

Análise da solução de hidroxipropilmetilcelulose a 2% para uso intra-ocular sob microscopia óptica e eletrônica.

SÉRGIO KWITKO¹; & RUBENS BELFORT JR².

INTRODUÇÃO

As cirurgias do segmento anterior geralmente resultam em alguma perda de células endoteliais devido a vários fatores, entre eles o trauma mecânico do endotélio com a íris, cristalino e lente intra-ocular (LIO), e da própria manipulação cirúrgica. O maior dano parece estar intimamente relacionado ao trauma cirúrgico, ou seja, uma perda aguda de células endoteliais (JAFÉ, 1984).

As LIO podem lesar o endotélio corneano se a lente tocar as células endoteliais durante sua inserção (BOURNE & KAUFMAN, 1976). Uma relação direta entre o contato do polimetilmetacrilato, mesmo que momentâneo, com o endotélio causa lesão extensa destas células, podendo levar a edema irreversível de córnea (KAUFMAN & KATZ, 1976).

A partir da comprovação da lesão endotelial causada pela manipulação cirúrgica na câmara anterior e da interação da LIO com o endotélio, foram estudadas várias substâncias para diminuir esse dano.

O ar talvez tenha sido o primeiro agente utilizado na tentativa de reduzir o dano endotelial nas cirurgias com implante de LIO. Tem ação puramente mecânica, evitando o contato do plástico da LIO com o endotélio (EIFERMAN & WILKINS, 1979).

Diversas substâncias visco-elásticas foram desenvolvidas e experimentadas em cirurgia ocular com vários objetivos: manter a câmara anterior, proteger o endotélio corneano, controlar a pressão vítrea, facilitar manobras cirúrgicas, como por exemplo inserção da LIO, e aumentar a visibilidade de estruturas intra-oculares (EISNER, 1983).

Exemplos destas substâncias são a polivinilpirrolidona (KATZ e col., 1977), coágulo sanguíneo (HECHT e col., 1980), álcool polivinílico (OLSON e col., 1980), albumina bovina sérica, gamaglobulina, sulfato de condroitina (HARRISON e col., 1982), hialuronato de sódio (PAPE & BALAZS, 1980) e metilcelulose (FECHNER, 1977).

O grande impulso recente no sentido da popularização da cirurgia visco-elástica levou a maioria dos oftalmologistas brasileiros a utilizarem substâncias viscosas nos procedimentos intra-oculares, visando proteger o endotélio corneano e facilitar a cirurgia. A Metilcelulose (MC) presta-se muito bem para esta finalidade. É uma substância disponível, barata (custando muitas vezes menos que o hialuronato de sódio) e facilmente preparada em qualquer laboratório farmacêutico medianamente equipado.

A MC é um polímero macromolecular derivado da celulose, que vem sendo utilizado desde 1976 no implante de LIO (FECHNER, 1977). A celulose é uma molécula insolúvel. Modificações químicas em sua estrutura, por reações ou por substituições dos radicais hidroxila, dão origem a derivados solúveis. Radicais metila e hidroxipropila conferem maior solubilidade à molécula (SCHOTT, 1980; FECHNER, 1983; FECHNER 1985).

Vários trabalhos clínicos e experimentais demonstram ser a MC eficaz e segura para uso intra-ocular (ARON-ROSA

e col., 1983; FECHNER, 1977; MAC RAE e col., 1983; VIEIRA e col., 1985; BOCCHESE, 1987; LIMA e col., 1987; VILA, 1987).

FECHNER (1983) salienta que as substâncias visco-elásticas para uso intra-ocular devem: a) ser inertes, isosmóticas, estéreis, não pirogênicas e não antigênicas; b) ser livres de elementos corpusculares e opticamente transparentes; c) ser o suficientemente viscosas para satisfazer as necessidades clínicas, e d) ser hidrófilicas o suficiente para facilitar sua remoção do olho ao final da cirurgia e de seus remanescentes poderem deixar a câmara anterior através do trabeculado.

A MC a 2% parece preencher todos os requisitos acima mencionados, exceto o fato de ser livre de partículas.

ROSEN e col. (1986) examinaram 5 frascos de HPMC a 2% preparados para uso intra-ocular, provenientes de farmácias de hospitais da Inglaterra, Alemanha Ocidental e Suécia. Constataram a presença de grande quantidade de material vegetal e outras impurezas em todos os frascos, concluindo que os métodos de filtração da MC são inadequados e, portanto, desaconselhando seu uso em cirurgia intra-ocular.

Depósitos de grumos brancos suspensos no humor aquoso e sobre o endotélio corneano, íris, cristalino e vítreo foram relatados após o uso de MC em cirurgias intra-oculares (LORENZETTI & SANCILIO, 1967; VIEIRA e col., 1985; BOCCHESE, 1986; KOSTER & STILMA, 1986).

Não havendo, até o momento, nenhum trabalho na literatura nacional a respeito da pureza da Metilcelulose a 2% para uso intra-ocular produzida no Brasil, resolveu-se estudar quantitativa e qualitativamente a presença de partículas imersas na solução da HPMC a 2% para uso intra-ocular fabricadas por dois laboratórios nacionais.

MATERIAL E MÉTODO

I — Soluções utilizadas:

1. Metilcelulose a 2% para uso intra-ocular:

Foram utilizados 10 frascos contendo Hidroxipropil metilcelulose (HPMC) a 2% preparados pela Ophthalmos (Farmácia Oftalmológica São Paulo) (Grupo A) e 10 frascos da mesma substância preparados pelos Laboratórios Alcon do Brasil (Grupo B). Cada frasco, devidamente lacrado e esterilizado, continha 2ml de HPMC a 2% para uso intra-ocular, preparada, segundo os fabricantes, conforme descrição feita por FECHNER & FECHNER (1983), a seguir reproduzida:

- adicionar 2g de HPMC de alta pureza (Methocel E 4M Premium da Dow Chemical Corporation) em 30 ml de solução salina balanceada (SSB) fervendo, enquanto a solução é agitada;
- manter sob agitação constante em temperatura ambiente por 20 minutos;
- adicionar 70 ml de SSB previamente resfriada a 8°C e agitar vigorosamente.

