

Efeitos tóxicos atribuídos ao cloreto de benzalcônio sobre a mucosa nasal e atividade mucociliar

Toxic effects attributed to benzalkonium chloride on nasal mucosa and mucociliar activity

Adelmir Souza-Machado¹, Joana G. Valverde²,
José S. Santana-Junior², Lara G. Barreto², Gabriela S. Nonato²,
Karinn F. Hagenbeck², Denise V. Xavier², Jamile M. Brasil²

Resumo

Objetivo: Identificar e caracterizar os efeitos tóxicos do uso do cloreto de benzalcônio sobre a mucosa respiratória nasal, células do sistema imunológico e função mucociliar *in vivo* e *in vitro*.

Métodos: O presente estudo foi realizado pela pesquisa de artigos disponíveis no banco de dados PUBMED, MEDLINE, SCIELO e LILACS nos últimos 20 anos. Foram selecionados artigos publicados nas línguas inglesa e portuguesa.

Resultados: O cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações concorreu para alteração tóxica em células da mucosa nasal e aparelho ciliar. Adicionalmente, foram identificadas reduções da função mucociliar em modelos murinos e humanos. As alterações mucociliares identificadas a partir dos estudos analisados sugerem claramente a inibição dose e tempo dependentes do mecanismo de clareamento mucociliar. Em alguns estudos, observaram-se sintomas clínicos relevantes relacionados ao uso deste agente.

Conclusões: O uso de CBZ associou-se a alterações histomorfológicas, distúrbios do transporte mucociliar e disfunção de granulócitos, *in vitro* e *in vivo*.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2008; 31(1):2-9 rinite, cloreto de benzalcônio, tratamento, lesão tecidual

Abstract

Objective: To identify and to characterize the toxic effect of benzalkonium chloride on nasal respiratory mucosa, cells of the immune system and cilia function, *in vitro* and *in vivo*.

Methods: The present study was carried by searching available articles from PUBMED, MEDLINE, SCIELO and LILACS database in the last 20 years. We selected published articles in Portuguese and English language.

Results: Different concentrations of benzalkonium chloride concurred for toxic alteration in cells of the nasal mucosa and cilia device. Additionally, reduction of the cilia function in murines and human models had been identified. The cilia alterations from the analyzed studies suggest clearly the inhibition dose-dependant and time-dependant of the mechanism of mucus clearance. In some studies, clinical symptoms associated to the use this pharmacologic agent was shown

Conclusion: The CBZ was associated to hystomorphologic alterations; cilia transport disturbances and granulocyte dysfunction, *in vitro* and *in vivo*.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2008; 31(1):2-9 rhinitis, benzalkonium chloride, treatment, mucosal injury

1. Professor Adjunto Doutor da disciplina de Farmacologia, Coordenador de ensino e capacitação
2. Acadêmico(a) de medicina

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Departamento de Farmacologia. Programa de controle de asma brônquica e rinite alérgica na Bahia (ProAR)².

Artigo submetido em 26.07.2007, aceito em 10.12.2007.

Introdução

Medicações tópicas nasais têm sido utilizadas com muita frequência para o tratamento de doenças das vias aéreas superiores por apresentarem vantagens tais como ação local, reduzida disponibilidade sistêmica e efeitos adversos irrelevantes. Nas rinites, ressalta-se o uso dos corticosteróides, anti-histamínicos e descongestionantes tópicos nasais, os quais constituem as três classes de medicações mais usadas para o manejo desta doença^{1,2}. A maioria destas apresentações farmacológicas tópicas nasais contém substâncias conservantes e bactericidas, entre eles o cloreto de benzalcônio (CBZ), cujos efeitos adversos sobre o organismo têm sido estudados há mais de duas décadas.

O CBZ é um composto amônico quaternário catiônico que possui ação umectante e detergente, com propriedades emulsificadora e germicida. Suas atividades bactericidas propiciaram o uso comercial deste agente, datado de 1935.

Estudos têm referido reações adversas locais e sistêmicas do CBZ, envolvendo olhos, ouvidos e pulmões³⁻⁵. O CBZ tem sido referido como um dos agentes etiológicos mais frequentes da dermatite palpebral alérgica³ e também como agente ototóxico⁴. Adicionalmente, elevadas concentrações de CBZ no tecido pulmonar e renal de camundongos, pode causar efeitos tóxicos, após administração venosa⁵.

Há relatos na literatura de estudos anteriores conflitantes em relação à ação do CBZ sobre o epitélio nasal e sua repercussão clínica. Em uma revisão prévia, apesar do CBZ ter apresentado efeitos deletérios sobre a mucosa nasal ele foi considerado seguro e tolerável⁶, contudo, em outra revisão relata que apesar de existirem dados que mostram os benefícios do CBZ, os efeitos deletérios do conservante sobre a mucosa nasal têm sido relevantes sugerindo precaução ao se usar medicações intranasais contendo CBZ e necessidade de maior aprofundamento nos estudos relacionados ao tema⁷.

Neste contexto, é necessário avaliar as formas mais utilizadas de medicações tópicas nasais contendo este conservante e, possíveis danos sobre a mucosa e cílios do trato respiratório e as estruturas de defesa das vias aéreas. Este estudo tem o objetivo de revisar o efeito tóxico do CBZ sobre a mucosa nasal analisando a histomorfologia, atividade mucociliar, função imunológica e manifestações clínicas em animais e humanos.

Métodos

Foram pesquisados artigos de língua inglesa e portuguesa, publicados entre 1986 e 2006 a partir dos bancos de dados eletrônicos Pubmed, Medline, Lilacs e Scielo. Foram selecionados artigos originais a partir de busca estratégica utilizando as palavras-chave: "cloreto de benzalcônio", "corticosteróides inalatórios", "descongestionantes tópicos nasais", "movimento ciliar", "mucosa nasal", "rinite alérgica", bem como suas sinônimas em inglês.

Inicialmente, foram obtidos artigos que discorriam sobre medicamentos de uso tópico nasal e a partir destes foram selecionados apenas aqueles que continham o CBZ como conservante. Os artigos foram classificados em estudos experimentais e clínicos, *in vitro* e *in vivo*. Foram ainda subdivididos de acordo com as seguintes áreas de interesse para estudo: histomorfologia, função mucociliar, função imune e repercussões com relevância clínica.

