

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



Eficiência de iodo aquoso e ácido acético sobre a desinfecção
de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii*

LARISSA CRISTINA LACHNIT

Orientador: Marilise Brittes Rott

PORTO ALEGRE

2014/2

Introdução

Amebas de Vida livre (AVL) estão entre os protozoários mais encontrados no ambiente. Já foram isoladas de água potável, do ar, de redes de água e poeira de hospitais, torres de resfriamento, piscinas, estojos de lentes de contato e outros (Coulon, Céline, et al. 2010).

Entre as AVL, espécies de *Acanthamoeba* podem servir de hospedeiros e vetor a vários microrganismos, como vírus e bactérias. Este gênero é responsável por doenças como a Encefalite Amebiana Granulomatosa, uma infecção do sistema nervoso central, que acomete indivíduos imunodeprimidos e Ceratite Amebiana, que provoca lesões na córnea e atinge indivíduos saudáveis, especialmente os usuários de lentes de contato (Mogoa et al. 2010).

Acanthamoeba possui duas formas biológicas: a trofozoítica e a cística. A primeira é a forma vegetativa do protozoário, a forma pela qual se alimenta e se reproduz. A segunda forma acontece quando a ameba está sob condições desfavoráveis, de estresse ambiental e o trofozoíto sofre o encistamento (Coulon, Céline, et al. 2010). Os cistos de *Acanthamoeba* são muito resistentes a tratamentos químicos e podem sobreviver por longos períodos de tempo (Mogoa, Emerancienne, et al. 2010).

Não existe um método padrão para testar a atividade de desinfetantes sobre AVL. Além disso, existem poucos dados na literatura sobre a eficácia de produtos químicos usados na desinfecção de superfícies e aparelhos médicos em hospitais e sistemas de saúde que possam estar contaminadas pelas formas biológicas deste microrganismo. Entre os desinfetantes, o vinagre e o iodo são compostos acessíveis e baratos.

O ácido acético (vinagre) tem sido amplamente utilizado como desinfetante desde a antiguidade e hoje é comumente usado em alimentos. Existem dados mostrando sua eficácia na desinfecção de escovas dentais, superfícies de cozinha e materiais diversos. O ácido acético é relativamente não tóxico, barato e de fácil acesso, podendo ser utilizado como biocida de forma econômica e acessível para superfícies (Cortesia, Claudia, et al. 2014).

Diversas publicações têm mostrado a eficiência do iodo como desinfetante desde 1950. Atualmente, produtos baseados em iodo têm sido amplamente usados na

desinfecção de piscinas e água potável. O iodo penetra a parede celular de microrganismos e os efeitos letais devem-se à desnaturação de proteínas e danos à estrutura e síntese do ácido nucleico (Punyani, 2006).

Considerando-se a importância de *Acanthamoeba* como causadora de doenças e também devido ao seu papel como reservatório e vetor de microrganismos, a desinfecção de ambientes onde a assepsia pode representar um problema de saúde pública, é imperativa. Neste estudo, comparou-se a atividade biocida de iodo aquoso e ácido acético sobre a desinfecção de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii* em diferentes tempos e concentrações.

Materiais e Métodos

Cultivo Axênico de Acanthamoeba

A cepa *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) pertencente ao genótipo T4 foi utilizada para todos os experimentos. As amebas foram cultivadas em meio PYG (2% proteose peptona, 0,2% extrato de levedo e 1,8% glicose) e incubadas à temperatura constante de 30°C. Para a realização dos experimentos, o cultivo foi centrifugado por 5 min a 211 x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato salino tamponado (PBS) e, em seguida, diluído em meio PYG para obter a concentração final de 1×10^4 células/mL (SAUTER et al., 2011).

Produção dos cistos

Para a produção de cistos, 3 mL do cultivo de amebas foi tomado e lavado duas vezes em PBS e após centrifugado por 5 min a 211 x g. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspensionado em meio TRIS (95mM NaCl, 5mM KCl, 8mM MgSO₄, 0.4mM CaCl₂, 1mM NaHCO₃ e 20mM Tris-HCl, pH 9.0) e mantido a 30°C por 7 dias (KOEHLER et al., 2008).

Tratamentos de desinfecção

Dois desinfetantes normalmente não usados em superfícies hospitalares foram testados: iodo aquoso e ácido acético glacial. Os tratamentos foram realizados a 25°C. Os experimentos foram realizados em placas estéreis de 96 poços.

