

Efeito das soluções hipertônicas de sacarose em úlceras de córnea de coelho contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Effect of hypertonic sucrose solutions on Pseudomonas aeruginosa infected corneal ulcers of rabbit eyes

Jaime Roizenblatt ⁽¹⁾
Vital P. Costa ⁽²⁾
Eduardo L. Biral ⁽³⁾
Cláudia Nascimento ⁽⁴⁾
Tânia Mara Ibelli Vaz ⁽⁵⁾
Chifumi Takeuchi Calzada ⁽⁵⁾
Jorge Alberto F. Caldeira ⁽⁶⁾

RESUMO

Neste trabalho testa-se o uso de soluções hipertônicas de sacarose a 240% e a 120% em úlceras de córnea de coelho contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados desta pesquisa mostram que o uso de soluções hipertônicas de sacarose é ineficaz em úlceras de córnea infectadas pela bactéria acima. Por outro lado observou-se diminuição da contagem bacteriana em úlceras de córnea contaminadas, submetidas a repetidas instilações de soro fisiológico, possivelmente por um efeito de limpeza mecânica do local da infecção.

Palavras chave: Sacarose; Soluções hipertônicas; *Pseudomonas aeruginosa*; Atividade hídrica; Plasmólise.

INTRODUÇÃO

Há numerosas referências acerca do uso do açúcar, mel ou melaço no tratamento de ferimentos contaminados ^{7, 8, 10, 11}. Em 1970, Cavanagh e cols.³ descreveram o uso do mel como agente bactericida em 12 pacientes com incisões cirúrgicas contaminadas após vulvectomia radical, e observaram que as feridas se tornavam bacteriologicamente estéreis entre 3 e 6 dias após o início da terapêutica. Em 1980, Herszage e Montenegro⁸ obtiveram um índice de sucesso de 99,2% em 120 casos de feridas contaminadas tratadas com açúcar e começaram a elucidar as bases para o uso terapêutico de soluções hipertônicas em ferimentos contaminados. Estes autores propuseram que o açúcar promoveria a criação de um ambiente com baixa "atividade hídrica" (a_w), o qual inibiria o crescimento bacteriano. A baixa atividade hídrica associa-se a uma elevada pressão

osmótica, já que ambos estão termodinamicamente relacionados de acordo com a equação: $P.O = (RT / V) \log (1/a_w)$, onde V é o volume parcial em moles de água, sendo que a pressão osmótica está relacionada ao inverso da atividade hídrica.

Todo microorganismo tem uma atividade hídrica limite abaixo da qual ocorre inibição do seu crescimento ⁴. Plasmólise é o nome do mecanismo pelo qual ocorre a destruição de bactérias num ambiente de alta pressão osmótica, em que se tenha adicionado um soluto como a sacarose. Neste ambiente de baixa atividade hídrica, a bactéria começa a eliminar água e a concentrar amino-ácidos e sais no seu interior. Se este processo continua, as bactérias começam a mudar sua morfologia e cessa toda sua atividade vital. A destruição da bactéria pelo mecanismo de baixa atividade hídrica depende também dos níveis de temperatura, pH, oxigenação nos quais cada

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (LIM 33) e na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

⁽¹⁾ Médico Assistente Doutor da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

⁽²⁾ Médico Assistente da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e Chefe do Departamento de Glaucoma da UNICAMP.

⁽³⁾ Residente de terceiro ano da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

⁽⁴⁾ Médica.

⁽⁵⁾ Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia.

⁽⁶⁾ Professor Titular da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

microorganismo pode sobreviver. Em geral, a atividade hídrica mínima para o crescimento de bactérias patogênicas para o ser humano (como *Streptococcus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Corynebacterium*, *Clostridium* e *Pseudomonas*) é 0,9. O *Staphylococcus aureus*, entretanto, é mais resistente e consegue tolerar atividades hídricas de até 0,86, enquanto alguns fungos toleram níveis ao redor de 0,62.