1 Pós-graduando de Oftalmologia (nível mestrado) da Escola Paulista de Medicina.

2 Professor Adjunto de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina.

Endereço para separatas: Av. Angélica, 1275 - ap. 15 - São Paulo - SP - CEP 01227 - F: (011) 66-1917

- d) manter a solução no refrigerador por 12h, agitando-a, a cada hora, nas primeiras 3h;
- e) filtrar a solução através de filtro Millipore de 8 μm (Ophthalmos) ou de 10 μm (Alcon) sob pressão de nitrogênio;
- f) dividir a solução em rascos de 2 ml cada e fechá-los hermeticamente;
- g) autoclavar a 120°C por 40 minutos;
- h) agitar a solução várias vezes, e
- i) manter no refrigerador por 6h.

2. Solução controle:

Foram utilizados 10 frascos, lacrados e esterilizados, contendo, cada um, 2 ml de solução salina balanceada (SSB) submetida à técnica descrita anteriormente, entretanto sem conter HPMC (Grupo C). Tais frascos foram preparados pela Ophthalmos.

3. Metilcelulose a 2% não filtrada:

Foi utilizado um frasco contendo HPMC a 2%, preparada pela Ophthalmos, conforme técnica descrita anteriormente, porém sem ter sido filtrada.

II — Experimentos:

1. Observação sem auxílio óptico:

As etiquetas foram removidas de todos os frascos. Estes, em seguida, foram submetidos à iluminação em fenda de 1 mm de espessura por 5 mm de altura da Lâmpada de Fenda Topcon SL-6E, intensidade de luz média, e observados, em sala clara, à procura de partículas em suspensão no interior do conteúdo líquido, sem auxílio óptico.

2. Observação sob microscopia óptica:

Para a observação sob microscopia óptica, as soluções foram examinadas dentro dos frascos e sobre lâmina de microscopia.

A) Das amostras dentro dos frascos:

O conteúdo dos frascos foi examinado em microscópio óptico Nikon Optiphot, com aumentos de 40 e 100x, para a identificação das partículas, ainda dentro dos frascos, de acordo com sua morfologia (FLINT, s. d.; OLIVEIRA & AKISUE, 1979; ROSEN e col., 1986).

Partículas de aspecto fusiforme com parede dupla, dobras transversais e lúmen central foram classificadas como fibras vegetais; estruturas planas com bordas irregulares e pontilhado sobre a superfície, como flocos vegetais; partículas em formato de pequenas agulhas agrupadas e em formato de balões tetragonais, como cristais; estruturas planas, bi-refringentes, transparentes, como fragmentos de vidro, e partículas com características diferentes das descritas acima foram consideradas como outras impurezas.

As fotografias foram realizadas neste mesmo microscópio, com máquina fotográfica Nikon FX-35, filme Kodak Ektachrome 200 Asa.

B) Das amostras sobre lâminas:

A solução a ser examinada foi retirada do frasco com um bastão de vidro limpo, colocada sobre a câmara de Neubauer e coberta por uma lâminula nova, de maneira que a profundidade entre a câmara e a lâminula sempre permanesse 0,1 mm (estabelecida pela própria câmara de Neubauer).

A seguir, a câmara montada foi colocada sob microscopia óptica (Microscópio Nikon Optiphot) e procederam-se aos seguintes exames:

1. identificação das partículas, de acordo com sua morfologia, com aumentos de 40, 100, 200 e 400x;
2. mensuração das partículas, com lente ocular cariométrica Zeiss acoplada ao microscópio, previamente calibrada com régua padrão Zeiss 5 + 100/100 mm \pm 0,2 μm . O aumento usado no microscópio foi de 100x, de maneira que cada divisão pequena da ocular cariométrica correspondia a 10 μm (WEIBEL, 1963). As partículas, de acordo com seu tamanho, foram divididas em dois grupos: menores ou iguais a 10 μm e maiores que 10 μm ;

3. contagem do número de partículas, de acordo com o tipo e tamanho das mesmas, com aumento de 100x. A contagem foi realizada nos 4 quadrantes externos de 1x1 mm da câmara de Neubauer. O número total de partículas encontrado foi dividido por 0,4 para obtenção do número por ml de solução (NELSON & HENRY, 1982).

Este experimento foi realizado em 3 amostras de cada frasco de cada grupo, obedecendo à seguinte cronologia: 3 amostras do frasco 1 do grupo A; 3 amostras do frasco 1 do grupo B; 3 amostras do frasco 1 grupo C. Continuou-se o experimento em um novo frasco do grupo A, mantendo-se a ordem acima estabelecida, até todos frascos de todos grupos terem sido examinados.

A solução de HPMC a 2% não filtrada foi examinada de acordo com a mesma metodologia.

Antes de cada exame, a câmara de Neubauer, as lâminulas e o bastão de vidro utilizados foram lavados com detergente, enxaguados com água destilada estéril e usados imediatamente após esta lavagem sem secar. Para cada frasco examinado foi utilizada uma lâminula nova. Todo este material foi examinado sob microscopia, com aumento de 100x, para identificação de possíveis impurezas, antes de se colocar a solução a ser estudada sobre a câmara de Neubauer. O material foi submetido a novo procedimento de limpeza, antes de se examinar a solução, sempre que encontrada alguma partícula.

A fotodocumentação foi realizada da mesma maneira que a descrita no experimento 2.A.

3. Observação sob microscopia eletrônica de varredura:

Foram examinadas 2 amostras de HPMC a 2%, uma de cada grupo (A e B), em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Autoscan Etec, para identificação das partículas.

