



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Official Publication of the Brazilian Society of Anesthesiology
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação *in vitro* das propriedades antimicrobianas de vasopressores

Habib Bostan^a, Yakup Tomak^b, Sengul Alpay Karaoglu^c, Basar Erdivanli^d e Volkan Hanci^{e,*}

^a The Council of Forensic Medicine, Ministry of Justice, Istanbul, Turkey

^b Departamento de Anestesiologia e Reanimação, Medical Faculty of Sakarya University, Sakarya, Turkey

^c Department de Biologia, Faculty of Arts and Sciences of Rize University, Rize, Turkey

^d Departamento de Anestesiologia e Reanimação, Medical Faculty of Rize University, Rize, Turkey

^e Departamento de Anestesiologia e Reanimação, Medical Faculty, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

Recebido em 5 de abril de 2012; aceito em 28 de fevereiro de 2013

Disponível na Internet em 15 de março de 2014

PALAVRAS-CHAVE

Atividade antimicrobiana;
Vasopressores;
Contaminação de medicamentos

Resumo

Justificativa e objetivo: os medicamentos administrados como perfusão intravenosa podem ser contaminados durante as várias etapas de produção ou preparação. No entanto, estudos sobre os efeitos antibacterianos de vasopressores são muito raros. Este estudo investiga a atividade antimicrobiana *in vitro* das formas de vasopressores usados clinicamente.

Materiais e métodos: atividades antimicrobianas *in vitro* de substâncias vasopressoras de diferentes concentrações foram investigadas com o uso da técnica de microdiluição. Os microrganismos empregados no teste foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, *Candida albicans* ATCC 60193 e *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251. Os ensaios antibacterianos foram feitos em caldo de cultura Mueller-Hinton (pH 7,3) e os ensaios antifúngicos em solução tampão de base nitrogenada para levedura (pH 7,0).

Resultados: duas preparações diferentes de dopamina mostraram atividade antimicrobiana. Nenhuma outra substância do estudo mostrou qualquer atividade antimicrobiana.

Conclusões: em nossa opinião, os efeitos antibacterianos da dopamina podem ser vantajosos para inibir a propagação de contaminação bacteriana durante a preparação das soluções para perfusão. Contudo, salientamos a importância do seguimento rigoroso das diretrizes de esterilização dos equipamentos e de assepsia durante todos os procedimentos feitos em unidades de terapia intensiva.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: vhanci@gmail.com (V. Hanci).

Introdução

O choque séptico é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva. Os estados de choque são caracterizados principalmente por insuficiência circulatória aguda que leva à hipoperfusão, com potencial para resultar em insuficiência de múltiplos órgãos. A hipotensão pode ser a consequência de três importantes distúrbios hemodinâmicos: hipovolemia, insuficiência vascular e insuficiência cardíaca.¹ Quando a administração adequada de líquidos não consegue restaurar a perfusão tecidual e a pressão arterial, os vasopressores são geralmente necessários para aumentar a pressão sistêmica, o débito cardíaco e o suplemento de oxigênio.²

Estudos *in vitro* de moléculas de catecolaminas demonstraram proliferação de bactérias.³⁻⁵ Uma parte das catecolaminas, que são usadas como vasopressores, é produzida de forma endógena no corpo. No entanto, as catecolaminas usadas como vasopressores são produzidas sinteticamente e perfundidas para tratamento da insuficiência cardiovascular decorrente de choque séptico. Dopamina, dobutamina, adrenalina e noradrenalina são as substâncias vasopressoras mais comumente usadas, preparadas sinteticamente com produtos químicos complementares com atividade antioxidante e antimicrobiana. Metabissulfito de sódio, N-acetilcisteína e edetato dissódico são os antioxidantes e antimicrobianos usados com mais frequência para esse propósito em medicamentos comumente encontrados em mercados farmacológicos (tabela 1).

Considerando vários estudos que relatam os efeitos das moléculas de catecolaminas sobre a proliferação de bactérias, investigamos o efeito *in vitro* de produtos comercialmente preparados com catecolaminas sobre a proliferação de vários fungos e cepas de bactérias comumente encontrados em choque séptico.

Materiais e métodos

Os microrganismos usados nos testes foram obtidos do Instituto Refik Saydam Hifzissihha (Ankara, Turquia) e foram os seguintes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 709 ROMA, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, *Candida albicans* ATCC 60193 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 60193.