A atividade hídrica de uma ferida em que se esteja usando sacarose não é constante e é função da frequência com que se adiciona açúcar e da quantidade de líquido liberado pelo tecido infectado. Em circunstâncias ideais, ao se iniciar o tratamento com açúcar, as concentrações deste devem ser bastante altas e próximas do ponto de saturação, que para a temperatura do corpo humano, é de 225g de sacarose / 100g de água, o que corresponde a uma atividade hídrica de 0,83. Imediatamente após a colocação do açúcar, a atividade hídrica da ferida cai brusca-mente, tendendo a se elevar lentamente à medida que ocorre sequestro de água dos tecidos vizinhos. Neste momento, contudo, se novas doses de açúcar são fornecidas, de modo que as bactérias na ferida são sucessivamente submetidas a choques osmóticos, termina-se por induzir a plasmólise e morte bacteriana³. Assim, embora as condições da ferida tratada com açúcar sejam tais que a atividade hídrica esteja temporariamente acima do valor ideal para inibir o crescimento bacteriano, os sucessivos choques osmóticos são suficientes para promover o efeito bactericida. Desta forma, pode-se argumentar que repetidos choques osmóticos poderiam ser suficientes para tornar a córnea imprópria para a sobrevivência de bactérias, embora sendo aquele um local sujeito a uma renovação contínua do filme lacrimal. De fato, no trabalho original de Cavanagh e cols³, o mel era usado como solução hipertônica no tratamento de contaminações bacterianas da mucosa

vulvar, local sabidamente úmido e onde ocorre a produção contínua de um muco próprio da região.

Por outro lado, pode-se argumentar também que a baixa atividade hídrica resultaria em desidratação e morte das células tissulares adjacentes. Entretanto, isto não ocorre em organismos vivos nos tecidos até agora testados, pois a reposição da água se dá tão rapidamente quanto a perda de água das células tissulares adjacentes. Deste modo, a viabilidade das células tissulares permanece inalterada, e o processo de cicatrização prossegue normalmente.

Este estudo visa testar a eficácia de soluções hipertônicas de sacarose em úlceras de córnea de coelho, causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ($a_w = 0,91$). A referida bactéria é sabidamente uma das mais agressivas e destrutivas do globo ocular. Vários testes de eficácia de novos agentes antibacterianos são rotineiramente feitos empregando-se a *P. aeruginosa* (Hyndiuk⁹). Portanto uma prova concludente acerca da eventual eficácia das soluções hipertônicas de açúcar poderá ser obtida testando-se o seu emprego em ceratites causadas por *P. aeruginosa*. Apesar de ser um recurso totalmente inexplorado ainda dentro da oftalmologia, encorajam este experimento os bons resultados obtidos com o uso de soluções hipertônicas em ferimentos contaminados localizados em outros setores do organismo

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo experimental de infecção corneana por nós utilizado foi o de Hyndiuk⁹ com modificações. Os animais utilizados eram coelhos albinos, machos, com 2,0 Kg de peso. Inicialmente os coelhos eram imobilizados, sedados e recebiam anestesia tópica em ambas as córneas. A isto, seguia-se a indução de proptose do globo ocular com auxílio de um êmbolo de seringa de tuberculina. Subseqüente-

mente, produzia-se uma incisão vertical na córnea central de extensão e profundidade padronizadas (5mm e 0,1 mm, respectivamente) em ambos os olhos do coelho com o auxílio de um dispositivo que utilizava um bisturi lâmina 11 com profundidade regulável. A seguir, 20 microlitros de uma suspensão contendo 1×10^9 bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, cepa ATCC 27853) eram instilados em ambos os olhos. A quantificação do número de bactérias na suspensão instilada era feita através de espectrofotometria, utilizando-se a faixa de 520 nanômetros segundo os seguintes parâmetros:

$$\begin{aligned} \text{absorbância} &= 0,038 \text{ e} \\ \text{transmitância} &= 91,5 \end{aligned}$$

Após um período de 12 horas, permitindo o crescimento bacteriano na córnea, diferentes experimentos foram realizados.

Experimento 1

Neste experimento, após o período de incubação de 12 horas, iniciava-se o tratamento de um dos olhos contaminados (escolhido aleatoriamente) com uma gota de solução de açúcar a 240% administrada de 1/2 em 1/2 hora durante 12 horas. O olho contralateral recebia durante o mesmo período, instilações de uma gota de soro fisiológico (NaCl 0,9%) com a mesma frequência.