O material a ser estudado sob MEV foi montado de duas maneiras:

a) Sem desidratação:

- 1) retirou-se uma pequena alíquota de HPMC e espalhou-se em fina película sobre suporte próprio do microscópio;
- 2) colocou-se em Metalizador Balzers-Union tipo 07120-A, para metalização com ouro, durante 1 minuto, e
- 3) levou-se ao MEV.

b) Com desidratação:

- 1) retirou-se uma pequena alíquota de HPMC e espalhou-se em fina película sobre suporte próprio do microscópio;
- 2) aqueceu-se em estufa a 37°C por 5 minutos;
- 3) desidratou-se em Dissecador de Ponto Crítico Balzers-Union tipo 11120;
- 4) colocou-se em Metalizador Balzers-Union tipo 07120-A, para metalização com ouro, durante 1 minuto, e
- 5) levou-se ao MEV.

As fotografias foram realizadas com câmara Polaroid no próprio microscópio referido anteriormente, utilizando-se filme Neopan SS 120 Asa.

III — Método estatístico:

Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos e testes não paramétricos, levando-se em conta a natureza das distribuições das variáveis estudadas. Foram aplicados os seguintes testes:

1. Análise de variância a dois critérios de classificação (SOKAL & ROHLF, 1969) com o objetivo de comparar os grupos A, B e C e os frascos utilizados em cada grupo, em relação ao número de partículas. Esta análise foi aplicada, em separado, para partículas \leq 10 μm e para partículas $>$ 10 μm , e quando mostrou diferença significante, foi complementada pelo teste de contrastes de Tukey (SOKAL & ROHLF, 1969).

2. Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975), quando comparou-se os grupos A, B e C em relação aos números de fibras, flocos, cristais, vidros

e outras partículas $\leq 10 \mu\text{m}$ e uma partícula $> 10 \mu\text{m}$, e quando mostrou diferença significativa foi complementada pelo teste de Dunn (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

RESULTADOS

I — Observação sem auxílio óptico:

Partículas em suspensão foram observadas em todas as amostras de HPMC dos grupos A e B, quando os frascos foram examinados sem auxílio óptico, com iluminação em fenda (Fig. 1), assim como nos frascos do grupo controle e no da HPMC não filtrada.

II — Identificação das partículas sob microscopia óptica:

A observação das soluções de HPMC sob microscopia óptica, tanto ainda dentro do vidro como sobre a câmara de Neubauer, revelou cinco tipos de partículas nos grupos estudados:

1) **Fibras:** Fibras vegetais de aspectos fusiforme com parede dupla, dobras transversais e lúmen central (Fig. 2 e 3) foram observadas em 22 das 30 amostras do grupo A e em todas as do grupo B. Foram encontradas fibras de diversos tamanhos, em comprimento e diâmetro, semelhantes àquelas identificadas na HPMC não filtrada. Não foram observadas fibras nas amostras do grupo controle.

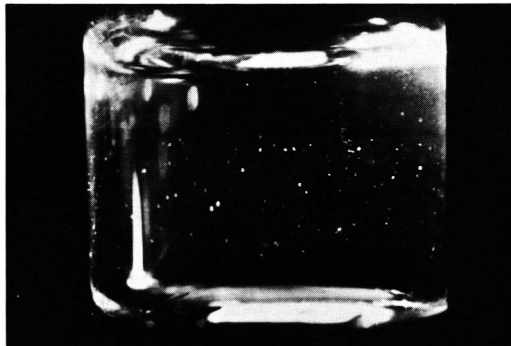


Fig. 1 — Partículas em suspensão em frascos de HPMC a 2% do grupo B, com iluminação em fenda (16x).

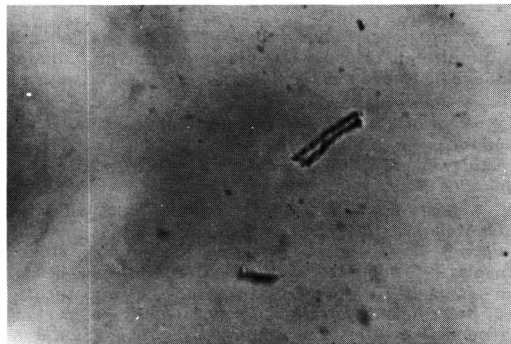


Fig. 2 — Observação de partículas em suspensão em HPMC a 2% do grupo B, ainda dentro do frasco. Notar a presença de fragmento de fibra vegetal de aproximadamente $100 \mu\text{m}$ de diâmetro (microscopia óptica — $40\times$).

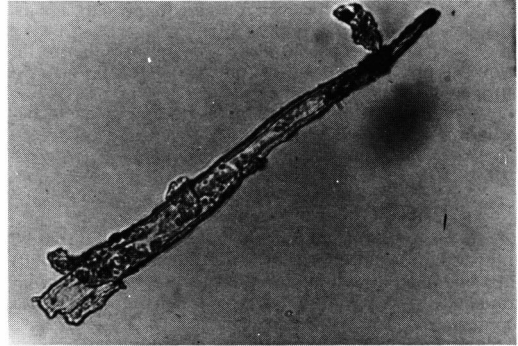


Fig. 3 — Fragmento de fibra vegetal, com parede dupla de lúmen central, de aproximadamente $25 \mu\text{m}$ de diâmetro, em amostra do grupo B, sobre lâmina (microscopia óptica - $200\times$).

2) **Flocos:** Estruturas planas de diversos tamanhos, alguns mais claros e outros mais escuros, com borda irregular e de aspecto pontilhado sobre a superfície (Fig. 4), lembrando parede de células do esclerênquima e parênquima vegetal, foram observadas em todas as amostras dos grupos A e B, assim como na HPMC não filtrada. Não foi observado material semelhante nas soluções do grupo controle.