Os efeitos antimicrobianos dos fármacos foram testados quantitativamente em meios de ágar apropriados com o uso do método de diluição dupla e os valores em µg/mL da concentração inibitória mínima (CIM) foram determinados.^{6,7} Os ensaios antibacterianos foram feitos em caldo de cultura Mueller-Hinton (MH) (Difco, Detroit, MI) a um pH de 7,3 e ensaios antifúngicos em solução tampão de base nitrogenada para levedura (BNL) (Difco, Detroit, MI) a um pH de 7,0. Cada fármaco testado foi preparado em volumes de 0,1 mL de MH estéril em BNL, em concentrações que variaram de 5 µg/mL a 5 mg/mL para microdiluição. Uma gota (0,02 mL) de suspensão do microrganismo (aproximadamente 10⁶ microrganismos por mL) foi adicionada às diluições de extrato/ágar. Após a incubação a

Tabela 1 Medicamentos e ingredientes do estudo

Catecolaminas	Ingredientes
Epinefrina	<i>Em ampola de 1 mL:</i> - Epinefrina 0,5 mg - Cloreto de sódio 8,5 mg - Metabissulfito 0,5 mg - Água para injeção
Norepinefrina	<i>Em ampola de 4 mL:</i> - Bitartarato de norepinefrina 8 mg (equivalente a 4 mg de norepinefrina base) - Metabissulfito de sódio 4 mg - Cloreto de sódio 34,35 mg - Água para injeção
Dobutamina	<i>Em ampola de 20 mL:</i> - Cloridrato de dopamina 280 mg (equivalente a 250 mg de dobutamina base) - Metabissulfito de sódio 4,8 mg - Água para injeção
Dopamina	<i>Em ampola de 5 mL:</i> - Cloreto de dopamina 200 mg - N-acetilcisteína 2 mg - Edetato dissódico 2 mg - Água para injeção
Dopamina	<i>Em ampola de 5 mL:</i> - Cloridrato de dopamina 200 mg - Metabissulfito de sódio 50 mg

35 °C durante 18-72 horas, os meios foram examinados para proliferação. A CIM é definida como a menor concentração do fármaco que não apresenta proliferação de microrganismos. As diluições sem proliferação visível foram usadas para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), espalhando-se 100 µL da amostra na superfície das placas de ágar secas (MH e BNL) com bastões de vidro estéreis e, em seguida, incubadas a 35 °C durante 18 horas. A CBM de cada extrato é definida como a menor concentração que não apresenta proliferação de microrganismos em placa de ágar. Fluconazol, ampicilina e estreptomicina foram usados como medicamentos-padrão antifúngicos e antibacterianos, respectivamente.

A tabela 1 apresenta os ingredientes dos medicamentos do estudo amplamente usados como vasopressores na área médica.

Resultados

Nenhum dos medicamentos do estudo que continham noradrenalina, adrenalina e dobutamina apresentou qualquer atividade antimicrobiana (tabela 2). Porém, os medicamentos do estudo que continham dopamina mostraram atividade antimicrobiana (tabela 2), um dos quais não apresentou qualquer atividade contra microrganismos semelhantes a fungos. As soluções contendo dopamina (125-1.000 µg/mL), N-acetilcisteína e edetato dissódico

Tabela 2 Atividade antimicrobiana dos compostos expressos como valor da CIM em volume de 100 mL

Medicamentos do estudo	Ingredientes	Concentração (µg/mL)	Valores CIM (100 mL)												
			Ec	Yp	Pa	Li	Ef	Sa	Bc	Ms	Ca	Sc			
Norepinefrina 4 mg/4 mL Ampola	Norepinefrina	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metabissulfito de sódio	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cloreto de sódio	34.350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adrenalina 0,5 mg/1 mL Ampola	Epinefrina	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metabissulfito de sódio	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cloreto de sódio	8.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dobutamina 250 mg/20 mL Ampola	Dobutamina	12.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metabissulfito de sódio	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dopamina 200 mg/5 mL Ampola	Dopamina	40.000	125	125	250	250	125	125	1000	250	1000	250	250	-	-
	N-acetilcisteína	400	1,25	1,25	2,50	2,50	1,25	1,25	10	2,50	10	2,50	2,50	-	-
	Edetato dissódico	400	1,25	1,25	2,50	2,50	1,25	1,25	10	2,50	10	2,50	2,50	-	-
	Dopamina	40.000	500	500	500	250	250	250	250	500	250	250	250	500	125
Dopamina 200 mg/5 mL Ampola	Metabissulfito de sódio	10.000	125	125	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5
Ampicilina	Ampicilina	10	2	32	> 128	2	2	2	< 1	2	2	4	< 8	< 8	< 8
	Estreptomicina	10													
	Fluconazol	5													

Bc, *Bacillus cereus* 702 Roma; Ca, *Candida albicans* ATCC 60193; Ec, *Escherichia coli* ATCC 25922; Ef, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Li, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251; Ms, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607; Pa, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; Sa, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Sc, *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251; Yp, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911.

(-): nenhuma atividade.

(1,25-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram atividade bacteriostática contra bactérias gram-positivas e negativas.