Findo este período, o animal era sacrificado, e as córneas trepanadas com auxílio de trépano de 8 mm. As córneas eram então pesadas, resfriadas a 0° centígrados para inibir o crescimento bacteriano e a seguir homogeneizadas (Polytron, E.U.A) num volume de 3 ml de soro fisiológico. Após a homogeneização, 0,1 ml provenientes de diluições sucessivas (que começavam em 10^{-1} e chegavam a 10^{-6}) da suspensão eram semeadas em placas de 90 mm de diâmetro contendo meio de TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, E.U.A.). O mesmo volume de cada diluição era inoculado em duas placas

de TSA. Após um período de 24 horas de crescimento nas placas, um único observador, sem o conhecimento de qual olho havia sido tratado com solução de sacarose, realizava a contagem do número de colônias de *P. aeruginosa*. Para cada diluição, calculava-se o número médio de colônias, que equivale à média aritmética do número de colônias observado nas duas placas.

Considera-se que cada colônia seria proveniente de uma unidade formadora de colônia (UFC). Selecionava-se uma das diluições que apresentasse um número médio de colônias entre 10 e 200. Placas com mais de 200 colônias apresentavam conglomerados, impedindo uma contagem acurada, enquanto contagens abaixo de 10 apresentavam um maior grau de variabilidade. O número de UFCs multiplicado por 10 (já que o volume semeado em cada placa era de 0,1 ml) e pelo título da diluição equivalia ao número de UFCs por ml do homogeneizado corneano. Por exemplo, se 53 colônias fossem observadas na placa de diluição 10^{-3} , o número de UFCs por ml seria igual a $53 \times 10 \times 10^3$, ou seja, 53×10^4 UFC/ml. Estes parâmetros eram a seguir normatizados para o peso inicial do botão corneano.

Comparou-se o número UFC/ml nos olhos tratados com solução hipertônica de sacarose ao número de UFC/ml nos olhos tratados com soro fisiológico. Empregou-se o teste de Bartlett para análise da homogeneidade de variância e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise dos resultados. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

Experimento 2

Neste experimento, após as 12 horas de incubação, iniciava-se a instilação de solução de sacarose a 120% em um dos olhos (escolhido aleatoriamente), durante o mesmo período (12 horas) e com a mesma frequência (30 em 30 minutos) do experimento anterior. O olho contralateral recebia

instilações de soro fisiológico com a mesma frequência e durante o mesmo período. O processamento e a análise da contaminação bacteriana em ambos os grupos eram realizados da mesma maneira descrita no Experimento 1.

Experimento 3

Neste experimento, após as 12 horas de incubação, iniciava-se a instilação de solução de sacarose a 240% em um dos olhos (escolhido aleatoriamente), durante o mesmo período (12 horas) e com a mesma frequência (30 em 30 minutos) do experimento anterior. Contudo, o olho contralateral não recebia qualquer instilação. O processamento e a análise da contaminação bacteriana em ambos os grupos eram realizados da mesma maneira descrita no Experimento 1.

Experimento 4

Neste experimento, após o período de incubação de 12 horas, iniciava-se a instilação de soro fisiológico em um dos olhos (escolhido aleatoriamente) durante o mesmo período (12 horas) e com a mesma frequência (30 em 30 minutos) do experimento anterior. O olho contralateral não recebia instilação de nenhuma solução. Neste experimento, o observador responsável pela contagem do número de colônias desconhecia o olho que havia recebido soro fisiológico. O processamento e a análise da contaminação bacteriana em ambos os grupos eram realizados da mesma maneira descrita no Experimento 1.

RESULTADOS

Experimento 1

Dezoito coelhos foram submetidos ao experimento 1. O teste de Bartlett para homogeneidade de variância demonstrou que as variâncias nos grupos analisados diferiam de forma significativa ($p=0,0001$). Sendo assim, visto que a distribuição dos valores de UFC/ml não obedeciam uma distribuição

normal (gaussiana), os valores apresentados incluem o percentil 25, a mediana e o percentil 75 (Tabela 1). Observamos que o percentil 25 e a mediana foram inferiores nos olhos tratados com sacarose 240% em relação aos olhos que receberam soro fisiológico. A análise estatística, através de método não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis), revelou que a diferença entre os grupos não era estatisticamente significativa ($p=0,47518$).