Relevância, descrição e detalhamento metodológico do estudo foram algumas características adotadas para a es-

colha dos artigos: a) a droga deveria ser utilizada para uso tópico nasal; b) tamanho da amostra; c) duração do tratamento/exposição ao agente; d) método de avaliação dos desfechos; e) mensuração confiável da concentração e diluição dos medicamentos. Os artigos que não contemplaram os critérios de qualidade metodológica (critérios "a"- "e") foram incluídos apenas quando considerados relevantes por unanimidade pelo grupo e por dois outros pesquisadores independentes.

Resultados

Histomorfologia

Lebe *et al*⁸ estudaram 56 ratos Wistar albinos e observaram alterações histológicas na mucosa nasal induzidas pelo uso de conservantes em medicações tópicas. Os fragmentos extraídos de mucosa nasal foram expostos a diferentes soluções: NaCl 0,9% por quatro semanas, CBZ 0,01% por uma ou quatro semanas e sorbato de potássio também durante uma ou quatro semanas, e posteriormente foram avaliados por intermédio de microscopia eletrônica. Os resultados da tabela 1 mostram as alterações histomorfológicas identificadas nas amostras expostas ao CBZ. Entre estas, a microscopia revelou prejuízo ciliar, infiltrado de células inflamatórias, metaplasia celular escamosa, desenvolvimento de glândulas intra-epidermais e aumento das estruturas vasculares. A intensidade dos danos teciduais foi diretamente proporcional ao tempo de exposição⁸.

Tabela 1 - Sumário dos estudos histomorfológicos em tecido respiratório com cloreto de benzalcônio (CBZ).

Artigos	Variáveis analisadas			
	Tipo de estudo	Amostra	Drogas utilizadas	Presença de lesão histomorfológica
Lebe <i>et al</i> , 2004. ⁸	" <i>in vitro</i> ", animais	Fragmentos de mucosa nasal de 56 ratos	NaCl 0,9% CBZ 0,01% Sorbato de potássio	Não Sim Não
Riechelmann <i>et al</i> , 2004. ¹²	" <i>in vitro</i> ", humanos	Células do epitélio brônquico humano	CBZ Sorbato de potássio Metil metassulfonato	Sim Não Não
Cüreo <i>et al</i> , 2002. ⁹	" <i>in vitro</i> ", animais	Fragmentos de mucosa nasal de 28 coelhos	NaCl 0,9% CBZ 0,001%	Não Sim
Berg <i>et al</i> , 1995. ¹¹	" <i>in vitro</i> ", humanos	Fragmentos de adenóide humana	NaCl 0,9% Oximetazolina + CBZ	Não Sim
Berg <i>et al</i> , 1994. ¹⁰	" <i>in vitro</i> ", humanos	Fragmentos de adenóide humana	Oximetazolina + CBZ (spray) Oximetazolina sem CBZ (gotas) Xilometazolina + CBZ CBZ 0,1%	Sim Não Sim Sim

NaCl = cloreto de sódio.

Cüreo *et al*⁹ analisaram por meio de microscopia eletrônica, fragmentos de biópsias da cavidade nasal de 28 coelhos New Zealand, tratados com 0,001% de solução de CBZ ou solução salina 0,9%, durante 14 e 28 dias. Em todas as amostras tratadas com o CBZ foram encontrados danos celulares, com alterações mitocondriais e deformações nucleares, indicadores de lesão celular irreversível e alterações histopatológicas sugestivas de metaplasia celular escamosa do epitélio mucociliar. Em contrapartida, as amostras tratadas com solução salina mantiveram seu epitélio colunar ciliar preservado.

Berg *et al*¹⁰⁻¹¹, em dois diferentes estudos, investigaram os efeitos do CBZ *in vitro*. No primeiro estudo¹⁰, publicado em 1994, foi avaliado o uso de *spray* nasal de oximetazolina com CBZ 0,15mg/ml em sua composição, durante 14 dias, utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição. Os resultados foram também avaliados. Foram analisadas 48 amostras de tecido adenoidiano, tratadas com quatro

posições, em 96 fragmentos de adenóides humanas, que foram divididos em oito grupos distintos. Alterações histomorfológicas das amostras analisadas tais como perda da continuidade celular nas amostras de epitélio nasal, defeitos na membrana nuclear, acúmulo de grânulos e perda de organelas em seis dos oito grupos foram identificadas pelos métodos de microscopia ótica e eletrônica. O grupo tratado com oximetazolina 0,3% durante dez minutos, e o grupo controle não apresentaram alterações. Nos seis grupos em que houve dano celular, à medida que a concentração da solução testada era reduzida, maior número de fragmentos de tecido mantinha suas características normais por um período mais longo de tempo. Em um segundo estudo, Berg *et al*¹¹, avaliaram os efeitos do CBZ e de descongestionantes sobre a mucosa nasal respiratória. Neste estudo, duas formas de liberação de drogas, *spray* nasal e gotas, diferentes tipos de fármacos: a) *spray* de oximetazolina com CBZ como conservante; b) oximetazolina em gotas; c)

xilometazolina contendo CBZ como conservante; e d) CBZ 0,1% em NaCl. Em três grupos que utilizaram o CBZ foram identificadas diferentes alterações morfológicas – tempo- e dose-dependentes tais como perda da aparência translúcida do citoplasma, enegrecimento tecidual e irregularidade das bordas das células epiteliais, perda dos cílios ao longo do tempo, diminuição das células viáveis, perda da continuidade celular e da atividade microcililar com perda de organelas.

Em um outro estudo¹², os autores estudaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pela exposição de células do epitélio brônquico humano ao CBZ, por duas horas, em concentrações de 0,002% a 0,05%. As amostras tratadas com CBZ mostraram rápida redução, dose-dependente, da viabilidade celular até a concentração de 0,01%. Os efeitos citotóxicos decresceram abruptamente quando as amostras foram expostas a concentrações reduzidas. As alterações deletérias do DNA acentuaram-se de forma dose-dependente até o valor máximo de 0,02%, declinando em concentrações menores. As amostras expostas ao sorbato de potássio como controle negativo e metil metassul-

fonato como controle positivo não apresentaram alterações celulares significativas.