As soluções com concentrações mais altas apresentaram atividade bactericida contra todos os microrganismos, exceto *Y. pseudotuberculosis*, que é capsular. As soluções com diferentes concentrações de dopamina (125-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), N-acetilcisteína e edetato dissódico (1,25-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultaram em valores similares de CIM e CBM para cepas de bactérias gram-positivas, como o bacilo *L. monocytogenes* e o coco *E. faecalis*, e gram-negativas, como o *M. smegmatis*, que contém ácidos micólicos em sua parede celular. No entanto, esses valores foram significativamente diferentes para cada solução. As soluções que continham dopamina (125-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), N-acetilcisteína e edetato dissódico (1,25-2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram atividade bacteriostática contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As soluções que continham dopamina 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, N-acetilcisteína e edetato 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram atividade bactericida contra os mesmos microrganismos. As soluções que continham dopamina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, N-acetilcisteína e edetato 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram atividade bacteriostática e bactericida contra *B. cereus*.

Outros medicamentos que continham dopamina (125-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e metabissulfito de sódio (62,5-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram atividade bactericida contra todos os microrganismos usados no teste.

Discussão

Neste estudo, descobrimos que, de todas as preparações testadas, duas preparações diferentes de dopamina apresentaram atividade antimicrobiana.

Os medicamentos produzidos para uso intravenoso devem ser preparados e administrados em condições estéreis. Microrganismos infecciosos podem ser introduzidos no paciente por meio de recipientes contaminados, diafragma de látex, agulhas e equipamentos de perfusão. Agentes anestésicos e vasopressores podem ser contaminados por microrganismos durante a preparação de uma infusão. Por isso, os efeitos antimicrobianos dos agentes anestésicos e vasopressores são considerados importantes e foram investigados em estudos anteriores.⁸ Notavelmente, propofol é conhecido por favorecer o crescimento de microrganismos.⁸ Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que sulfato de morfina, tiopental de sódio, citrato de fentanila, dexmedetomidina e midazolam têm efeitos antimicrobianos.⁸⁻¹³ No entanto, os estudos sobre os efeitos antimicrobianos de vasopressores comumente usados em unidades de terapia intensiva (UTI) são muito poucos.

Há um aumento de estudos que demonstram que as catecolaminas estimulam o crescimento de microrganismos.^{4,5,14,15} Entre os fatores causais estão a ligação de catecolaminas à transferrina e lactoferrina, o que permite que as bactérias adquiram um sistema específico de resposta óxido férrico¹⁴ e possivelmente α -adrenérgico de alguma bactéria para reconhecer catecolaminas.¹

Por outro lado, os aditivos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas são comumente adicionados a fórmulas comerciais de vasopressores para evitar a contaminação bacteriana.¹⁶⁻¹⁹ Porém, há poucos estudos que investigam a atividade antimicrobiana *in vitro* de fórmulas comerciais de

vasopressores usados clinicamente. Os aditivos mais usados em vasopressores são N-acetilcisteína e edetato dissódico, conhecidos como potentes antioxidantes com propriedades antimicrobianas.¹⁶⁻¹⁹

Este estudo avalia as propriedades antimicrobianas dos vasopressores mais comumente usados nas áreas médicas em concentrações diferentes pelo método de microdiluição.

Os medicamentos vasopressores são administrados por perfusão através de uma veia preferencialmente central de alto calibre para garantir uma concentração plasmática em estado estacionário. Usamos o método de microdiluição para imitar os diferentes níveis de concentração, uma vez que as catecolaminas interagem em uma ampla variação de dose-resposta e exibem várias potências.

Nosso estudo descobriu atividade antimicrobiana em ambos os preparados de dopamina. Nenhum outro medicamento do estudo conseguiu inibir o crescimento de microrganismos em qualquer concentração. Esse achado pode ser explicado pela elevada concentração de metabissulfito de sódio para um dos preparados de dopamina em comparação com os preparados de noradrenalina, adrenalina e dobutamina.

Metabissulfito de sódio é um agente oxidante ativo a um pH baixo. Enquanto todos os medicamentos do estudo têm variações efetivas de pH entre 2,2 e 5,0, o caldo de cultura MH tem um pH de $7,3 \pm 0,1$ e a solução tamponada de BNL usada em nosso estudo tem um pH de 7,0 a 25 °C (meio de cultura não tamponado tem um pH de $5,4 \pm 0,2$ a 25 °C). Portanto, não achamos que o metabissulfito de sódio pode apresentar qualquer atividade antimicrobiana a um pH neutro. Já que o sangue humano tem um pH levemente alcalino de 7,35-7,45 e a maioria das bactérias patogênicas prefere uma variação estreita de pH,^{6,11} pensamos que esse achado está de acordo com as aplicações de medicamentos na vida real.