TABELA 1
SACAROSE 240% x SORO FISIOLÓGICO (n=18)

| | SACAROSE 240% (UFC/ml) | SF 0,9% (UFC/ml) |
|--------------|---------------------------|---------------------|
| PERCENTIL 25 | 8300 | 130000 |
| MEDIANA | 99750 | 395000 |
| PERCENTIL 75 | 640000 | 520000 |

Experimento 2

Treze coelhos foram submetidos ao experimento 2. O teste de Bartlett para homogeneidade de variância demonstrou que as variâncias nos grupos analisados diferiam de forma significativa ($p=0,00001$). Observamos que o percentil 25 e a mediana foram inferiores no grupo tratado com sacarose 120% em relação ao grupo que recebeu soro fisiológico (Tabela 2). A análise estatística, através de método não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis), revelou que a diferença entre os grupos não era estatisticamente significativa ($p=0,19097$).

TABELA 2
SACAROSE 120% x SORO FISIOLÓGICO (n=22)

| | SACAROSE 120% (UFC/ml) | SF 0,9% (UFC/ml) |
|--------------|---------------------------|---------------------|
| PERCENTIL 25 | 3700 | 4350 |
| MEDIANA | 6575 | 8125 |
| PERCENTIL 75 | 42000 | 21500 |

Experimento 3

Vinte e dois coelhos foram subme-

tidos ao experimento 3. O teste de Bartlett para homogeneidade de variância demonstrou que as variâncias nos grupos analisados diferiam de forma significativa ($p=0,001$). Observamos que a mediana e o percentil 75 foram inferiores no grupo tratado com sacarose 240% em relação ao grupo controle (Tabela 3). A análise estatística, através de método não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis), revelou que a diferença entre os grupos não era estatisticamente significativa ($p=0,5892$).

TABELA 3
SACAROSE 240% x CONTROLE (n=13)

| | SACAROSE 240% (UFC/ml) | CONTROLE (UFC/ml) |
|--------------|---------------------------|----------------------|
| PERCENTIL 25 | 45000 | 26000 |
| MEDIANA | 175000 | 750000 |
| PERCENTIL 75 | 340000 | 1200000 |

Experimento 4

Onze coelhos foram submetidos ao experimento 4. O teste de Bartlett para homogeneidade de variância demonstrou que as variâncias nos grupos analisados diferiam de forma significativa ($p=0,0006$). Como nos experimentos anteriores, os valores apresentados incluem o percentil 25, a mediana e o percentil 75 (Tabela 4). Observamos que o percentil 25, a mediana e o percentil 75 foram inferiores nos olhos tratados com soro fisiológico em relação aos olhos controle. A análise estatística, através de método não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis), revelou que o número de UFC/ml foi significativamente inferior no grupo tratado com soro fisiológico ($p=0,012561$).

TABELA 4
SORO FISIOLÓGICO x CONTROLE (n=11)

| | SF 0,9% (UFC/ml) | CONTROLE (UFC/ml) |
|--------------|---------------------|----------------------|
| PERCENTIL 25 | 1800 | 5800 |
| MEDIANA | 3200 | 155000 |
| PERCENTIL 75 | 80000 | 450000 |

DISCUSSÃO

Foram realizados inicialmente vários testes piloto para verificar a validade do método que foi empregado neste trabalho e no sentido de testar os meios de cultura, a técnica de inoculação nas placas contendo o meio de cultura, a habilidade do pesquisador que realizou a contagem do número de colônias, a reproducibilidade do método e em especial para saber se o fragmentador dos tecidos (Polytron®) não causava destruição das bactérias. Em um destes testes tomava-se uma alíquota de uma suspensão de *P. aeruginosa* na concentração de 10^9 e dividia-se esta alíquota em duas porções: uma era diretamente semeada nas placas, nas diluições utilizadas no trabalho e outra era homogeneizada no Polytron durante o mesmo período de tempo normalmente necessário para homogeneizar o fragmento de córnea. Os resultados da semeadura e da contagem do número de colônias nas placas foram a seguir submetidos ao mesmo tratamento estatístico previamente mencionado. Este teste inicial foi muito importante neste trabalho visto que a córnea é composta de tecido colágeno bastante difícil de ser fragmentado e o tempo normalmente gasto para homogeneizar as amostras colhidas era muito maior do que o tempo normalmente necessário para fragmentar outros tecidos, como por exemplo fígado, rim, músculo. As leituras do número de bactérias que cresceram nas placas foram também feitas por um outro pesquisador, que desconhecia as contagens obtidas pelo primeiro e os resultados foram a seguir comparados, não se observando diferença no resultado. Na fase piloto também se verificou se a cepa de *P. aeruginosa* que era recuperada das placas era exatamente a mesma cepa que havia sido inoculada nos coelhos, eliminando assim a possibilidade de contaminação cruzada. A cepa utilizada de *P. aeruginosa* provinha de um paciente que tinha