Soluções

Ácido acético: utilizou-se ácido acético glacial (99%). Foram feitas três diluições em água destilada: 10%, 5% e 2,5% (CORTEZIA, Claudia et al. , 2004).

Iodo: dissolveu-se iodo sólido em iodeto de potássio (KI) e água destilada, na concentração de 10mg/L. Realizou-se duas diluições seriadas e as seguintes concentrações foram testadas: 10mg/L, 5mg/L e 2,5mg/L (ELLIS, K. V., 1993).

Cistos

Tratamento com ácido acético

Os cistos de *A. castellanii* foram ressuspensos e retirados da placa com ágar, lavados duas vezes e sua viabilidade foi quantificada. Foram utilizados 1×10^5 cistos, que apresentavam viabilidade acima de 98%. A viabilidade foi calculada com base na câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal. 100 μL de cultura de *A. castellanii* e 100 μL de cada uma das três concentrações de ácido acético foram inoculados em cada poço de uma placa estéril de 96 poços. O controle negativo recebeu 100 μL de PBS e 100 μL de cistos de *A. castellanii*. Foram cronometrados 15 e 45 minutos. Após transcorridos os respectivos tempos, as células foram retiradas dos poços, coradas com corante vital azul de tripano e quantificadas em câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal, a fim de verificarmos a viabilidade dos cistos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tratamento com iodo aquoso

O mesmo procedimento acima descrito para o ácido acético foi empregado nesta etapa do experimento, com as concentrações de iodo aquoso anteriormente (pág. 4) citadas.

Trofozoítos

Tratamento com ácido acético

100 μL de cultura de *A. castellanii* contendo 1×10^4 células e 100 μL de cada uma das três concentrações de ácido acético foram inoculados em cada poço. O controle negativo recebeu 100 μL de PBS e 100 μL de cultura de *A. castellanii*. Foram cronometrados 15 e 45 minutos. Após transcorridos os respectivos tempos, as células foram retiradas dos poços, coradas com corante vital azul de tripano e quantificadas em câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal, a fim de verificarmos a viabilidade das células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tratamento com iodo aquoso

O mesmo procedimento acima descrito para o ácido acético foi empregado nesta etapa do experimento, com as respectivas concentrações de iodo aquoso anteriormente (pág. 4) citadas.

Resultados

A desinfecção com ácido acético sobre cistos, mostrou que o tempo de 45 minutos foi mais eficiente na inativação dos mesmos (concentração de 10% inativou 11,8% dos cistos; concentrações de 5% e 2,5% inativaram 10,2% dos cistos), se comparado ao tempo de 15 minutos (concentração de 10% inativou 7% dos cistos; concentração de 5% inativou 4,2% dos cistos e a concentração de 2,5% inativou 3% dos cistos). Ainda no mesmo teste, a concentração de 10% foi mais efetiva se comparada às concentrações de 5% e 2,5% nos dois tempos testados (Fig. 1).

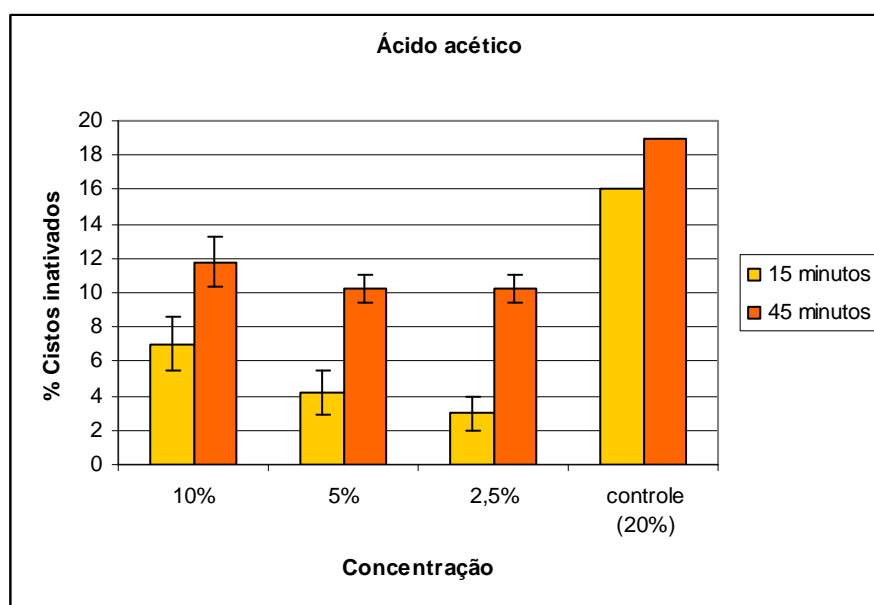


Figura 1: Inativação de cistos após o tratamento com ácido acético. Cistos de *A. castellanii* foram tratados durante 15 e 45 minutos e a viabilidade foi avaliada em câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal. Barras representam o desvio padrão da triplicata.

