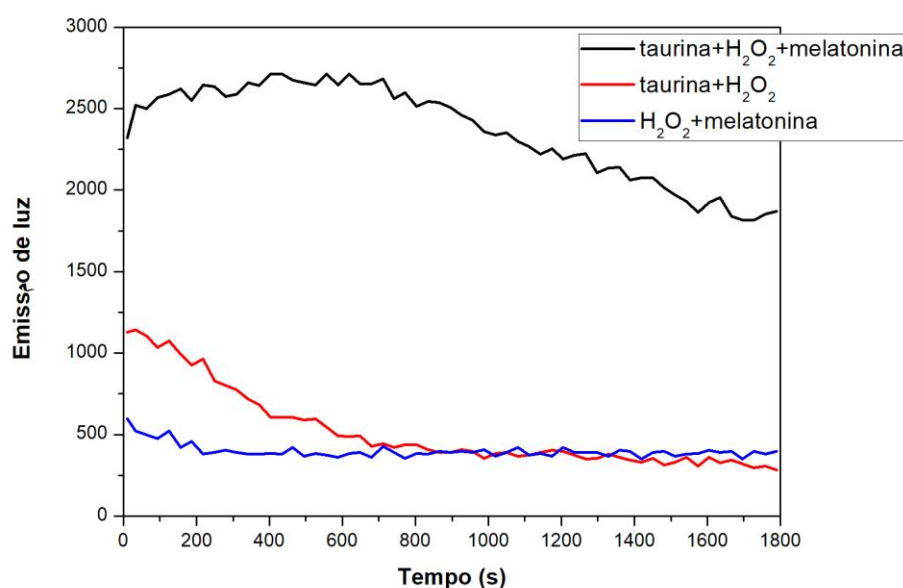
decaimento maior em relação aos outros compostos analisados, desde a primeira análise feita, que foi realizada após a solução de α -alanina cloramina ser preparada.

5.3 CONCENTRAÇÃO DAS CLORAMINAS A PARTIR DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Nesse experimento a reatividade das cloraminas foram medidas a partir de suas reações com o peróxido de hidrogênio levando à formação de oxigênio singlete. Para detecção deste último procede-se a sua reação com o composto melatonina, o que resultará na emissão de quimiluminescência. As reações foram monitoradas em um Luminômetro.

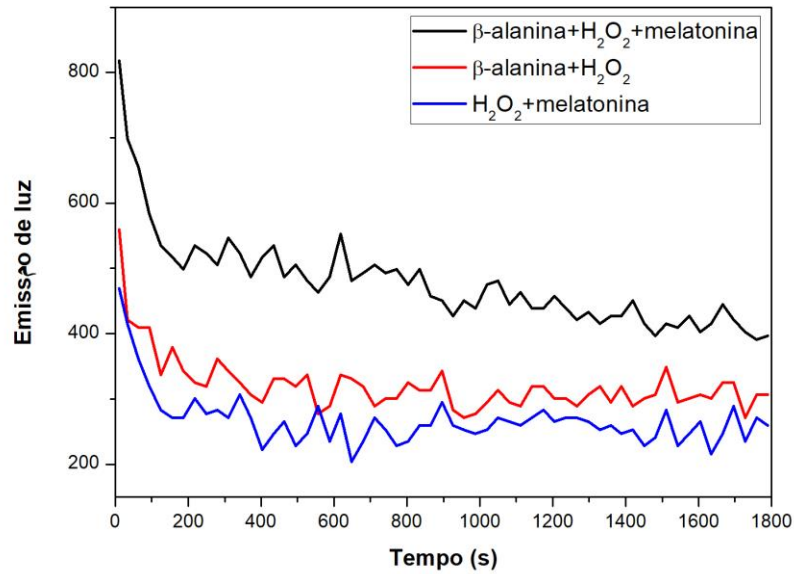
Nas figuras de 17 a 19 estão apresentados os resultados dos experimentos utilizando os aminoácidos taurina, β -alanina e fosfoetanolamina, respectivamente; como comparativo aos que representavam as cloraminas. Nesse momento observa-se que a emissão de luz nos aminoácidos é mais baixa, por haver a falta de cloramina presente nos compostos, as quais é necessária para que a reação de formação do oxigênio singlete aconteça, sendo este responsável pela emissão de luz nos compostos.