tido um processo infeccioso ocular e esta cepa vinha sendo mantida em laboratório através de processo de repicagens sucessivas em meio de cultura apropriado. Na fase piloto deste trabalho também se verificou se esta cepa ainda mantinha a sua patogenicidade através da sua inoculação em algumas córneas de coelho e obtenção da úlcera infectada em 24 horas. A escolha desta bactéria para realizar este estudo provém da sua conhecida capacidade invasiva e potencial de destruição em curto período de tempo. Estudos que normalmente são feitos para testar a potência e eficácia de um novo antibiótico são freqüentemente realizados utilizando estas bactérias. As gaiolas que recebiam os coelhos eram também esterilizadas pelo calor a cada novo grupo de animais que era testado, e isto era feito no intuito de evitar a possibilidade de contaminação cruzada entre cada lote de animais testados.

Neste trabalho, como cada animal utilizado era tomado como controle de si mesmo, ou seja, os resultados obtidos com o olho direito de um animal eram comparados com os resultados obtidos com o olho esquerdo do mesmo animal, conseguiu-se eliminar uma série de fatores que poderiam interferir com a validade dos resultados se esta precaução não tivesse sido tomada. Sabe-se por exemplo que entre um animal e outro poderia haver diferenças no estado imunológico e portanto na capacidade que cada animal tem em reagir ao inóculo bacteriano. Também pequenas diferenças de peso e idade entre os animais utilizados poderiam influenciar a reação de cada animal porém este fator também era eliminado na medida que cada animal era tomado como controle de si mesmo. Todos os animais estudados eram do sexo masculino, o que também era feito no intuito de evitar eventuais diferenças de perfil hormonal. A escolha do olho que era submetido ao tratamento com sacarose e do olho controle era também feita de forma aleatória, e

o examinador que fazia a inoculação não era o mesmo examinador que fazia a trepanação das córneas.

A expectativa inicial, quando foi proposto este trabalho, era de se obter na córnea o mesmo tipo de resultado que já havia sido observado anteriormente em outras partes do organismo utilizando-se a sacarose, e em experimentos feitos "in vitro"¹. Vários trabalhos já haviam demonstrado os bons resultados obtidos, mediante o emprego de soluções hipertônicas de sacarose ou sacarose pura, em processos infecciosos acometendo diferentes tipos de tecidos, tanto no ser humano como no animal de experimentação^{1, 3-6, 8}. Era para nós motivo de curiosidade o fato do mesmo tipo de tratamento não ter sido testado em relação as infecções de córnea, de forma metódica e num estudo controlado. Relatos esporádicos de literatura descrevem o emprego de vários tipos de soluções hipertônicas em processos infecciosos oculares, porém sem um estudo controlado que confirmasse a sua eficácia^{7, 11}. Muitos destes informes provinham inclusive de outras civilizações, como por exemplo relatos encontrados em papiros acerca do uso do mel pelos antigos egípcios⁷.

No primeiro experimento em que se utilizou a solução hipertônica de sacarose a 240% em um dos olhos e soro fisiológico no olho contralateral, observou-se que não havia diferença significativa em relação ao crescimento da bactéria nos dois olhos de cada animal, isto após um período de 12 horas de crescimento da bactéria, seguido por um período de 12 horas durante o qual se administrou a sacarose e o soro fisiológico. Optou-se por iniciar os testes com esta concentração de sacarose já que era a concentração próxima daquela em que ocorria a saturação da solução e também porque nesta concentração se produzia momentaneamente um ambiente de muito baixa atividade hídrica no segmento anterior do globo ocular do coelho.