No tratamento com iodo sobre cistos, observa-se que o tratamento de 45 minutos foi mais eficiente que o tempo de 15 minutos apenas na concentração de 10% em 45 minutos: 11% de cistos inativados na concentração de 10%, 5% de cistos inativados na concentração de 5% e 4,6% de cistos inativados na concentração de 2,5%. No tempo de 15 minutos: 7,2% de cistos inativados na concentração de 10%; 4,2% de cistos inativados na concentração de 5% e 3% de cistos inativados na concentração de 2,5%). Não observa-se diferença na ação do iodo como desinfetante nas concentrações de 5% e 2,5%, em ambos os tempos testados (Fig. 2).

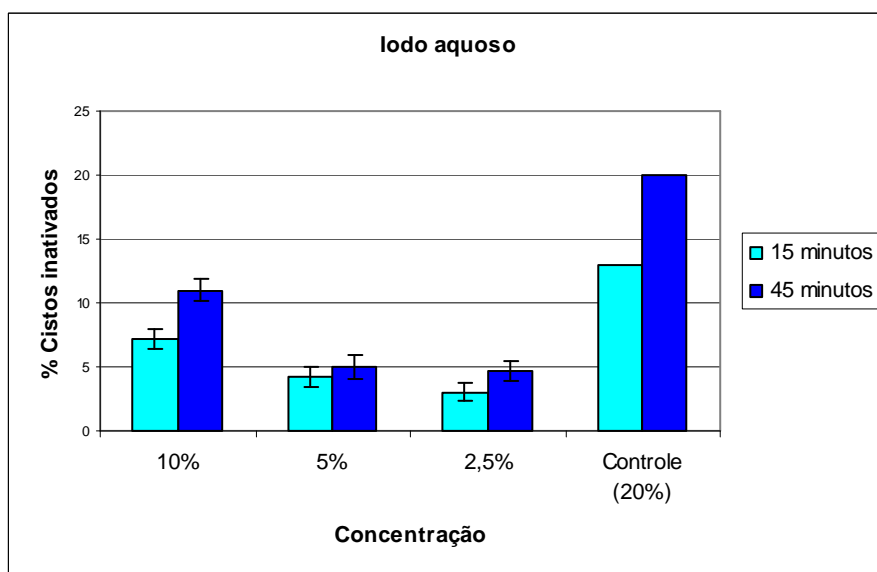


Figura 2: Inativação de cistos após o tratamento com iodo aquoso. Cistos de *A. castellanii* foram tratados durante 15 e 45 minutos e a viabilidade foi avaliada em câmara de contagem Fuchs–Rosenthal. Barras representam o desvio padrão da triplicata.

Os resultados do tratamento com ácido acético sobre trofozoítos foram satisfatórios, uma vez que na concentração de 10% mais de 98% das amebas foram inativadas nos dois tempos de teste (15 e 45 minutos). As concentrações de 5% e 2,5% foram igualmente eficientes no tempo de 45 minutos e tiveram eficiência um pouco menor no tempo de 15 minutos (em 45 minutos: 98% de trofozoítos inativados na concentração de 10%; 98% de trofozoítos inativados na concentração de 5% e 95% de trofozoítos inativados na concentração de 2,5%. No tempo de 15 minutos: 98% de trofozoítos inativados na concentração de 10%; 82,6% de trofozoítos inativados na concentração de 5% e 74,3% de trofozoítos inativados na concentração de 2,5%) (Fig. 3).