Outro aditivo oxidante presente nos medicamentos testados é a N-acetilcisteína, que demonstrou ser um agente mucolítico valioso, capaz de ajudar no tratamento antimicrobiano em combinação com antibióticos. Os exemplos em que a atividade antimicrobiana de N-acetilcisteína é observada são na lise da camada mucosa gástrica basal, que permite o escape da *Helicobacter pylori* das secreções gástricas ácidas,²⁰ e na diminuição da formação de biofilmes ao reduzir a produção da matriz de polissacarídeos extracelulares e promover a ruptura do biofilme maduro.²¹ Essas duas atividades são aumentadas por um ambiente ácido e os níveis de pH ligeiramente alcalinos estabelecidos nos ambientes do caldo de cultura do estudo podem ter prejudicado a atividade antimicrobiana da N-acetilcisteína. Contudo, para o metabissulfito, concluímos que um nível de pH levemente alcalino está mais de acordo com as aplicações de medicamentos na vida real.

É importante que as diretrizes de esterilização de equipamentos e assepsia sejam rigorosamente seguidas durante todos os procedimentos feitos em UTI. Em algumas circunstâncias, os vasopressores podem ser contaminados por microrganismos que podem levar a infecções.^{8,9} Logo, o efeito antimicrobiano do vasopressor nesses cenários é de suma importância.^{8,9} Em nossa opinião, os efeitos antibacterianos de dopamina podem ser suficientes para inibir a contaminação durante a preparação de soluções para perfusão.

Demonstramos que a dopamina tem efeitos antibacterianos contra alguns microrganismos frequentemente encontrados em ambientes hospitalares. Sugerimos que as preparações de dopamina devam ser preferidas em pacientes sépticos, por causa de sua atividade antimicrobiana contra vários fungos e cepas de bactérias comumente encontradas em choque séptico. No entanto, a tradução dessas pesquisas laboratoriais em recomendações requer a delimitação das interações entre catecolaminas, várias moléculas coexistentes e cossecretadas com elas e microrganismos em seus ambientes esperados.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Levy B, Collin S, Sennoun N, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med.* 2010;36:2019–29.
- Póvoa P, Carneiro AH. Adrenergic support in septic shock: a critical review. *Hosp Pract (Minneap).* 2010;38:62–73.
- Lyte M. The role of catecholamines in Gram-negative sepsis. *Med Hypotheses.* 1992;37:255–8.
- Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of Gram negative bacteria. *Life Sci.* 1992;50:203–12.
- Neal CP, Freestone PP, Maggs AF, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;194:163–9.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. NCCLS document M26-A; 1999.
- Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, et al. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. NCCLS document M24-A, vol. 23; 2003.
- Hanci V, Cömert F, Ayoglu H, Kulah C, Yurtlu S, Turan IO. Evaluation of the antimicrobial effects of atracurium, rocuronium and mivacurium. *Antimicrobial effects of muscle relaxants. Drugs Ther Stud.* 2011;1:e2.
- Ayoglu H, Kulah C, Turan I. Antimicrobial effects of two anesthetic agents: dexmedetomidine and midazolam. *Anaesth Intensive Care.* 2008;36:681–4.
- Graystone S, Wells MF, Farrell DJ. Do intensive care drug infusions support microbial growth? *Anaesth Intensive Care.* 1997;25:640–2.
- Crowther J, Hrazdil J, Jolly DT, Galbraith JC, Greacen M, Grace M. Growth of microorganisms in propofol, thiopental, and a 1:1 mixture of propofol and thiopental. *Anesth Analg.* 1996;82:475–8.
- Sosis MB, Braverman B, Villaflor E. Propofol, but not thiopental, supports the growth of *Candida albicans*. *Anesth Analg.* 1995;81:132–4.
- Keleş GT, Kurutepe S, Tok D, et al. Comparison of antimicrobial effects of dexmedetomidine and etomidate-lipuro with those of propofol and midazolam. *Eur J Anaesthesiol.* 2006;23:1037–40.
- Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, et al. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol.* 2010;192:587–94.
- Freestone PPE, Haigh RD, Lyte M. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* *BMC Microbiol.* 2007;7:8.
- Ercan S, Oztürk N, Celik-Ozenci C, Gungor NE, Yargicoglu P. Sodium metabisulfite induces lipid peroxidation and apoptosis in rat gastric tissue. *Toxicol Ind Health.* 2010;26:425–31.
- Baker MT, Dehring DJ, Gregerson MS. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology.* 2002;97:1162–7.
- Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:4814–22.
- Mansouri MD, Darouiche RO. In vitro antimicrobial activity of N-acetylcysteine against bacteria colonising central venous catheters. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:471–83.
- Huynh HQ, Couper RT, Tran CD, Moore L, Kelso R, Butler RN. N-acetylcysteine, a novel treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1853–61.
- Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1556–8.