Para explicar o resultado obtido aventou-se a hipótese de que a solução de sacarose a 240% estaria eventualmente causando algum dano ao tecido ocular dada a sua grande hipertonidade, ou seja, imaginávamos que talvez a córnea estivesse sendo agredida e não estivesse tolerando uma solução de sacarose nesta concentração. Passamos então a administrar no segundo experimento uma solução de sacarose com a metade da concentração inicial, ou seja, a 120%. Nesta concentração também era produzido, por algum tempo, um ambiente ocular de muito baixa atividade hídrica, suficiente para eliminar, ao menos "in vitro", a *P. aeruginosa*. Os resultados neste segundo experimento foram os mesmos, ou seja não houve uma diferença significativa no crescimento da *P. aeruginosa* entre os dois olhos de cada animal. Evidenciou-se desta maneira que o processo infeccioso da córnea, submetido a repetidos choques hiperosmóticos, mediante a administração de solução hipertônica de sacarose tinha uma evolução totalmente diferente daquela comumente encontrada nos casos em que se fazia uso do mesmo tipo de recurso em processos infecciosos localizados em outros tecidos. Além do fator inicialmente aventado, ou seja agressão da córnea por uma solução hiperosmótica que estivesse desidratando-a em excesso e conseqüentemente fazendo baixar a sua vitalidade e resistência face a um processo infeccioso, imaginou-se que outros fatores pudessem eventualmente contribuir para explicar esta diferença de resposta:

- Ausência de vasos no tecido corneano. A exceção dos vasos perilímbicos, a córnea é uma estrutura não vascularizada, e portanto mais dependente dos tecidos vizinhos, do humor aquoso e do filme lacrimal para receber o afluxo de fatores que contribuem na resposta de defesa. Outros tecidos que não apresentam vascularização própria como o teci-

do cartilaginoso, tem o mesmo tipo de comportamento quando agredidos por processos infecciosos: quando a infecção não consegue ser rapidamente combatida por algum meio terapêutico, a rapidez na destruição deste tecido é semelhante àquela observada na córnea.

- Estado de permanente desidratação relativa do tecido corneano. Sabe-se que a córnea apresenta a sua transparência característica graças a disposição perfeitamente simétrica e regular das fibras colágenas que a compõem e ao estado de relativa desidratação em relação aos outros tecidos oculares. Isto é obtido pelo menos em parte graças à bomba de sódio localizada no endotélio corneano, que mantém a córnea num estado de parcial desidratação em relação aos tecidos circunjacentes. A agressão causada pelos sucessivos choques hiperosmóticos, num total de 24 instilações de uma solução a 240% ou a 120%, poderia alterar este equilíbrio permanente em que a córnea se encontra e interferir na sua capacidade de resposta.
- Características próprias do tecido corneano. Em outros tecidos que não a córnea, em que se administrou sacarose, os estudos anatomo-patológicos demonstraram que não havia dano tecidual pela utilização do açúcar, uma vez que as células teciduais que eram desidratadas pela ação do açúcar rapidamente eram "socorridas" pelas células vizinhas, que repunham a parcela hídrica perdida durante o choque hiperosmótico⁵. O mesmo não acontecia entre as bactérias, pois entre estas não havia cooperação entre si no sentido de repor a parcela hídrica perdida após o choque hipertônico, o que causava a lise da bactéria. Talvez a estrutura ímpar do tecido corneano e a característica distribuição das fibras colágenas seja tal que os choques hipertônicos

prejudiquem igualmente a vitalidade das bactérias e do parênquima corneano.