Função mucociliar

Na tabela 2 estão resumidos os estudos que avaliaram a interferência do CBZ sobre o transporte mucociliar

Berg *et al*¹³ avaliaram por meio de microscopia óptica, cortes histológicos da mucosa nasal de 50 ratos expostos a corticóide tópico nasal (CCS) isolado ou combinado ao CBZ (CCS + CBZ) em uma das narinas, e solução salina na narina contralateral como controle. Não foram observadas modificações histológicas entre a mucosa exposta ao corticóide isolado e a substância controle. Diferenças entre as duas cavidades nasais foram observadas em todos os animais que foram tratados com CCS + CBZ. Nas mucosas expostas ao CBZ foram observadas metaplasia escamosa, redução da espessura do epitélio e escassez ou ausência de cílios na superfície da mucosa nasal. O estudo demonstrou que o tratamento com corticóide tópico combinado ao CBZ pode induzir a alterações degenerativas na mucosa nasal de ratos, *in vivo*.

Tabela 2 - Atividade mucociliar e diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio.

Autores	Variáveis analisadas			
	Tipo de estudo	Drogas utilizadas	Método de análise	Alteração mucociliar
Rizzo <i>et al</i> , 2006. ¹⁶	" <i>in vivo</i> ", humanos	Solução salina + CBZ	Cintilografia	Sim
Riechelmann <i>et al</i> , 2004. ¹²	" <i>in vitro</i> ", humanos	Diferentes concentrações de CBZ	Microfotoscilômetro	Sim
Hofmann <i>et al</i> , 2004. ¹⁷	" <i>in vivo</i> ", humanos	CBZ Budesonida sem CBZ Mometasona + CBZ Fluticazona + CBZ	Microscopia óptica	Sim, a partir da 2ª dose Sim, a partir da 2ª dose Sim, desde a 1ª dose Sim, desde a 1ª dose
Berg <i>et al</i> , 1997. ¹³	" <i>in vitro</i> ", animais	Beclometasona + CBZ Flunesolida + CBZ Budesonida sem CBZ	Microscopia óptica	Sim Sim Não
Berg <i>et al</i> , 1995. ¹¹	" <i>in vitro</i> ", humanos	Diferentes concentrações de Oximetazolina + CBZ	Microscopia	Sim, em concentrações acima de 3%
Berg <i>et al</i> , 1994. ¹⁰	" <i>in vitro</i> ", humanos	Oximetazolina + CBZ Oximetasona sem CBZ Xilometasolina + CBZ Xilometasolina sem CBZ	Microscopia	Sim Não Não Não
Deitmer & Scheffler, 1993. ¹⁸	" <i>in vitro</i> ", humanos	Oximetazolina + CBZ Oximetasona sem CBZ Xilometasolina + CBZ Xilometasolina sem CBZ	Microfotoscilômetro	Sim Não Sim Não
Batts <i>et al</i> , 1990. ¹⁴	" <i>in vitro</i> ", animais	CBZ (0,01%) CBZ (0,01%)	Micro-reometro (velocidade do fluxo) Microscopia (batimentos ciliares)	Não Sim
Batts <i>et al</i> , 1989. ¹⁵	" <i>in vitro</i> ", animais	CBZ	Microscopia	Sim

† CBZ = cloreto de benzalcônio.

Em outro estudo, Batts *et al*¹⁴ utilizaram tecido embrionário de traquéia de cinco frangos. Cada fragmento de tecido foi dividido em quatro partes para avaliação da frequência dos batimentos ciliares e seis porções de muco glicoprotéico para mensuração da velocidade do fluxo mucociliar por meio de micro-reômetro magnético. Os fragmentos de tecido e o muco glicoprotéico foram tratados com soluções de metil-p-hidroxibenzoato 0,15%, propil-p-hidroxibenzoato 0,02%, CBZ 0,01%, 4-cloro-m-cresol 0,1%, clorbutol 0,5%, thiomersal 0,01%, EDTA 0,1%, borato fenilmercúrico 0,002% e gluconato de clorexidina 0,01%. Foi utilizado nitrato fenilmercúrico 0,002% apenas no estudo que analisou a velocidade do fluxo mucociliar. O CBZ na concentração de 0,01% promoveu efeitos tóxicos tais como redução do número ou ausência de cílios, em

três dos cinco fragmentos traqueais, entretanto, não foram observadas diferenças na velocidade do fluxo mucociliar entre os grupos tratados e não-tratados com CBZ.

De forma semelhante, Batts *et al*¹⁵ analisaram o efeito de conservantes no transporte mucociliar em palato de sapos por meio de técnicas de microscopia. Metil-p-hidroxibenzoato 0,02% e 0,15%, propil-p-hidroxibenzoato 0,02%, CBZ 0,01%, clorbutol 0,5%, 4 cloro-m-cresol 0,05% e 0,10%, thiomersal 0,01%, nitrato fenilmercúrico 0,002%, EDTA 0,1%, borato fenilmercúrico 0,002% e gluconato de clorexidina 0,01% foram os agentes aplicados em pelo menos seis diferentes palatos. Apenas as aplicações de thimerosal 0,01% foram bem toleradas e não causaram alterações funcionais significativas. O CBZ, clorocresol, EDTA e nitrato fenilmercúrico reduziram ou sustaram o

transporte irreversivelmente após uma ou duas aplicações, ao passo que os demais apenas causaram paralisia reversível na função mucociliar.

Em um recente estudo duplo-cego controlado cruzado, Rizzo *et al*⁶ investigaram os efeitos do CBZ a 0,01% em solução salina sobre o *clearance* mucociliar nasal (CMN) de indivíduos saudáveis. Quarenta e três voluntários foram submetidos ao uso de solução salina a 0,9%, isolada ou associada ao CBZ a 0,01%, três vezes ao dia, durante dois períodos de três semanas. Um intervalo de três semanas entre os períodos de tratamento foi adotado (*washout*) e em seguida, a determinação do CMN foi repetida ao final de cada um dos três períodos através de γ -cintilografia com estrôncio marcado com tecnécio^{99m}. O método radioisótopo foi escolhido por ser considerado, pelos autores, o mais fisiológico e confiável para medida do CMN em humanos. Não foram observadas diferenças entre os valores basais do *clearance* quando comparados àqueles obtidos após o uso da solução salina sem conservantes. Entretanto, após o uso da solução salina associada ao CBZ, a velocidade do CMN foi significativamente prejudicada, com uma diferença de 1,23 mm.min⁻¹ entre os períodos de tratamento, em relação ao período basal e de utilização da solução salina isolada.