3) **Cristais:** Cristais em formato de pequenas agulhas agrupadas (Fig. 5), de aspecto semelhante a cristais de cloreto de cálcio, e outros tetragonais (Fig. 6), similares a cristais de cloreto de potássio, foram encontrados em 17 amostras do grupo A e em 5 do grupo B, assim como na HPMC não filtrada. Este material não foi encontrado no grupo controle.

4) **Vidros:** Fragmentos de vidro, bi-refringentes, de vários tamanhos (Fig. 7), estavam presentes em 16 amostras do grupo A, em 4 do grupo B e em 11 do grupo C, assim como na solução de HPMC não filtrada.

5) **Outras:** Partículas diferentes das anteriores foram encontradas em todas as amostras de todos os grupos.

III — Identificação das partículas sob microscopia eletrônica de varredura:

As amostras estudadas revelaram a presença de 2 tipos de partículas sólidas:

1) **Fibras:** estruturas fusiformes, cilíndricas achatadas com dobras transversais, paredes de superfície discretamente

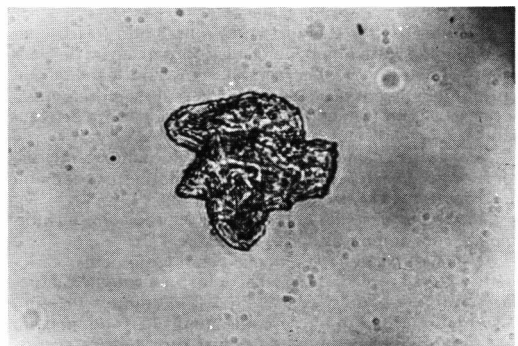


Fig. 4 — Floco com pontuações e parede irregular, de aproximadamente $55 \mu\text{m}$ de diâmetro, em amostra do grupo A, compatível com parede de célula vegetal, sobre lâmina (microscopia óptica - $400\times$).

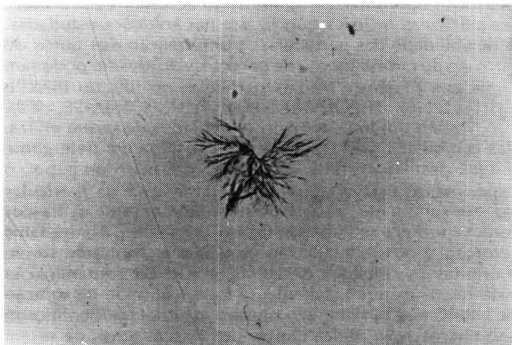


Fig. 5 — Cristal de aproximadamente 100 μm , de aspecto de pequenas agulhas agrupadas, compatível com cristal de CaCl_2 , em amostra do grupo A, sobre lâmina (microscopia óptica - 200x).

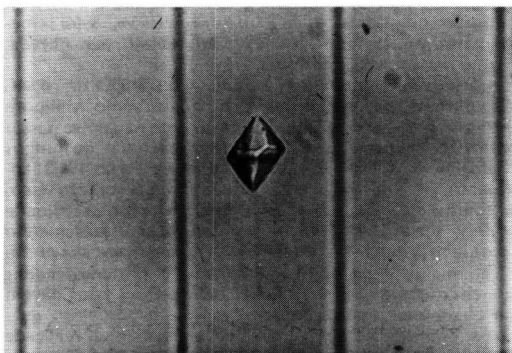


Fig. 6 — Cristal tetragonal de aproximadamente 15 μm , compatível com cristal de KCl, em amostra do grupo A, sobre câmara de Neubauer (microscopia óptica - 400 x).

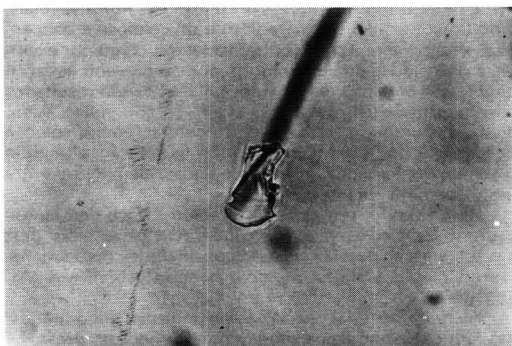


Fig. 7 — Fragmento de vidro de aproximadamente 30 μm , em amostra do grupo B, sobre lâmina (microscopia óptica - 200x).

te enrugadas e, por vezes, com depressões sobre sua superfície (Fig. 8 e 9), e

2) **Outras:** Estrutura amorfas, de aspecto diferente das partículas vegetais, cristais ou fragmentos de vidro.

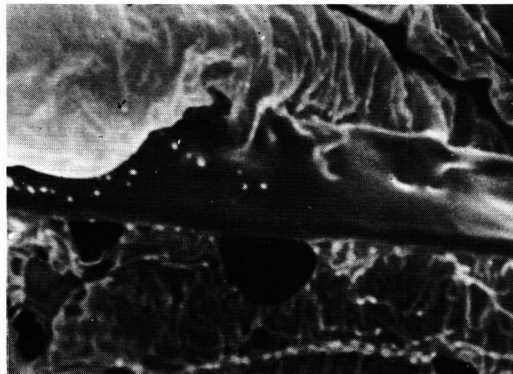


Fig. 8 — Fibra vegetal, cilíndrica achatada, com pontuações na superfície, de aproximadamente 25 μm , envolta por material líquido da solução, em amostra do grupo A (microscopia eletrônica de varredura - 500x).



Fig. 9 — Fragmento de fibra vegetal, com parede dupla, lúmen central e dobra transversal, de aproximadamente 10 μm , em amostra do grupo B. Notar a presença de fraturas e irregularidades de superfície (microscopia eletrônica de varredura - 800x).

IV — Contagem do número de partículas:

Na tabela I, é apresentado um resumo do número total médio de partículas por ml de solução de cada grupo estudado.