- Efeito irritativo de uma solução a 240 ou a 120% . A solução de sacarose a 240% e a 120% era bastante irritativa para o animal, o que podia ser evidenciado pela própria reação que ele apresentava logo após a instilação. Como este fator irritativo era repetido 24 vezes durante cada experimento, é fácil de se entender que isto se constituía numa fonte de estresse para o animal. O mesmo não acontecia em relação ao soro fisiológico, que era bem tolerado pelo animal. Hoje em dia o estresse é um dos fatores considerados como causa na diminuição da capacidade de resposta dos seres vivos em relação a processos infecciosos.
- Efeito "inibidor" da pálpebra e lacrimejamento. Os coelhos reagiam ao processo infeccioso já instalado com a oclusão palpebral, provavelmente por causa da dor e da fotofobia que apresentavam. Apresentavam também abundante lacrimejamento. Isto fazia com que o tempo de contato com as soluções a 240% e a 120% não fosse tão prolongado quanto seria desejável, uma vez que a solução hipertônica era rapidamente diluída pelo lacrimejamento do animal. Após a instilação do soro fisiológico e da solução hipertônica o animal rapidamente fechava os olhos, impedindo um contato mais prolongado com a solução hipertônica. Nas outras situações em que se demonstrou o benefício no uso da sacarose, como por exemplo nas infecções da incisão cirúrgica da parede abdominal, o contato com a sacarose era contínuo.
- Agressividade da *P. aeruginosa*. Esta bactéria é bastante conhecida pelo seu grande poder de invasão e destruição do tecido corneano em pouco espaço de tempo. Não sabemos qual seria o resultado da apli-

cação da solução hipertônica de sacarose em infecções de córnea causadas por germes de menor poder invasivo. Seria interessante também testar a aplicação de sacarose após um período de crescimento menor do que 12 horas.

Para confirmar a hipótese de que o tratamento das infecções oculares por *P. aeruginosa* com soluções hipertônicas de sacarose a 240% era totalmente ineficaz e que levava a resultados idênticos àqueles obtidos nos casos em que não se submetia a córnea infectada a nenhum tipo de tratamento procedeu-se ao terceiro experimento. Neste grupo o olho contralateral ao olho que recebia a solução hipertônica de 1/2 em 1/2 hora não recebia nenhum tipo de tratamento. Novamente a análise estatística mostrou que não havia diferença significativa entre tratar com solução hipertônica a 240% e não fazer nenhum tipo de tratamento em infecções de córnea causadas por *P. aeruginosa*, após ter passado um período de 12 horas de crescimento da bactéria. Este resultado confirmava a total ineficácia das soluções hipertônicas de sacarose, em relação ao tratamento de úlceras de córnea causadas por *P. aeruginosa*, pelo menos nos moldes do experimento que foi aqui proposto e com esta cepa estudada.

No quarto experimento testou-se a eficácia da administração de uma solução de soro fisiológico de 1/2 em 1/2 hora, após um período de 12 horas de crescimento da bactéria. Neste grupo o olho contralateral ao olho que recebia soro não era submetido a nenhum tipo de tratamento. A análise estatística mostrou que havia uma diferença estatisticamente significativa entre os dois olhos de cada animal e que os olhos que receberam o soro fisiológico apresentaram uma contagem bacteriana menor. Neste teste o resultado obtido com o soro fisiológico confirmou uma ação já conhecida em relação a processos infecciosos em geral ou seja, a importância da limpeza mecânica da

ferida contaminada. A administração do soro fisiológico não teve ação medicamentosa propriamente dita, constituiu-se tão somente num meio de lavar o local contaminado e diminuir a contagem bacteriana.

Em conclusão, este trabalho mostrou que o uso de soluções hipertônicas de sacarose que há vários anos tem sido empregado com bons resultados em processos infecciosos de cicatrizes cirúrgicas ou de ferimentos contaminados, localizados em várias partes do organismo, não parece estar indicado em infecções da córnea, pelo menos nas causadas pela cepa de *P. aeruginosa* aqui estudada. Várias hipóteses foram aventadas para explicar esta falta de eficácia das soluções hipertônicas quando usadas em infecções da córnea. A continuação deste estudo através da análise dos resultados anatomopatológicos das córneas tratadas com soluções hipertônicas poderá talvez fornecer algumas respostas e eventualmente confirmar algumas das hipóteses aqui formuladas ou então trazer alguma outra explicação acerca da falha das soluções hipertônicas aqui empregadas. Os resultados obtidos, embora diferentes daqueles que eram esperados inicialmente, não invalidam a continuação desta linha de estudo. A pesquisa com outras substâncias como o polietilenoglicol 400, cuja molécula é grande o suficiente para também não penetrar nas células (da mesma forma que a sacarose), poderá ser bastante promissora no que diz respeito à córnea. Estudos "in vitro" e em condições de hipertonicidade equivalente às soluções de sacarose, demonstraram atividade bactericida muito mais rápida do polietilenoglicol 400 do que da sacarose⁶. Isto talvez se constitua num aspecto crucial para resolver o problema de criar ambientes de baixa atividade hídrica e suficiente poder bactericida em locais continuamente banhados por um filme líquido, como é o caso do segmento anterior do globo