Riechelmann *et al*² analisaram a frequência dos batimentos ciliares através de um microfotoscilômetro, utilizando o epitélio da mucosa respiratória de 15 pessoas saudáveis. As amostras de epitélios foram divididas em três grupos submetidas a solução controle ou a soluções de concentrações de CBZ a 0,01% e 0,025%, respectivamente. Foi observado um pronunciado efeito cílio tóxica dose dependente com o CBZ; os fragmentos epiteliais expostos às concentrações mais elevadas do conservante apresentaram redução mais pronunciada dos batimentos ciliares.

A função mucociliar nasal foi avaliada em humanos tratados com budesonida (1,26mg/ml), mometasona (0,5mg/ml) e fluticasona (0,5mg/ml) tópicos nasais¹⁷ combinadas a um dos conservantes farmacológicos, sorbato de potássio (1,2mg/ml) ou CBZ (0,2mg/ml) diluídos a 10 ou 50%. A budesonida associada ao sorbato de potássio na concentração de 10% não alterou a frequência padrão dos movimentos ciliares nasais; decréscimo moderado e reversível do batimento ciliar foi observado com o uso da concentração de 50%. De modo similar, a mometasona e a fluticasona, ambas contendo CBZ como conservante, causaram diminuição reversível dos movimentos ciliares quando diluídos a 10%. Em concentrações mais elevadas de CBZ 50%, observaram completa e irreversível paralisia ciliar.

Berg *et al*¹⁰ utilizaram tecido adenóide para avaliar os efeitos morfológicos da exposição da mucosa respiratória ao CBZ. O tecido adenóide obtido foi dividido em 48 fragmentos, os quais foram subdivididos em quatro grupos para serem tratados por quatro soluções diferentes: oximetazolina (OXI) + CBZ; oximetazolina isolada; xilometazolina (XIL) + CBZ e CBZ 0,1% em cloreto de sódio. Os fragmentos foram analisados por diferentes métodos microscópicos. Os autores constataram alterações ciliares em todos os grupos tratados com CBZ. Após cinco dias de tratamento, houve rápido decréscimo na frequência dos batimentos ciliares do grupo exposto ao CBZ; o tecido perdeu sua aparência translúcida e tornou-se enegrecido com uma superfície irregular; cílios e microvilosidades foram raramente observadas e poucas células viáveis identificadas no estroma. Após dez dias de tratamento, houve perda do limite epitelial do tecido e ausência de cílios e microvilosidades.

Fragmentos de tecido da mucosa nasal respiratória humana foram submetidos a oximetazolina tópica 0,5mg/ml combinada a CBZ 0,15mg/ml em diluições variadas por diferentes períodos de tempo durante 14 dias¹¹. A solução de NaCl 0,9% foi utilizada como controle. Todos os fragmentos expostos à oximetazolina com CBZ não diluída,

perderam seus cílios ao final do período de exposição. As alterações foram mais extensas e precoces naquelas amostras de tecidos expostas durante maior período de tempo. Nos experimentos com concentração variada do spray nasal, alguns dos fragmentos retiveram os batimentos ciliares de superfície. Ao longo do experimento, a frequência dos batimentos ciliares aumentou com a diminuição da concentração da substância testada.

Amostras de células ciliadas da mucosa nasal de 15 indivíduos saudáveis foram submetidas a quatro grupos de tratamento: i) oximetazolina; ii) oximetazolina com conservantes (CBZ, edetínacido, hidrogenofosfato sódico e hidróxido de sódio); iii) xilometazolina com conservantes (CBZ, edetínacido, hidrogenofosfato sódico e sorbitol) e iv) uma solução teste¹⁸. A viabilidade celular e a frequência dos batimentos ciliares foram avaliadas por técnicas de microscopia e por meio de microfotoscilômetro, respectivamente. Danos à atividade ciliar foram observados apenas em células tratadas com oximetazolina e xilometazolina na presença de conservantes. A função ciliar manteve-se preservada nos grupos expostos a oximetazolina isolada e à solução teste¹⁸.

Alterações estruturais e funcionais sobre células do sistema imune.

Os efeitos do CBZ sobre a quimiotaxia, fagocitose e estrutura neutrofílica estão resumidos na tabela 3.

Neutrófilos humanos obtidos de amostras de sangue venoso heparinizado de indivíduos adultos saudáveis, foram expostos à solução salina nasal (SSN) contendo CBZ, em concentrações menores que as utilizadas comercialmente. Os principais resultados observados foram que os neutrófilos testados exibiram alterações na membrana celular, nas estruturas intracelulares, além de considerável aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)¹⁹. Neutrófilos tratados apenas com tampão de fosfato salino, após três minutos de exposição, não apresentaram alterações, porém aqueles expostos a SSN e CBZ 15% foram quase totalmente destruídos. Salina e CBZ em concentrações iguais ou superiores a 20% inviabilizaram completamente todos os neutrófilos inclusive com a ruptura de suas membranas. O aumento significativo da atividade da enzima LDH foi diretamente proporcional às concentrações de SSN e CBZ 5%; de modo distinto não foram observadas modificações nos níveis de LDH a partir de neutrófilos expostos às crescentes concentrações de salina isolada¹⁹.

Steinsvag *et al*²⁰ avaliaram a exposição da mucosa respiratória e granulócitos humanos a vários corticosteróides intranasais isolados ou combinados ao CBZ, *in vitro*. Na ausência de CBZ, os glicocorticóides não influenciaram a capacidade funcional dos neutrófilos nem na estrutura da mucosa. De modo oposto, os corticosteróides associados ao CBZ, assim como, o CBZ isoladamente, não apenas destruíram a mucosa no período de dez dias como também inibiram a polimerização actínica, o metabolismo oxidativo e a degranulação neutrofílica em tempo e dose dependentes²⁰. Em concentrações de CBZ superiores a 10 μ g/ml, uma subpopulação de neutrófilos exibiu sinais de desintegração; as concentrações acima de 40 μ g/ml, promoveram a morte de todos os neutrófilos quando incubados por dez minutos²⁰.