TABELA I
Número médio total de partículas por ml de solução, contadas em frascos de HPMC (A e B) e em solução controle (C), de acordo com o tamanho das mesmas.

Grupos	Tamanho das partículas		Total
	$\leq 10 \mu\text{m}$	$> 10 \mu\text{m}$	
A	72,7	18,5	91,2
B	76,2	20,5	96,7
C	10,9	3,0	13,9

DISCUSSÃO

A Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959) dispõe que soluções injetáveis devem ser isentas de partículas

estranhas ou não à natureza da(s) substância(s) dissolvida(s). Tais partículas podem ser oriundas de causas diversas, tais como: a) do material constitutivo do vidro recipiente; b) de substâncias imperfeitamente dissolvidas ou imperfeitamente estabilizadas em suas soluções; c) de processos de recristalização "a posteriori" que ocorrem com soluções supersaturadas; d) de contaminações devidas a sujidades contidas nos recipientes ou provenientes de poeiras do meio ambiente, e e) de partículas destacadas de determinados filtros.

Para se conseguir uma solução livre de partículas FECHNER (1985) ressalta que a filtração sob pressão é fundamental no preparo da HPMC para uso intra-ocular. Este autor recomenda filtros de membrana com poros de $8 \mu\text{m}$ de diâmetro, das companhias Millipore, Sartorius ou Sparcler.

Filtros Millipore são amplamente usados na indústria para remover partículas de gases e líquidos, e em microbiologia para filtrar microrganismos quantitativamente. Filtros com poros de $0,6 \mu\text{m}$ de diâmetro removem todas bactérias e fungos, e de $0,01 \mu\text{m}$ são efetivos na remoção de vírus. São isentos de cargas elétricas e quimicamente inertes, não alterando, portanto, o pH da solução a ser filtrada nem removendo suas substâncias ativas (THEODORE & FEINSTEIN, 1953).

São considerados como um método efetivo na eliminação de contaminação, tanto partículas como microrganismos, do ar e de soluções para uso intra-ocular (JAFFE, 1970).

Entretanto, ROSEN e col., (1986), em sua análise de 5 frascos de HPMC a 2% para uso intra-ocular preparados por 5 diferentes farmácias européias, 3 delas usando filtro Millipore de $1,2 \mu\text{m}$, encontraram, entre material vegetal e outras impurezas, de 621 a 20.000 partículas $> 10 \mu\text{m}$, e de 74.000 a $5,7 \times 10^6$ partículas $\leq 10 \mu\text{m}$, concluindo que tal método de filtração não é adequado para purificar a solução. Entretanto, além de sua amostragem ter sido muito pequena para se chegar a essa conclusão, não especificaram se este número de partículas encontrado foi por ml de solução ou no volume total do frasco, o qual também não foi especificado. É de se estranhar este achado de tamanha quantidade de partículas, principalmente em função de terem sido filtradas, pelo menos 3 amostras, em Millipore de $1,2 \mu\text{m}$. Não há referência no trabalho quanto ao filtro utilizado pelas outras 2 farmácias.

A análise de 20 frascos de HPMC a 2% para uso intra-ocular fabricados por 2 laboratórios nacionais também revelou a presença de material vegetal entre outras impurezas, inclusive maiores que $10 \mu\text{m}$, em todos os frascos. Tais laboratórios, A e B, utilizaram filtros de membrana Millipore com poros de 8 e $10 \mu\text{m}$ de diâmetro, respectivamente.

Encontrou-se uma média de 72,7 e 76,2 partículas menores ou iguais a $10 \mu\text{m}$ por ml, para as amostras dos grupos A e B respectivamente, achado este significativamente maior que o grupo controle ($\bar{X} = 10,9$ partículas $\leq 10 \mu\text{m}$ por ml) (Tab. I).

Em relação às partículas maiores que $10 \mu\text{m}$, a média encontrada foi de 18,5 e 20,5 partículas por ml nas amostras dos grupos A e B, respectivamente, também significativamente maior que o grupo controle ($\bar{X} = 3,0$ partículas por ml) (Tab. I).

No que se refere ao tipo de partícula encontrada, os grupos A e B não diferiram significativamente entre si para partículas $\leq 10 \mu\text{m}$, entretanto apresentaram quantidade estatisticamente maior de impurezas que o grupo controle.

O fato dos laboratórios A e B terem usado filtros Millipore com tamanhos de poros diferentes, 8 e $10 \mu\text{m}$ respectivamente, não influenciou no achado de maior ou menor número ou tamanho das partículas, pois a diferença não foi estatisticamente significante entre os grupos A e B.

O encontro de partículas menores ou iguais a $10 \mu\text{m}$ é um achado esperado, em função do diâmetro dos poros

dos filtros utilizados. Entretanto, não deveriam estar presentes partículas maiores que $10 \mu\text{m}$ nas soluções estudadas. A flexibilidade das partículas, a deformação dos poros do filtro e o desprendimento de partículas do mesmo poderiam explicar a presença de tais partículas no filtrado (BARRICHELLO, 1987; THEODORE & FEINSTEIN, 1953; JAFFE, 1970).

Mesmo tendo-se tomado os cuidados de serem utilizadas lamínulas novas, todo material lavado com detergente e água destilada estéril, sem secar com pano ou papel, o experimento estava sujeito à contaminação de partículas do meio ambiente, a partir do momento em que os frascos foram abertos e retirada a solução para análise. Alguns fatos reforçam a possibilidade das partículas encontradas serem inerentes às soluções de HPMC e não de contaminação externa: 1) material semelhante foi encontrado na solução de HPMC não filtrada; 2) o mesmo material foi identificado sob microscopia óptica dentro dos frascos antes de serem abertos, e 3) não foram encontradas partículas de aspecto vegetal nas soluções do grupo controle.