Figura 17 - Emissão de luz da taurina, em determinado intervalo de tempo



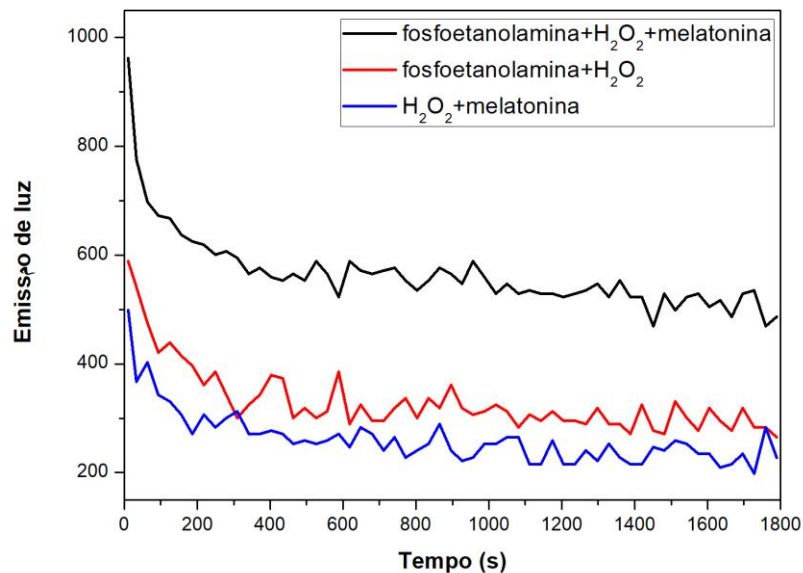
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Emissão de luz da β -alanina, em determinado intervalo de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Emissão de luz da fosfoetanolamina, em determinado intervalo de tempo

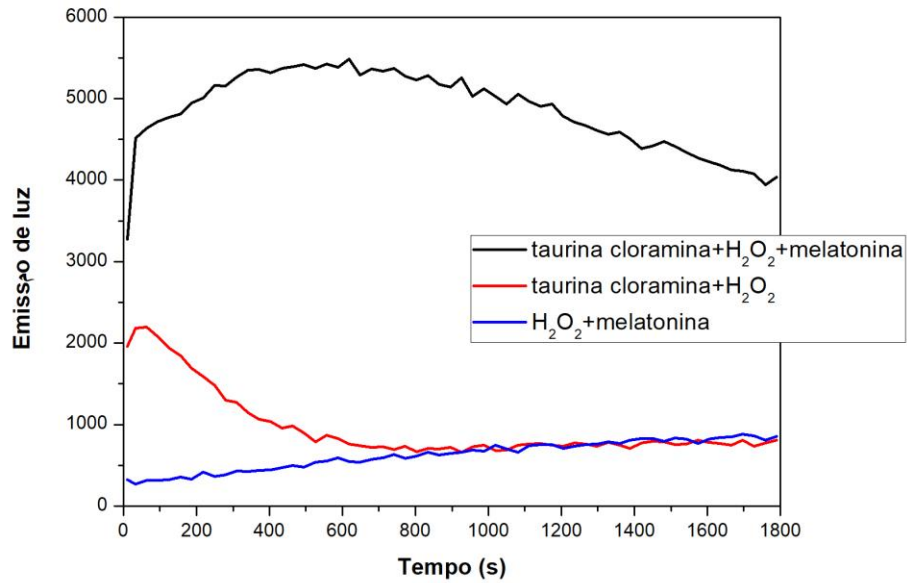


Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras de 20 a 22 mostram o comportamento das cloraminas, que apresentam uma maior emissão de luz, quando comparado com as Figuras de 17 a 19 em que a emissão de luz é