ocular . A pesquisa de outras opções terapêuticas além das atualmente conhecidas é extremamente importante em virtude da crescente resistência bacteriana aos antibióticos atualmente disponíveis. Recursos terapêuticos capazes de agir de outras formas que aquelas atualmente empregadas, poderão se tornar uma alternativa válida dentro de alguns anos. Para se tornar uma nova arma terapêutica, a plasmólise bacteriana obtida através da adição de solutos ao meio extracelular, recurso utilizado neste trabalho para combater infecções graves de córnea, depende ainda da pesquisa de compostos que se coadunem com as características próprias do ambiente e dos tecidos oculares.

SUMMARY

The authors analyse the effects of hypertonic sucrose solutions at 240%

and at 120% on corneal ulcers infected by Pseudomonas aeruginosa in rabbit eyes. The results obtained show that hypertonic sucrose solutions are ineffective against infected corneal ulcers . Repeated instillation of a saline solution in these infected corneal ulcers caused a reduction of the bacterial counting, probably by means of a mechanical rinsing effect.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BAYER, M. E. - Response of cell walls of *Escherichia coli* to a sudden reduction of the environmental osmotic pressure. *J. Bacteriol.*, **93**: 1104-1112, 1967.
- 2 BIER, O. In: Microbiologia e Imunologia. Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1990, pp.: 931.
- 3 BOZZINI, J. P. ; KOHN, E. S. ; JOSEPH, A.; HERSZAGE, L. & CHIRIFE, J. - Submicroscopical changes in *Klebsiella pneumoniae* cells treated with concentrated sucrose and polyethylene glycol 400 solutions. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**: 375-379, 1986.
- 4 CAVANAGH, D.; BEAZLEY, J.; OSTA-POWICS, F. - Radical operation for carcinoma of vulva: a new approach to wound healing. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, **77**: 1037-1040, 1970.
- 5 CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A. & KOHN, E. S. - In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for use of sugar in the treatment of infected wounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**: 733-766, 1983.
- 6 CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A.; BOZZINI, J.; LEARCHINI, N. & KOHN, E. - In vitro antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solution. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **24**: 409-412, 1983.
- 7 FORREST, R. D. - Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.*, **75**: 198-205, 1982.
- 8 HERSZAGE, L.; MONTENEGRO, J. R.; JOSEPH, A. L. - Tratamiento de las heridas supuradas con azúcar granulado comercial. *Bol. Trab. Soc. Argent. Cir.*, **41**: 315-330, 1980.
- 9 HYNDIUK, R. A. - Experimental *Pseudomonas* keratitis. *Trans. Am. Ophth. Soc.*, **79**: 540-624, 1981.
- 10 KROLL, R. G.; ANAGNOSTOPOULOS, G. D. - Potassium fluxes on hyperosmotic shock and the effect of phenol and bromopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol) on deplasmolysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Bacteriol.*, **51**: 313-323, 1981.
- 11 SELWYN, S. - Evolution of antiseptics. *Br. J. Clin. Pract. Suppl.*, **25**: 1-3, 1983.

ZOST - TRIFLURIDINA

Pomada de uso tópico, no tratamento do Herpes Simplex

FRUMTOST, coloca à disposição da classe médica o **ZOST**, um anti-herpético para uso tópico oftálmico.

Seu princípio ativo, a Trifluridina é uma substância nova para o mercado brasileiro, embora amplamente utilizada nos Estados Unidos.

Trata-se de um antagonista metabólico, que interfere na síntese das moléculas do DNA viral, inibindo assim, a multiplicação do vírus.

O medicamento é indicado para o tratamento de infecções corneanas, causadas por Herpes Simplex.