O uso de oximetazolina e xilometazolina por via intranasal correlacionou-se com a inibição da polimerização actínica, da fagocitose e do metabolismo oxidativo de neutrófilos²¹. A adição de CBZ, em concentrações que variaram de 0,015 a 0,03mg/l, potencializou significativamente esses danos. A ação deletéria máxima sobre a função neutrofílica foi observada na presença de CBZ isoladamente, e correlacionou-se diretamente as doses crescentes, aumento da concentração e ao tempo de exposição²¹.

Tabela 3 - Efeito do cloreto de benzalcônio sobre a quimiotaxia, fagocitose e estrutura neutrofílica.

Autores	Variáveis analisadas			
	Tipo de estudo	Quimiotaxia	Fagocitose	Estrutura neutrofílica
Boston <i>et al</i> , 2003. ¹⁹	" <i>in vitro</i> ", humanos	-	-	SSN a partir de 20% provocou destruição das membranas neutrofílicas e aumento de LDH.
Steinsvag <i>et al</i> , 1996. ²⁰	" <i>in vitro</i> ", humanos	-	-	Inibição da polimerização actínica, do metabolismo oxidativo e da degranulação tempo e dose dependentes.
Bjerknes & Steinsvag, 1993. ²¹	" <i>in vitro</i> ", humanos	-	OXI/XIL + CBZ reduziram a fagocitose	OXI, XIL + CBZ causaram inibição da polimerização actínica e do metabolismo oxidativo.
Hankasson <i>et al</i> , 1989. ²²	" <i>in vitro</i> ", humanos	-	CBZ 100mg/l reduziu para zero a fagocitose	-
Hankasson <i>et al</i> , 1989. ²³	" <i>in vitro</i> ", humanos	CBZ 0,8 mg/l reduziu para zero a quimiotaxia	-	-

†SSN = solução salina nasal; OXI = oximetazolina; XIL = xilometazolina; CBZ = cloreto de benzalcônio.

Hakansson *et al*²² avaliaram o efeito de dois descongestionantes tópicos nasais oximetazolina (OXI) e xilometazolina (XIL) e CBZ sobre a fagocitose granulocítica, *in vitro*. Entre os descongestionantes, a OXI em concentrações entre 0,05 e 5mg/l e XIL entre 0,1 e 10mg/l não interferiram na função fagocítica. Redução na atividade fagocítica dos granulócitos foi observada com doses de 50mg/l e 100mg/l de OXI e XIL, respectivamente. A inibição completa da atividade fagocítica de granulócitos foi alcançada com OXI 500mg/l e XIL 1000mg/l. O uso do CBZ isoladamente, proporcionou discreta redução na fagocitose em concentrações que variaram de 0,01 a 1mg/l. O CBZ na concentração de 100mg/l, equivalente a 50% da utilizada comercialmente, a atividade fagocítica reduziu-se a zero²². Em outro estudo o CBZ mostrou-se deletério para quimiotaxia neutrofílica em concentração de 0,8mg/l e o thimerosal à 1mg/l, sendo a concentração comercial desse último conservante de 24mg/l²³.

Manifestações clínicas associadas ao uso de cloreto de benzalcônio.

A tabela 4 resume as manifestações clínicas relevantes, relacionadas ao uso do CBZ. Lebe *et al*⁸ avaliaram os sintomas clínicos pós-administração de CBZ, no mesmo trabalho experimental que também estudou alterações histomorfológicas. Cinquenta e seis ratos Wistar foram divididos em cinco grupos, um grupo controle e os demais grupos sob tratamento com CBZ em diferentes concentrações. Foram observados, no segundo dia após a administração da droga, episódios de espirros e gotejamento nasal em todos os grupos, exceto no grupo controle. Todos os animais tratados com CBZ por mais de quatro semanas desenvolveram, a partir do sexto dia, hiperemia da região nasal e tenderam a arranhar o nariz com as patas. Um número menor de ratos ainda desenvolveu uma respiração nasal ruidosa⁸.

Tabela 4 - Manifestações clínicas associadas ao uso de cloreto de benzalcônio.

Autores	Variáveis analisadas			
	Tipo de estudo	Droga utilizada	Alteração clínica	Significância
Lebe <i>et al</i> , 2004. ⁸	" <i>in vivo</i> ", animais	CBZ	Sim. Efeitos imediatos: ataques de espirros e gotejamento nasal. Efeitos crônicos: hiperemia e prurido da região nasal e respiração nasal ruidosa.	p<0,05
Riechelmann <i>et al</i> , 2004. ¹²	" <i>in vivo</i> ", humanos	CBZ 0,05%	Sim. Obstrução e hipersecreção nasal, sensação de queimor e irritação local.	p<0,05
Kim & Ahn, 2004. ²⁹	" <i>in vivo</i> ", humanos	Salbutamol + CBZ	Sim. Anafilaxia pós-nebulização.	NS
Lindemann <i>et al</i> , 2004. ²⁸	" <i>in vivo</i> ", humanos	XIL + CBZ 0,1 mg/ml XIL	Não alterou a temperatura da mucosa nasal. Não alterou a temperatura da mucosa nasal.	NS
Storass <i>et al</i> , 2000. ²⁷	" <i>in vivo</i> ", humanos	CBZ 0,1 mg/ml	Sim. Aumento de secreção glandular e imediata sensação de dor local.	p<0,05
Graf <i>et al</i> , 1999. ²⁶	" <i>in vivo</i> ", humanos	OXI + CBZ 0,1 mg/ml OXI	Sim. Edema e obstrução nasal graves. Sim. Edema e obstrução nasal moderados.	p<0,05
Graf & Hallen, 1996. ²⁵	" <i>in vivo</i> ", humanos	OXI CBZ 0,1 mg/ml	Hiperreatividade nasal à histamina e obstrução nasal moderada. Edema pronunciado da mucosa.	p<0,05
Graf <i>et al</i> , 1995. ²⁴	" <i>in vivo</i> ", humanos	OXI + CBZ 0,1 mg/ml OXI	Sim. Edema e obstrução nasal acentuada. Sim. Edema e obstrução nasal leve.	p<0,05