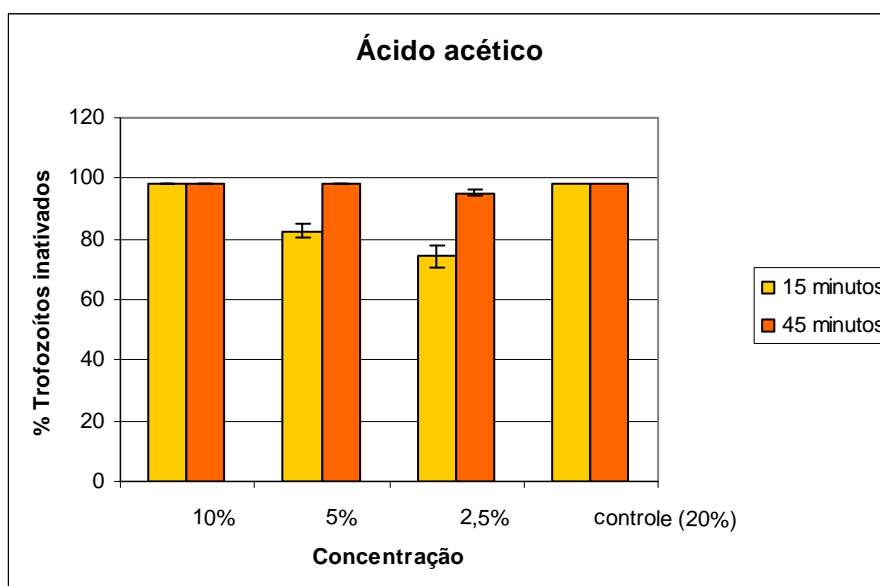


Figura 3: Inativação de trofozoítos após o tratamento com ácido acético. Células de *A. Castellanii* foram tratadas durante 15 e 45 minutos e a viabilidade foi avaliada em câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal. Barras representam o desvio padrão da triplicata.

O tratamento com iodo aquoso sobre trofozoítos de *A. castellanii* foi eficiente na concentração de 10% após 45 minutos de teste. No tempo de 15 minutos, a eficiência foi significativamente menor. Já nas concentrações de 5% e 2,5%, a atividade desinfetante do iodo foi baixa em ambos os tempos de teste (em 45 minutos: 43,3% de trofozoítos inativados na concentração de 10%; 8% de trofozoítos inativados na concentração de 5% e 4% de trofozoítos inativados na concentração de 2,5%. No tempo de 15 minutos: 18,3% de trofozoítos inativados na concentração de 10%; 4,3% de trofozoítos inativados na concentração de 5% e 3,6% de trofozoítos inativados na concentração de 2,5%) (Fig. 4)

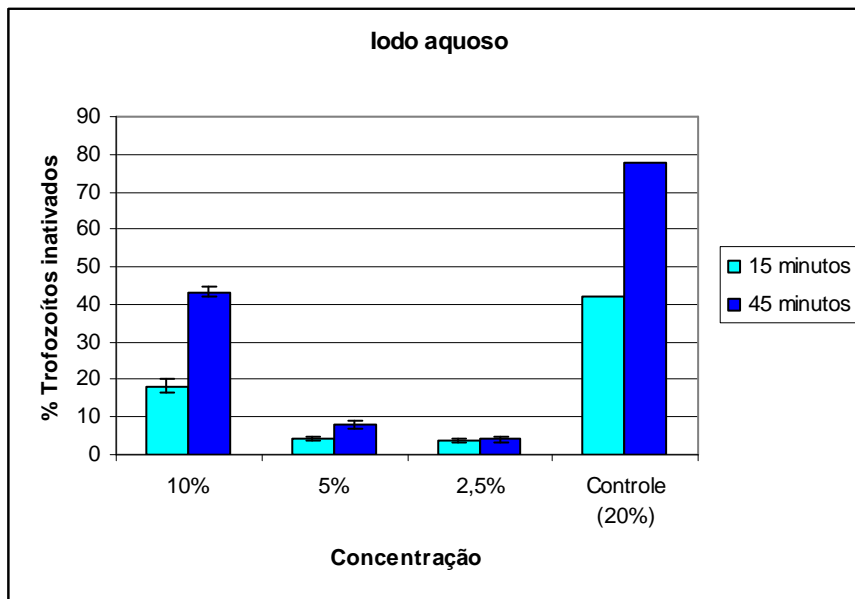


Figura 4: Inativação de trofozoítos após o tratamento com iodo aquoso. Células de *A. Castellanii* foram tratadas durante 15 e 45 minutos e a viabilidade foi avaliada em câmara de contagem de Fuchs–Rosenthal. Barras representam o desvio padrão da triplicata.

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o ácido acético é desinfecioso tanto de cistos como trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* em 15 e 45 minutos de tratamento. As três concentrações usadas (10%, 5% e 2,5%) foram proporcionalmente efetivas e pôde-se observar uma dose dependência. Os cistos de *A. castellanii* apresentam uma maior resistência ao ácido acético se comparados aos trofozoítos. O tempo de exposição foi relevante: 45 minutos são mais efetivos na desinfecção se comparados aos 15 minutos, em todas as concentrações.