Esses achados demonstram que as soluções estudadas de HPMC a 2% para uso intra-ocular contém impurezas, especialmente restos de material vegetal. Este material, não encontrado nas amostras do grupo controle, é o mesmo utilizado como fonte para manufatura da HPMC, e foi semelhante ao encontrado na amostra de HPMC não filtrada, porém de tamanho diferente.

Talvez fosse interessante purificar a solução de HPMC com filtros de poros menores, como por exemplo, Millipore de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro, que teoricamente não deixa passar partículas maiores que $0,47 \mu\text{m}$ nem bactérias ou fungos (THEODORE & FEINSTEIN, 1953; BARRICHELLO, 1987). Entretanto, além da dificuldade de se filtrar uma solução viscosa como a MC por estes poros minúsculos, sua viscosidade poderia ser alterada, pois esta é dependente do tamanho da cadeia da molécula de celulose. Quanto maior sua purificação, maior será a quebra da molécula e, portanto, menor sua viscosidade (OSOL & PRATT, 1973). Estes fatos devem ser objeto de novos estudos.

A identificação de partículas vegetais pode ser realizada por processos químicos, através de corantes específicos para células vegetais, ou por processos físicos, através da morfologia da partícula (OLIVEIRA & AKISUE, 1979).

A impregnação da parede da célula vegetal por corantes como hematoxilina, cloreto de zinco iodado e fluoroglucina, depende de uma série de fatores, tais como a quantidade de lignina e outras impurezas presentes nas fibras vegetais, modificações químicas na molécula de celulose e concentração do corante. Estas e outras variáveis, como por exemplo a viscosidade de uma solução, podem prevenir a reação química do corante com a parede celular, dando resultados falso-negativos (GRAFF, 1940; ROSEN e col., 1986). Além disso, misturando-se uma gota do corante com a solução de HPMC sobre a lâmina, há diluição da solução, alterando o número de partículas a serem contadas, além de ser outra fonte de contaminantes.

Assim sendo, optou-se pelo método físico de identificação de partículas vegetais, o qual, exclusivamente pela morfologia e anatomia celular, é considerado um método eficiente, simples, rápido e barato (OLIVEIRA & AKISUE, 1979).

Além de material vegetal, também foram encontrados, nas soluções estudadas, fragmentos de vidros, provavelmente originários dos frascos de vidro que continham as soluções. O achado de fibras, flocos e fragmentos de vidro foi semelhante ao de ROSEN e col. (1986). Este autor ainda encontrou partículas que chamou de material presumivelmente protéináceo, embebido em matriz mucilagínosa, material este não encontrado nas amostras do presente trabalho.

Outras partículas identificadas nos frascos de HPMC estudados foram cristais, provavelmente de cloreto de po-

tássio (KCl) e de cloreto de cálcio (CaCl₂). O solvente utilizado na preparação da HPMC para uso intra-ocular é a solução salina balanceada, a qual possui os seguintes sais: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, Citrato de Na⁺ e Acetato de Na⁺ (ARON-ROSA e col., 1983). Os sais assumem vários formatos quando cristalizam. Geralmente tomam formas específicas de acordo com cada sal, o que torna sua identificação muito sugestiva, entretanto não de certeza. O aspecto de pequenas agulhas agrupadas, como na Fig. 5, lembra cristais de CaCl₂, e o de estruturas tetragonais, como na Fig. 6, cristais de KCl (FLINT, s. d.). Estes cristais não foram encontrados por ROSEN e col. (1986) em sua análise de partículas em solução de HPMC para uso intra-ocular.

Uma solução que contenha mais soluto do que está presente no equilíbrio de soluto-solvente, ou seja, uma solução supersaturada, concentração, resfriamento, impurezas e viscosidade da solução favorecem à reação de cristalização (FLINT, s. d.), situações estas presentes no processo de fabricação da HPMC. Entretanto, ao se diluir a solução de HPMC, como por exemplo no humor aquoso, tais cristais tendem a se dissolver (QUAGLIANO & VALLARINO, 1978).

As partículas encontradas com características diferentes das descritas anteriormente foram consideradas como outras impurezas. A presença destas pode ser considerada como contaminação, a partir do meio ambiente durante o processo de fabricação da HPMC para uso intra-ocular ou após a abertura dos frascos para análise da solução.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método amplamente utilizado no estudo de papel e polpa vegetal, sendo quase que indispensável para a análise qualitativa de diversos tipos de fibras, no que se refere à sua identificação, flexibilidade, espessura, superfície, ultra-estrutura, degradação química, fadiga e ligações inter-celulares (PARHAM, 1974). A aparência da fibra vegetal na MEV é muito característica, o que a torna de fácil identificação (PARHAM, 1974): célula fusiforme, cilíndrica achatada, com dobras transversais, paredes de superfície discretamente enrugada e, às vezes, com regiões deprimidas da parede celular (pontuações) (Fig. 8 e 9).

A ausência de flocos vegetais e de fragmentos de vidro no estudo sob MEV deve-se provavelmente ao fato de ter sido utilizada somente uma fina película de HPMC para se montar o material a ser estudado. A quantidade das referidas partículas por ml de solução estudada é pequena, como demonstrado pela microscopia óptica, e talvez estas estruturas não tenham sido incorporadas no material levado à MEV. Outro aspecto a ser salientado é o fato de o microscópio eletrônico de varredura estudar somente a superfície das estruturas (MURPHY & ROOMANS, 1984). As partículas que se encontram abaixo da superfície da substância viscosa não são detectadas pela MEV, podendo também justificar a não detecção dos flocos e fragmentos de vidro.

Os cristais também não foram encontrados no estudo sob MEV, provavelmente pelo fato de serem partículas solúveis que desaparecem com o aquecimento (QUAGLIANO & VALLARINO, 1979), reação a que foi submetida a HPMC no preparo para a observação sob MEV.