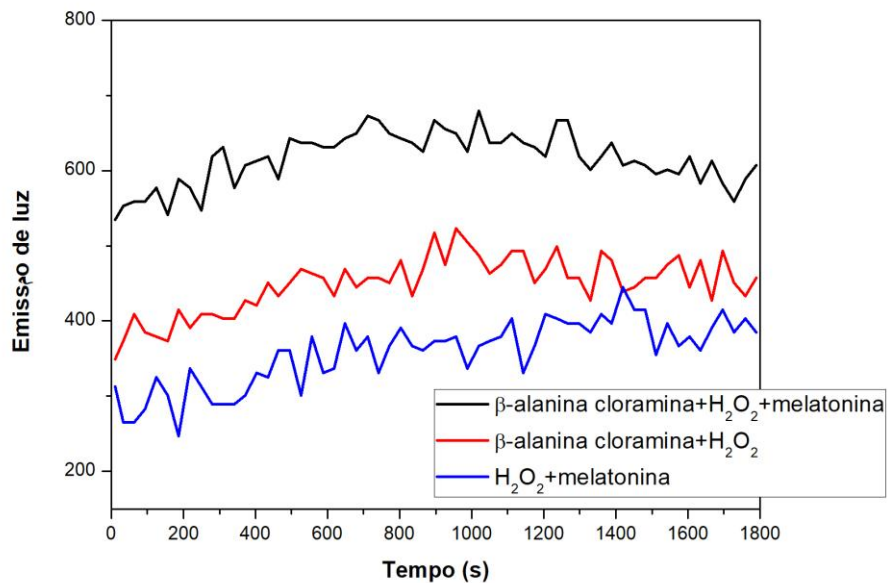
menor. Pode-se observar que a emissão de luz é maior, em função das cloraminas presentes em reação, que fazem a formação de $^1\text{O}_2$, responsável pela captação de luz.

Figura 20 - Emissão de luz da taurina cloramina, em determinado intervalo de tempo



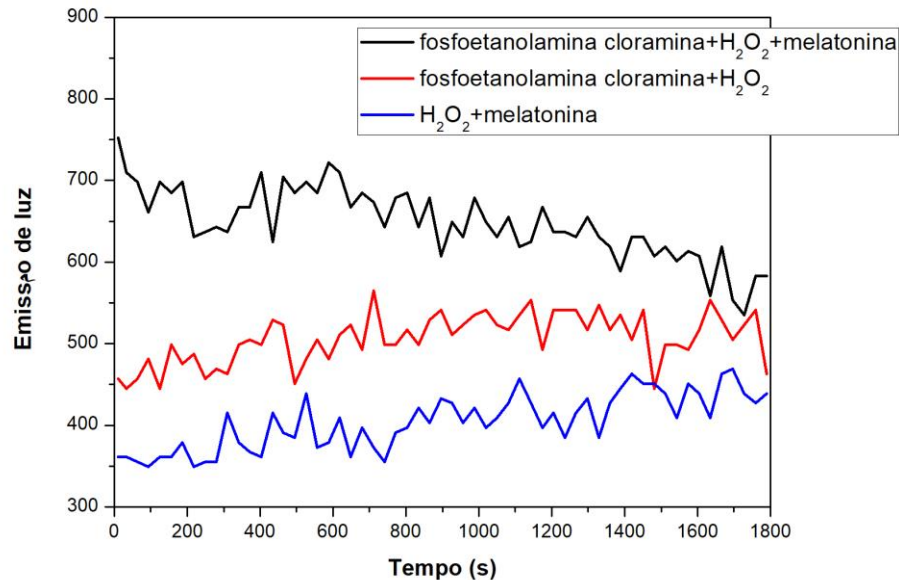
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Emissão de luz da β -alanina cloramina, em determinado intervalo de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Emissão de luz da fosfoetanolamina cloramina, em determinado intervalo de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

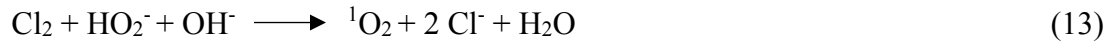
No experimento há ainda a reação das cloraminas apenas com o peróxido de hidrogênio, podendo ser observado uma diminuição na emissão de luz devido a ausência de melatonina, a qual é responsável por tornar o oxigênio singlete que se forma, capaz de ser captado pelo equipamento. No terceiro caso, foi realizada a reação apenas entre o peróxido de hidrogênio e a melatonina, onde pode-se observar uma diminuição ainda mais considerável em relação as demais reações, por nessa reação não haver a formação de oxigênio singlete.

O ácido hipocloroso (HOCl) pode ser produzido pela mieloperoxidase (MPO), na qual catalisa a oxidação de Cl⁻ por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para produzi-lo, atuando como agente oxidante. No entanto, na reação com HOCl, ele age como um agente redutor (NAGL et al., 2000; THOMAS, 1979).