O ácido acético é relativamente não tóxico, barato, de fácil acesso, podendo apresentar um papel importante na desinfecção de superfícies, particularmente em locais com poucos recursos financeiros (Cortesia, Claudia, et al. 2014).

Em *Salmonella*, efeitos letais e subletais de ácido acético foram observados, usando-se diferentes concentrações (0.06% to 3.0%), tempos (0 to 7 min), estágios fisiológicos e cepas. Exposições a relativamente baixas concentrações de ácido acético, uma grande porcentagem de células de *Salmonella* foram inviabilizadas (LIAO, SHOLLENBERGER, PHILLIPS, 2003).

Viu-se que ácido acético a uma concentração de 6% *M. tuberculosis* após 30 min de exposição. Esta atividade não se dá apenas pela ação do baixo pH. o ácido acético é um eficiente micobactericida que deve ser também eficiente contra a maioria de outras bactérias (Cortesia, Claudia, et al. 2014).

Portanto, conclui-se que o ácido acético é um bom desinfetante para inativação de *A. castellanii*, especialmente para a forma trofozoítica.

O iodo aquoso foi menos eficaz na inativação de cistos e trofozoítos quando comparado ao ácido acético.. Ainda não se conhece a exata composição das camadas da parede celular do cisto (Fouque, Emilie, et al 2012); além disso, o iodo aquoso também não tem sua ação bem definida. No iodo aquoso encontra-se várias formas ativas do elemento, como iodo elementar (I₂) e ácido iódico (HIO). Ambos são considerados excelentes germicidas, porém com efeitos bastante distintos: I₂ é mais efetivo contra esporos e cistos, enquanto HIO é mais efetivo contra bactérias e vírus (Ellis, Cotton & Khowaja, 1993). Uma forma de se obter melhores resultados é ter uma liberação

controlada de iodo e seus compostos, ao invés de usar diretamente o iodo ou seus compostos dissolvidos (Punyani, 2006).

A ação desinfetante de iodo sobre *E. coli*, decai com o aumento do pH, temperatura e turbidez da água a ser testada (Ellis, Cotton, and Khowaja, 1993). Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram tratados com iodo, de acordo com as instruções do fabricante dos tabletes usados na purificação de água nos EUA (dois tabletes/L = 13-18 mg/L por 20 minutos). Os resultados apontaram que a desinfecção com iodo não é eficiente na inativação de Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em água (GERBA, JOHNSON, HASAN, 1997).

Os testes do presente estudo foram realizados em laboratório, em condições controladas, sem considerar os aspectos químicos e biológicos no ambiente de superfícies hospitalares. Portanto, os resultados parciais sobre o iodo neste contexto devem ser objeto de estudos futuros.

Como citado anteriormente, *Acanthamoeba* são abundantes na natureza e em diversos ambientes, superfícies, ar e água. O seu papel como veículo para vários microorganismos patogênicos destaca a necessidade de novos estudos e entendimentos desses conhecidos "Cavalos de Tróia" do mundo microbiano.

Referências

COULON, Céline et al. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2689-2697, 2010.

MOGOIA, Emerancienne et al. *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 1, p. 97-102, 2010.

FOUQUE, Emilie et al. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 4, p. 382-387, 2012.

DUPUY, Mathieu et al. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 217, n. 2, p. 335-339, 2014.

SAUTER, Ismael Pretto et al. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1367-1371, 2011.

ELLIS, K. V.; COTTON, A. P.; KHOWAJA, M. A. Iodine disinfection of poor quality waters. **Water Research**, v. 27, n. 3, p. 369-375, 1993.

CORTESIA, Claudia et al. Acetic Acid, the Active Component of Vinegar, Is an Effective Tuberculocidal Disinfectant. **mBio**, v. 5, n. 2, p. e00013-14, 2014.

LIAO, C. H.; SHOLLENBERGER, L. M.; PHILLIPS, J. G. Lethal and sublethal action of acetic acid on *Salmonella* in vitro and on cut surfaces of apple slices. **Journal of food science**, v. 68, n. 9, p. 2793-2798, 2003.

GERBA, Charles P.; JOHNSON, Dana C.; HASAN, Michaela N. Efficacy of iodine water purification tablets against *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. **Wilderness & environmental medicine**, v. 8, n. 2, p. 96-100, 1997.

Laboratory Solution Preparation - 2008 Flinn Scientific, Inc.

William A. Rutala, Ph.D., M.P.H., David J. Weber, M.D., M.P.H., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) - **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008**