A Metilcelulose (MC) dá o nome a uma família de polímeros provenientes da celulose com diferentes propriedades e aplicações nas mais diversas atividades humanas como alimentação, pinturas, cosméticos, entre outros (DOW CHEMICAL, 1962).

A MC usada para cirurgia intra-ocular é a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), altamente purificada e estéril (FECHNER & FECHNER, 1983).

O polímero de celulose é encontrado na natureza como uma substância estrutural, cuja função é a de suporte da parede da célula vegetal (REES, 1977; FECHNER & FECHNER, 1983).

As fibras da celulose obtidas a partir do algodão purificado ou da polpa da madeira são tratadas com soda cáustica para produzir celulose alcalina. Esta é tratada com cloreto de metila sob pressão, havendo conversão de 2/3 dos grupos hidroxila em radicais metoxila, originando o éter metílico da celulose, ou seja, metilcelulose. A reação desta com óxido de propileno introduz no anel de glicose grupos de éter propilenoglicol, originando hidroxipropilmetilcelulose. O número e a proporção de radicais introduzidos na molécula de celulose irão conferir diferentes características e tipos de MC (DOW CHEMICAL, 1962; SCHOTT, 1980; OSOL & PRATT, 1973).

A MC é produzida em 6 tipos básicos que diferem em sua composição química, temperatura de coagulação e viscosidade (DOW CHEMICAL, 1962).

Para utilização em oftalmologia, a de mais alta viscosidade (4.000 cps) é a preferida, pois somente uma pequena quantidade necessita ser adicionada à solução aquosa para aumentar grandemente a viscosidade sem alterar significativamente suas propriedades ópticas (SWAN, 1945).

As fibras de celulose, por serem de origem vegetal e não metabolizadas pelo organismo humano, deixadas na câmara anterior, poderiam provocar reação inflamatória intra-ocular e toxicidade ao endotélio corneano (TINKER e col., 1974); FECHNER, 1983). Entretanto, a grande maioria dos estudos clínicos e experimentais demonstram ser a MC uma substância inerte e atóxica aos tecidos intra-oculares (ARON-ROSA e col, 1983; FECHNER & FECHNER, 1983; McCULLLEY e col., 1985; VIEIRA e col., 1985; BABA e col., 1986; BOCCHESE, 1986; LIESEGANG e col. 1986; THOMSEN e col., 1987; VILA 1987).

FLEMING e col. (1959) atribuíram a iridoclitite causada pela injeção de MC a 1% na câmara anterior do olho de coelho ao veículo empregado (SF a 0,9%), não tendo ocorrido com soluções salinas balanceadas. Portanto, a preparação da solução de MC para uso intra-ocular deve ser realizada em SSB, recomendado por FECHNER & FECHNER (1983).

A maioria dos trabalhos relata hipertensão ocular discreta transitória após uso de MC em cirurgias intra-oculares, provavelmente devido à obstrução da malha trabecular pela fibras e partículas da substância viscosa (LORENZETTI & SANCILIO, 1967; ARON-ROSA e col., 1983; FECHNER, 1983; FECHNER & FECHNER, 1983; MAC RAE e col., 1983; BOCCHESE, 1986; LIESEGANG e col. 1986; THOMSEN e col., 1987). Não se deve esquecer o fato de que a própria cirurgia intra-ocular, independente do uso de substância viscoelástica, pode provocar aumento da pressão intra-ocular no pós-operatório imediato (JAFFE, 1984).

FECHNER (1985) relata que, para cirurgia intra-ocular, é essencial usar a Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e não a Metilcelulose (MC) simplesmente, pois esta última, sendo menos solúvel, tende a se aglomerar e a formar microprecipitados nas estruturas intra-oculares.

O destino da pequena quantidade de fibras de MC que pode ficar dentro do olho é incerto (FECHNER, 1983).

Sabe-se que o sistema enzimático humano não é capaz de metabolizar moléculas de celulose (DOW CHEMICAL, 1962; TINKER e col., 1974; FECHNER, 1977, 1983). Ingerida por via oral, a MC é totalmente recuperada nas fezes, mostrando-se assim, resistente a uma ampla faixa de ações enzimáticas e bioquímicas (DEICHMANN & WITHERUP, 1943).

VIEIRA e col. (1985) e BOCCHESE (1986) relataram que tais grumos brancos desaparecem em 24-48h após a injeção da HPMC a 2%, sem deixar seqüelas. FLEMING e col. (1959) estimaram, por métodos colorimétricos, a permanência de 0,1 ml de solução de MC a 0,5% na câmara anterior de olhos de coelhos, em até 72h. FECHNER & FECHNER (1983) relataram o desaparecimento da HPMC a 2% corada com "sulphan blue" 24h após sua injeção na câmara anterior

de pacientes submetidos à cirurgia de catarata com implante de LIO.

Diversos estudos clínicos e experimentais demonstram reação granulomatosa com células gigantes mutinucleadas do tipo corpo estranho ao redor de partículas de celulose presentes no organismo humano (HUEPER, 1942; TINKER e col., 1974), inclusive nos tecidos intra-oculares (PEIFFER e col., 1983; YAMADA e col., 1986).

A presença de partículas vegetais e outras impurezas nas soluções de HPMC a 2%, utilizadas rotineiramente em cirurgias intra-oculares em nosso meio, pode ter importante significado clínico e estar relacionada a iridoclitites e alterações da pressão intra-ocular no pós-operatório de pacientes em que se utilizaram tais soluções.

RESUMO

Foram analisados 20 frascos de Hidroxipropilmetilcelulose a 2% para uso intra-ocular de dois laboratórios nacionais (10 de cada — grupos A e B) para a procura, identificação e mensuração de partículas imersas na solução, e comparados com 10 frascos do grupo controle (solução salina balanceada — grupo C). Foi estudado também um frasco de HPMC a 2% não filtrada para comparação.