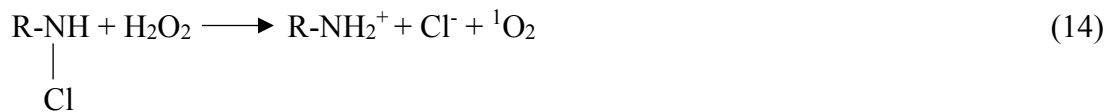
O resultado efetivo da oxidação de Cl⁻ e redução de HOCl é o mesmo catalisado pela enzima catalase, resultando na perda dos equivalentes oxidantes de H₂O₂ e na formação de oxigênio molecular, O₂ (THOMAS, 1979).

Uma espécie reativa, pode ser formada como intermediário da reação de redução de HOCl por H₂O₂, que em condições alcalinas, o cloro (Cl₂) reage com uma forma desprotonada

de H_2O_2 para produzir oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o qual é uma forma ativada de O_2 , (Equação 13) (THOMAS, 1979).



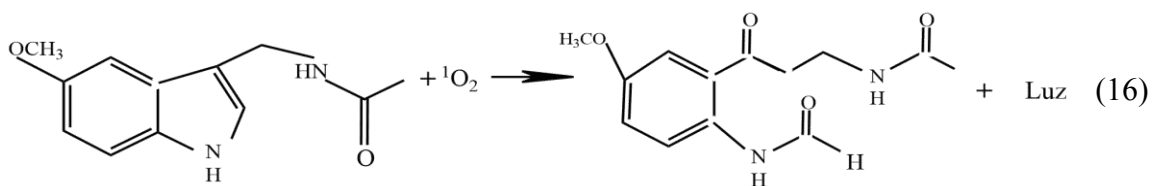
Na reação das cloraminas em estudo, com o peróxido de hidrogênio, a equação 14, exemplifica como ocorre a formação do oxigênio singlete.



O oxigênio singlete possui tempo de vida curta e decai para o estado fundamental triplete emitindo luz, a qual é captada no luminômetro (Equação 15) (THOMAS, 1979).



No entanto, o feixe de luz emitido pelo $^1\text{O}_2$ no momento da reação das cloraminas com o H_2O_2 é muito fraco, que se torna incapaz de ser captado pelo luminômetro, dessa maneira é necessário a adição de melatonina, para que essa luz possa ser captada pelo equipamento, essa reação é apresentada na equação 16.



O oxigênio singlete é uma espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigênio. O oxigênio molecular, no seu estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados nos seus orbitais moleculares de mais alta energia. Já a molécula de oxigênio singlete, apresenta dois elétrons emparelhados que podem estar em orbitais iguais ou diferentes. Dessa forma o oxigênio singlete pode ser gerado por um acréscimo de energia, tornando-o mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental (RONSEINL et al., 2006).

A geração do oxigênio singlete ocorre por sistemas enzimáticos pró-oxidativos, ao qual o peróxido de hidrogênio reage com cloraminas para formar o oxigênio singlete não-radicalar (STIEF, 2003).

6 DISCUSSÃO

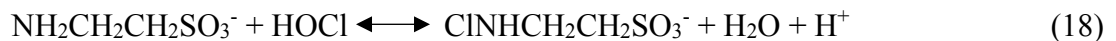
O uso das cloraminas quando comparado com o cloro, é de maior eficácia por elas apresentarem uma baixa reatividade e poder ser utilizado para diversos fins, sem que cause danos consideráveis. O uso das cloraminas é uma alternativa mais barata entre os desinfetantes normalmente utilizados, como o dióxido de cloro e ozônio (LEUNG; VALENTINE, 1994).

Quando ocorre a reação do HOCl com a taurina, ou com outras aminas (compostos R-NH₂), resulta-se na formação de derivados de RNHCl, cada qual com suas características próprias diante da combinação com ácido hipocloroso. Para uma reação genérica, apresenta-se a Equação 17 (GRISHAM et al., 1984).



A partir dos compostos R-NH₂ usados nos experimentos, pode-se obter as Equações 18, 19, 20 e 21, a partir da reação das R-NH₂, com o ácido hipocloroso, formando as cloraminas desejadas.