†OXI = oximetazolina; XIL = xilometazolina; CBZ = cloreto de benzalcônio; NS = não significante

Os estudos desenvolvidos por Graf *et al*²⁴⁻²⁶ foram os primeiros a avaliar o efeito do CBZ no desenvolvimento da rinite medicamentosa em indivíduos saudáveis. As variáveis dos estudos incluíram escores de sintomas nasais, mensuração da intensidade do edema da mucosa por meio de rinoestereometria, e reatividade da mucosa nasal à histamina. Em um dos estudos²⁴ dez pacientes foram tratados com oximetazolina (OXI) 0,5mg/ml e CBZ 0,1mg/ml e dez pacientes usaram OXI sem o conservante, três vezes ao dia. Ao final de 30 dias de tratamento, o edema de rebote e a obstrução nasal ocorreram mais intensamente no grupo tratado com OXI e CBZ. Este resultado sugeriu que o CBZ potencializou os efeitos adversos relacionados ao uso da OXI. No estudo de Graf & Hallen²⁵ três grupos de dez indivíduos saudáveis foram tratados com OXI 0,5mg/ml, CBZ 0,1mg/ml e placebo, respectivamente. Decorridos 30 dias de tratamento apenas o grupo que recebeu OXI apresentou hiperreatividade nasal e aumento significativo da sensação de obstrução nasal. Os indivíduos submetidos à administração de CBZ isoladamente apresentaram edema mais pronunciado da mucosa, porém sem relatos de obstrução nasal intensa. Em outro estudo²⁶, 35 pacientes com rinite vasomotora foram submetidos a tratamento, por dez dias; 18 pacientes fizeram uso de spray nasal com OXI 0,5mg/ml e CBZ 0,1mg/ml duas vezes ao dia, e outros 17 pacientes foram tratados com OXI livre de conservantes, também duas vezes ao dia. Edema e rebote não foram observados em ambos os grupos: tratado e controle, todavia, o grupo exposto a OXI associado ao CBZ apresentou significativa redução no teste nasal de sensibilidade à histamina²⁶.

Storaas *et al*²⁷ estudaram, em 30 voluntários saudáveis, os efeitos do CBZ nas funções endo-orgânicas da mucosa nasal, através da mensuração dos níveis de α 2-macroglobulina e fucose, indicadores de exsudação plasmática e secreção glandular respectivamente. As manifestações nasais foram mensuradas por meio de exame clínico e escores de sintomas. O CBZ foi administrado em doses que variaram de 100 μ l a 0,1 mg/ml em cada cavidade nasal, três vezes ao dia, durante dez dias. Aumento significativo da secreção glandular foi o efeito adverso imediato observado. O uso por período prolongado promoveu aumento do escore de sintomas de congestão nasal, espirros e exacerbação de rinorréia aquosa.

Para analisar um aspecto até então não observado, Lindemann *et al*²⁸ avaliaram a influência do vasoconstrictor xilometazolina, isolado ou combinado ao CBZ, sobre a temperatura da mucosa nasal. Foram estudados 30 indivíduos adultos saudáveis, divididos em dois grupos iguais e aleatórios; o primeiro grupo recebeu a xilometazolina com CBZ e o segundo xilometazolina livre de conservantes. A temperatura da mucosa nasal foi mensurada um minuto antes e 30 minutos depois da aplicação dos fármacos. Os autores observaram que apesar de haver uma diminuição na temperatura da mucosa nasal após o uso do descongestionante, não foi significativa a diferença encontrada entre os diferentes grupos.

Anafilaxia causada por CBZ foi descrita pela primeira vez em uma paciente asmática de 23 anos, após inalar solução de salbutamol contendo CBZ como conservante. Na história da paciente não havia relato prévio de choque anafilático, urticária ou alergia após uso de drogas β -2 agonistas de curta-duração. Posteriormente, a paciente foi submetida a teste cutâneo intradérmico, com diluição seriada da solução inalada, apresentando resposta positiva seguida de sintomas cardio-respiratórios graves. No mesmo estudo os autores também submetem duas voluntárias saudáveis ao mesmo teste intradérmico com respostas negativas²⁹. Todavia, testes de broncoprovocação com CBZ revelaram decréscimo de 23% no VEF₁.

Em um ensaio clínico cruzado controlado com placebo¹², 16 voluntários foram alocados para tratamento com 200 μ g

de solução de CBZ 0,05% em cada narina e solução placebo quatro vezes ao dia por oito dias. O escore de sintomas nasais foi determinado por uma escala análoga visual de sintomas. Ao final do estudo, os pesquisadores observaram que o escore para sintomas persistentes foi mais elevado durante o período de tratamento com o CBZ, principalmente àqueles tais como irritação nasal, hipersecreção e sensação de queimação local.

Discussão

A hipótese de que a presença do CBZ em medicações intranasais causa danos à mucosa respiratória tem sido difundida em diversas publicações por mais de duas décadas^{6,30}. Na presente revisão, foram analisados estudos experimentais e ensaios clínicos que avaliaram as propriedades nocivas atribuídas ao CBZ sobre a mucosa nasal e às suas estruturas de defesa. O uso frequente de medicamentos combinados ao CBZ pode provocar prejuízo da função mucociliar em muitos pacientes portadores de rinossinusite alérgica, além de correlacionar-se com o aumento dos casos de rinite medicamentosa²⁴. Os estudos existentes sobre os efeitos do CBZ sobre a depuração mucociliar, sobre a histologia normal e sobre a cílio-toxicidade da mucosa nasal bem como na função de neutrófilos, têm demonstrado resultados conflitantes, em parte como decorrência de desenhos de pesquisa³¹.

Os vários estudos que avaliaram a histomorfologia demonstraram o aparecimento de alterações significativas na mucosa nasal variando desde a presença de infiltrado inflamatório epitelial ao surgimento de lesões celulares irreversíveis quando o CBZ foi utilizado isoladamente ou adicionado a descongestionantes tópicos nasais. A ação do CBZ foi prejudicial para a membrana plasmática epitelial respiratória levando à sua desestruturação assim como a perda dos cílios^{8,10-11}. Os estudos analisados sugerem claramente a inibição dose e tempo dependente do mecanismo do *clearance* mucociliar, executado pela constante e coordenada ação das células ciliares. Este efeito tóxico cílio-estático é causado pelo uso de medicações tópicas nasais contendo CBZ, sobretudo os glicocorticóides e vasoconstritores, utilizados em larga escala para o tratamento das rinossinusites. Rizzo *et al*³¹ também documentaram em indivíduos saudáveis, através de estudo clínico controlado, diferença significativa na velocidade de depuração mucociliar nasal a favor do grupo em uso de solução salina livre de preservativos, após três semanas de tratamento com solução salina tópica nasal contendo ou não CBZ a 0,01%.