Taurina cloramina



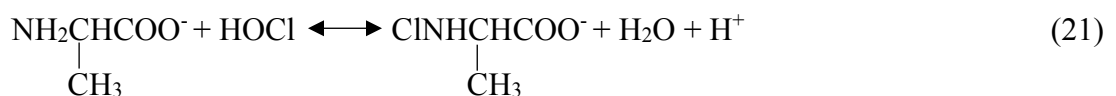
Fosfoetanolamina cloramina



β-alanina cloramina



α-alanina cloramina



De acordo com Nagl et al. (2000), a taurina cloramina apresenta características mais estáveis, de um ácido N-cloro-aminoácido que pode ser reduzido em uma estrutura de β-aminoácido, e nota-se, que ele mantém a capacidade de oxidação durante muitas horas. Em

relação às funções biológicas, a formação de taurina cloramina está aliada há proteção das células humanas do dano causado pelo HOCl (NAGL et al., 2000). A alta estabilidade e reatividade reduzida (quando comparado com HOCl), faz-se acreditar que a taurina cloramina mantém uma capacidade oxidativa por muitas horas, como um agente antisséptico, por haver a destruição de patógenos devido à sua atividade bactericida e atividade fungicida (NAGL et al., 2001).

Essas cloraminas “genéricas” que se formaram, reagem lentamente com neutrófilos ou células alvo, muito provavelmente porque não penetram facilmente as membranas celulares (GRISHAM et al., 1984).

HUSSAIN et al. (1993), deixa claro a criação de diferentes RNHCl é muito instável e que a estabilidade do mesmo é muito dependente das características estruturais do composto. De acordo com Gottardi; Nagl (2010), a estabilidade dos compostos oxidantes, é devido a um dos fatores, a transalogenação dos compostos. Esse fator é observado nos compostos de N-cloro, onde há a transferência do halogênio para outro composto N-H; esse mesmo fenômeno pode ser previsto para outros compostos de aminoácidos e peptídeos, por exemplo, atuando como agentes de cloração e definindo uma reação. Bruice (2006), destaca a baixa estabilidade agregada a α -alanina quando usada em uso antisséptico, devido a posição do nucleófilo na cadeia, diferente da β -alanina que possui uma maior estabilidade agregada na molécula.

7 CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados, foi possível observar que a taurina cloramina e β -alanina cloramina possuem estabilidade e reatividade bastante parecidas, evidenciando o seu baixo poder oxidativo. Os outros dois compostos fosfoetanolamina cloramina e α -alanina cloramina, particularmente esta última, apresentaram uma queda mais acentuada nas suas concentrações, o que indica maior reatividade e consequente instabilidade dentro da faixa de tempo analisada.

Mediante as propostas de novas formulações para antissépticos, o uso da taurina cloramina já é conhecido, fazendo necessário a busca de novos produtos. É possível afinar a partir dos experimentos realizados, dentro das condições descritas, métodos e abordagens adotadas que é possível a utilização da β -alanina cloramina como antisséptico, por possuir características mais próximas da taurina cloramina, a qual já detém estudos e especificações. No entanto, para melhor embasamento, seria necessário o estudo em futuros trabalhos, de como e onde a melhor utilização desses antissépticos, para que o uso seja consciente e possa eliminar os microorganismos que se adequam a cada antisséptico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUA, Madhabi; LIU, Yong; QUINN, Michael R. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- α gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF- κ B activation and I κ B kinase activity. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 2275-2281, 2001.
- BIRDSALL, Timothy C. Therapeutic applications of taurine. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, n. 2, p. 128-136, 1998.
- BOUCKENOOGHE, T.; REMACLE, C.; REUSENS, B.. Is taurine a functional nutrient?. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 9, n. 6, p. 728-733, 2006.
- BRUICE, Paula. Y.; Química Orgânica, 4ªEd.; vol 2, p. 180-187, 2006.
- DAKIN, H. D. et al. The antiseptic action of substances of the chloramine group. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 89, n. 614, p. 232-251, 1916.
- DENYER, Stephen Paul; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 3-4, p. 261-268, 1998.
- GOTTARDI, Waldemar; NAGL, Markus. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 399-409, 2010.
- GOTTARDI, Waldemar; DEBABOV, Dmitri; NAGL, Markus. N-chloramines, a promising class of well-tolerated topical anti-infectives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1107-1114, 2013.
- GRISHAM, Matthew B. et al. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10404-10413, 1984.
- HANSEN, Svend Høime. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 17, n. 5, p. 330-346, 2001.
- HUSSAIN, Anwar A. et al. Chloramine-T in radiolabeling techniques: I. Kinetics and mechanism of the reaction between chloramine-T and amino acids. **Analytical biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 495-499, 1993.
- HUXTABLE, Ryan J. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. **Progress in neurobiology**, v. 32, n. 6, p. 471-533, 1989.

KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods enzymol**, 1994.

KIM, Chaekyun; CHA, Young-Nam. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. **Amino Acids**, v. 46, n. 1, p. 89-100, 2014.

KOROLKOVAS, Andrejus; BURCKHALTER, Joseph H. **Química farmacêutica**. p. 522-536, 1988.

LABARRAQUE, Antoine Germain. **On the Disinfecting Properties of Labarraque's Preparations of Chlorine: Particularly in Preventing Putrefaction... Also in Medical and Surgical Practice, and in the Diseases of Horses, with an Appendix by the Translator**. S. Highley, 1828.

LEARN, Douglas B.; FRIED, Victor A.; THOMAS, Edwin L. Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 48, n. 2, p. 174-182, 1990.

LEUNG, Solomon W.; VALENTINE, Richard L. An unidentified chloramine decomposition product—I. Chemistry and characteristics. **Water Research**, v. 28, n. 6, p. 1475-1483, 1994.

LOURENÇO. R.; CAMILO. M. E. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. **Nutr Hosp**, v. 17, n. 6, p. 262-270, 2002.

MARCINKIEWICZ, Janusz et al. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. **Journal of leukocyte biology**, v. 58, n. 6, p. 667-674, 1995.

MCDONNELL, Gerald; RUSSELL, A. Denver. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MORALES, H. Pasantes; SCHOUSBOE, A. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. **Journal of neuroscience research**, v. 20, n. 4, p. 505-509, 1988.

MORIYA, Takachi; MÓDENA, Jose Luiz Pimenta. Assepsia e antisepsia: técnicas de esterilização. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 41, n. 3, p. 265-273, 2008.

NAGL, Markus et al. Bactericidal Activity of Micromolar N-Chlorotaurine: Evidence for Its Antimicrobial Function in the Human Defense System. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2507-2513, 2000.

NAGL, Markus et al. Enhanced fungicidal activity of N-chlorotaurine in nasal secretion. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 871-874, 2001.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, 2002.

PESKIN, Alexander V. et al. Chlorine transfer between glycine, taurine, and histamine: reaction rates and impact on cellular reactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 3, p. 397-405, 2005.

REIS, L. M. dos. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em um serviço público de saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 5, 2011.

LIMA, T. F. O. Modulação da mieloperoxidase e elastase de neutrófilos pela aminoguanidina. 2016.

RONSEINL, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**. v.29 no.3 São Paulo, 2006.

SCHULLER-LEVIS G. B, PARK E. Taurine: new implications for an old amino acid. **FEMS Microbiol Lett**. v.226, n. 2, p. 195-202, 2003.

SJÖVALL, J. Dietary Glycine and Taurine on Bile Acid Conjugation in Man.*† Bile Acids and Steroids 75. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 100, n. 4, p. 676-678, 1959.

SOUZA, A. C. S; PEREIRA, M. S.; RODRIGUES, M. A. V. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 6, n. 3, p. 95-105, 1998.

SOUZA, C. et al. Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária notícias**, v. 12, n. 2, p. 17-23, 2006.

STAPLETON, P. P. et al. Taurine and human nutrition. **Clinical nutrition**, v. 16, n. 3, p. 103-108, 1997.

STIEF, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. **Elsevier Science Ltd. All rights reserved**. p. 567-572, 2003.

SZYMANSKI. K, W. K. Taurine and its potential therapeutic application. **Postepy Hig Med Dosw**. v.62, p. 75-86, 2008.

TIBIRIÇÁ, C. C. Atuação do pessoal de enfermagem nas medidas de controle de infecções hospitalares. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 27, n. 4, p. 462-471, 1974.

THOMAS, E. L. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 522-531, 1979.

XIMENES, V. F.; FONSECA, M. L.; ALMEIDA, A. Taurine bromamine: A potent oxidant of tryptophan residues in albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2011.