Por meio de técnicas de microscopia, os estudos experimentais demonstraram a indução de lesão direta das células colunares de sustentação da mucosa nasal. O epitélio colunar pseudo-estratificado ciliado, que reveste o trato respiratório desde o terço posterior das fossas nasais até os bronquíolos, quando exposto à ação do CBZ, é lesado e sofre transformação da mucosa, sugestiva de metaplasia escamosa, em resposta a agressão^{8,9}. Modificações nas estruturas das organelas ficaram evidentes chegando a evoluir para a perda das funções celulares^{9,11}. Deformações nucleares e interferências na molécula do DNA foram também encontradas, determinando em alguns casos a inviabilidade celular^{9,12}.

Além das alterações epiteliais, a função imunológica também é afetada pelo uso do conservante. Em dois dos cinco estudos que avaliaram a atividade granulocítica, verificou-se a redução significativa da atividade fagocitária dos neutrófilos quando estes foram expostos a descongestionantes tópicos nasais, efeito potencializado pela adição do CBZ. De modo semelhante, o CBZ isoladamente causou disfunção fagocítica de forma dose dependente²¹⁻²³. A inibição da polimerização actínica e do metabolismo oxidativo foram evidenciados em dois outros estudos, quando neu-

trófilos foram expostos a drogas descongestionantes e a corticosteróides contendo o CBZ^{20,21}. No estudo de Boston¹⁹ após utilização de salina nasal com o cloreto de benzalcônio, foram observadas alterações morfológicas na membrana dos neutrófilos e suas estruturas intracelulares, assim como aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH), relacionada à lise celular. Os diferentes estudos evidenciaram de maneira contundente que o uso desses fármacos associados ao CBZ pode propiciar a perda da barreira do epitélio respiratório e reduzir resposta fagocítica a microorganismos diversos.

A despeito da diversidade de instrumentos para mensuração da intensidade e percepção dos sintomas nasais, em particular na rinite alérgica, a expressão clínica induzida pelo uso do CBZ foi avaliada por alguns autores por escores de sintomas e questionários. Os escores mais elevados foram correlacionados ao uso de descongestionantes nasais contendo CBZ. Os estudos sugerem que o aparecimento dos sintomas relacionou-se com o tempo de exposição da mucosa ao CBZ e a dose empregada. Em 1988, Miszkiel *et al*²² descreveram que o CBZ inalado induziu broncoconstrição em um subgrupo de pacientes asmáticos. Os estudos apontam que a sintomas respiratórios tais como queimação, dor, ressecamento e irritação decorrentes do uso de CBZ não são infreqüentes e podem estar presentes precocemente, logo após as primeiras aplicações. Apesar de não ser uma complicação comum, a anafilaxia foi relatada com o uso de broncodilatadores combinado com CBZ²⁹. As manifestações clínicas sugestivas de rinite medicamentosa, anteriormente atribuídas exclusivamente ao uso de descongestionantes tópicos nasais, parecem sofrer influência dos veículos e conservantes, notadamente o CBZ^{24,26}. Marple *et al*⁷ em sua revisão mostrou que o CBZ contido em soluções intranasais é seguro e tem boa tolerabilidade, todavia dez dos 18 estudos analisados reportaram efeitos deletérios sobre a mucosa nasal ou exacerbação da rinite medicamentosa. O estudo de Graf⁷, que avaliou o CBZ em medicações de uso intranasal questiona a sua segurança já que a maior parte dos dados revelou que este conservante pode produzir efeitos tóxicos e manifestações clínicas adversas em estudos *in vivo*. Na presente revisão, além dos efeitos deletérios do CBZ sobre a função ciliar e a mucosa nasal no que concerne a sua histomorfologia, pôde-se observar também a interferência negativa sobre a sintomatologia dos pacientes nos ensaios clínicos analisados assim como sobre o sistema imune colocando ainda mais a segurança do CBZ em dúvida.

Tais considerações podem levar a questionamentos sobre os verdadeiros benefícios do CBZ como componente das inúmeras preparações de uso intranasal, uma vez que seus efeitos deletérios podem se sobrepor à sua propriedade de conservante farmacológico, todavia, nesta revisão o papel do CBZ como agente bactericida e fungicida não foi comparado à ação irritante sobre a mucosa atribuído a este agente. O uso prolongado, em diferentes concentrações, pode concorrer para dano irreversível tecidual ao afetar a morfologia, a função fisiológica e imunológica celular, *in vitro* e *in vivo*. O uso cauteloso de medicamentos associados ao CBZ, a substituição deste agente por substâncias atóxicas com propriedades semelhantes e o uso de dispositivos valvulados podem ser alternativas razoáveis, mormente para terapias tópicas por tempo prolongado. A despeito das alterações funcionais e histomorfológicas atribuídas ao CBZ, os estudos em humanos não foram conclusivos sobre as possíveis implicações para a prática clínica.

Conclusão

Diferentes efeitos tóxicos do CBZ sobre a mucosa nasal foram demonstrados *in vivo* e *in vitro*. A toxicidade foi observada mesmo em concentrações abaixo das encontradas

em preparados comerciais e em uso por curto período de tempo, segundo alguns estudos. O CBZ pode causar alterações histomorfológicas, no transporte mucociliar e na função imune é possível que haja repercussões clínicas que possam trazer prejuízo para os pacientes.

Referências

1. Portnoy JM, Van Osdol T, Williams PB. Evidence-based strategies for treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4:439-46.
2. Suonpaa J. Treatment of allergic rhinitis. *Ann Med* 1996;28:17-22.
3. Amin KA, Belsito DV. The aetiology of eyelid dermatitis: a 10-year retrospective analysis. *Contact Dermatitis* 2006;55:280-5.
4. Barlow DW, Duckert LG, Kreig CS, Gates GA. Ototoxicity of topical otomicrobial agents. *Acta Otolaryngol* 1995;115:231-5.
5. Xue Y, Hieda Y, Kimura K, Takayama K, Fujihara J, Tsujino Y. Kinetic characteristics and toxic effects of benzalkonium chloride following intravascular and oral administration in rats. *Journal Chromatogr* 2004;811:53-8.
6. Marple B, Roland P, Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:131-41.
7. Graf P. Benzalkonium chloride as a preservative in nasal solutions: re-examining the data. *Respir Med* 2001;95(9):728-33.
8. Lebe E, Baka M, Yavasoglu A, Aktug H, Ates U, Uyanikgil Y. Effects of preservatives in nasal formulations on the mucosal integrity: an electron microscopic study. *Pharmacology* 2004;72:113-20.
9. Cureoglu S, Akkus M, Osma U, *et al* The effect of benzalkonium chloride on rabbit nasal mucosa in vivo: an electron microscopy study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:362-4.
10. Berg OH, Lie K, Steinsvag SK. The effect of decongestive nose drops on human respiratory mucosa in vitro. *Laryngoscope* 1994;104:1153-8.
11. Berg OH, Henriksen RN, Steinsvag SK. The effect of a benzalkonium chloride-containing nasal spray on human respiratory mucosa in vitro as a function of concentration and time of action. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:245-9.
12. Riechelmann H, Deutschle T, Stuhlmiller A, Gronau S, Burner H. Nasal toxicity of benzalkonium chloride. *Am J Rhinol* 2004;18:291-9.
13. Berg OH, Lie K, Steinsvag SK. The effects of topical nasal steroids on rat respiratory mucosa in vivo, with special reference to benzalkonium chloride. *Allergy* 1997;52:627-32.
14. Batts AH, Marriott C, Martin GP, Wood CF, Bond SW. The effect of some preservatives used in nasal preparations on the mucus and ciliary components of mucociliary clearance. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:145-51.
15. Batts AH, Marriott C, Martin GP, Bond SW. The effect of some preservatives used in nasal preparations on mucociliary clearance. *J Pharm Pharmacol* 1989;41(3):156-9.
16. Rizzo JA, Medeiros D, Silva AR, Sarinho E. Benzalkonium chloride and nasal mucociliary clearance: a randomized, placebo-controlled, crossover, double-blind trial. *Am J Rhinol* 2006;20:243-7.
17. Hofmann T, Gugatschga M, Koidl B, Wolf G. Influence of preservatives and topical steroids on ciliary beat frequency in vitro. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:440-5.
18. Deitmer T, Scheffler R. The effect of different preparations of nasal decongestants on ciliary beat frequency in vitro. *Rhinology* 1993;31:151-3.
19. Boston M, Dobratz EJ, Buescher ES, Darrow DH. Effects of nasal saline spray on human neutrophils. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:660-4.
20. Steinsvag SK, Bjerknes R, Berg OH. Effects of topical nasal steroids on human respiratory mucosa and human granulocytes in vitro. *Acta Otolaryngol* 1996;116:868-75.
21. Bjerknes R, Steinsvag SK. Inhibition of human neutrophil actin polymerization, phagocytosis and oxidative burst by components of decongestive nose drops. *Pharmacology & toxicology* 1993;73:41-5.
22. Hakansson B, Linder C, Ohlsson K, Tegner H, Toremalm NG. The inhibition of granulocyte phagocytosis by various components of nasal drops. *Pharmacol Toxicol* 1989;65:89-91.

23. Hakansson B, Forsgren A, Tegner H, Toremalm NG. Inhibitory effects of nasal drops components on granulocyte chemotaxis. *Pharmacol Toxicol* 1989;64:321-3.
24. Graf P, Hallen H, Juto JE. Benzalkonium chloride in a decongestant nasal spray aggravates rhinitis medicamentosa in healthy volunteers. *Clin Exp Allergy* 1995;25:395-400.
25. Graf P, Hallen H. Effect on the nasal mucosa of long-term treatment with oxymetazoline, benzalkonium chloride, and placebo nasal sprays. *Laryngoscope* 1996;106:605-9.
26. Graf P, Enerdal J, Hallen H. Ten days' use of oxymetazoline nasal spray with or without benzalkonium chloride in patients with vasomotor rhinitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1128-32.
27. Storaas T, Andersson M, Persson CG, Steinsvag SK, Marko-Varga G, Greiff L. Effects of benzalkonium chloride on innate immunity physiology of the human nasal mucosa in vivo. *Laryngoscope* 2000;110:1543-7.
28. Lindemann J, Leiacker R, Wiesmiller K, Rettinger G, Keck T. Immediate effect of benzalkonium chloride in decongestant nasal spray on the human nasal mucosal temperature. *Clin Otolaryngol* 2004;29:357-61.
29. Kim SH, Ahn Y. Anaphylaxis caused by benzalkonium in a nebulizer solution. *J Korean Med Sci* 2004;19(2):289-90.
30. Verret DJ, Marple BF. Effect of topical nasal steroid sprays on nasal mucosa and ciliary function. *Cur Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:14-8.
31. Rizzo JA, Medeiros D, Silva AR, Sarinho ECS. Nasal symptoms, nasal mucociliar clearance, and benzalkonium chloride. *Rev. bras. alerg. Imunopatol.* 2005;28:240-244.
32. Miszkial KA, Beasley R, Rafferty P, Holgate ST. The contribution of histamine release to bronchoconstriction provoked by inhaled benzalkonium chloride in asthma. *British J Clin Pharmacol* 1988;25:157-63.

Agradecimentos

Aos professores do departamento de Farmacologia da EBMSP - Dr. Túlio César Alves, Dr. Emerentino Elton Araújo, Prof. Sérgio Cruz, Dra. Rita Benigno e Dra. Milena Pondé pelas sugestões e correções durante a elaboração deste trabalho.

Correspondência:

Adelmir Souza-Machado
ProAR. Edif. Centro de Saúde Carlos Gomes
Rua Carlos Gomes 270. - 7º andar - Centro
40060-330 - Salvador - Bahia.
E-mail: adelmirm@terra.com.br