Ao exame dos frascos a olho nu, com iluminação em fenda, foram observadas partículas em suspensão em todas as soluções de todos os grupos, inclusive do grupo controle.

Foram identificados, sob microscopia óptica, 5 tipos de partículas em todas as soluções de Hidroxipropilmetilcelulose de ambos os laboratórios: fibras vegetais, flocos (paredes de células vegetais), fragmentos de vidro, cristais e outras impurezas. As fibras e flocos vegetais e os cristais só foram encontrados nas soluções de Hidroxipropilmetilcelulose, enquanto que as outras partículas foram observadas também nas soluções do grupo controle. O material vegetal foi semelhante ao encontrado na Hidroxipropilmetilcelulose a 2% não filtrada.

A média de partículas encontrada por ml de solução foi de 91,2 no grupo A (72,7 menores ou iguais a 10 μm e 18,5 maiores que 10 μm), 96,7 no grupo B (76,2 menores ou iguais a 10 μm e 20,5 maiores que 10 μm) e 13,9 no grupo C (10,9 menores ou iguais a 10 μm e 3,0 maiores que 10 μm). Os grupos A e B não diferiram entre si, porém apresentaram um número de partículas por ml de solução significativamente maior que o do grupo controle.

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de fibras vegetais típicas.

Esses achados mostraram que as soluções de Hidroxipropilmetilcelulose a 2% para uso intra-ocular utilizadas rotineiramente em nosso meio contém partículas em seu interior, inclusive de material vegetal.

O significado clínico desses achados pode ser importante e relacionado ao pós-operatório em iridoclitites e alterações da pressão intra-ocular.

SUMMARY

Twenty bottles of 2% Hydroxypropylmethylcellulose for intraocular surgery, from two Brazilian laboratories (10 of each — groups A and B), were studied to look for, identify and measure impurities in the solution and were compared with ten bottles of a control group (balanced salt solution — grupo C).

Five types of particles were identified by light microscopy in all samples of 2% Hydroxypropylmethylcellulose from both laboratories, in varying amount and size: cellulose fibers, vegetal flakes, crystals, glass fragments and other impurities. The identified vegetal material was also seen in a sample of raw material from which all the clinical material had been prepared. Scanning electron microscopy also disclosed typical vegetal fibers.

The bottles of control group were free of vegetal material and crystals, but not of glass fragments and other impurities.

There were, in the average, 91,2 and 96,7 particles/ml in groups A and B respectively and 13,9 particles/ml in group C. There was no statistic difference between groups A and B, but both groups presented, each one, statistically more impurities than the control group.

These data showed that 2% Hydroxypropylmethylcellulose solutions for intraocular use have impurities and vegetal contaminants, which may play an important role in postoperative iridocyclitis and ocular hypertension.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARON-ROSA, D.; COHN, H. C.; ARON, J. J.; BOUQUETY, C. — Methylcellulose instead of Healon in extracapsular surgery with intraocular lens implantation. *Ophthalmology*, **90**: 1235-8, 1983.

2. BABA, T.; KASAHARA, A.; MOMOSE, A. — Use of methylcellulose in cataract extraction and IOL implantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **27** (suppl.): 91, 1986. (abstract, 405) (ARVO abstract).
3. BARRICHELLO, A. — Uso de membranas filtrantes na indústria de alimentos. São Paulo, 1987. 281p. [Tese — mestrado — Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
4. BOCCHESE, W. T. — Ação da metilcelulose a 2% na câmara anterior do olho de coelho: estudo biomicroscópico, paquimétrico, tonométrico, citológico e histológico. Belo Horizonte, 1986. 183p. [Tese — doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais].
5. BOURNE, W. M. & KAUFMAN, H. E. — Endothelial damage associated with intraocular lenses. *Am. J. Ophthalmol.*, **81**: 482-5, 1976b.
6. DEICHMANN, W. & WITHERUP, S. — Observations on the ingestion of methyl cellulose and ethyl cellulose by rats. *Lab. Cl. Med.*, **28**: 1725-7, 1943.
7. DOW CHEMICAL COMPANY. Methocel. Midland. Michigan, 1962. 35p.
8. EIFERMAN, R. A. & WILKINS, E. L. — The effect of air on human corneal endothelium. *Am. J. Ophthalmol.*, **92**: 328-31, 1979.
9. EISNER, G. — General considerations concerning viscous materials in ophthalmic surgery. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, **103**: 247-53, 1983.
10. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo, Siqueira, 1959. v.2.
11. FECHNER, P. U. — Methylcellulose, a viscous cushioning material in ophthalmic surgery. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, **103**: 259-62, 1983.
12. FECHNER, P. U. — Methylcellulose in lens implantation. *J. Am. Intraocul. Implant. Soc.*, **3**: 180-1, 1977.
13. FECHNER, P. U. — Preparation of 2% hydroxypropylmethylcellulose for viscous surgery. *J. Am. Intraocul. Implant. Soc.*, **11**: 606-7, 1985.
14. FECHNER, P. U. & FECHNER, M. U. — Methylcellulose and lens implantation. *Br. J. Ophthalmol.*, **67**: 259-63, 1983.
15. FLEMING, T. C.; MERRILL, D. L.; GIRARD, L. J. — Studies of the irritating action of methylcellulose. *Arch. Ophthalmol.*, **61**: 565-7, 1959.
16. FLINT, Y. — Formation and growth of crystals. In: FLINT, Y. — *Essentials of crystallography*. Moscow, Peace, s. d. p. 18-34.
17. GRAFF, J. — *A color atlas for fiber identification*. Appleton, Institute of Paper Chemistry, 1940. 27p.
18. HARRISON, S. E.; SOLL, D. B.; SHAYEGAN, M.; CLINCH, T. — Chondroitin sulfate: a new and protective agent for intraocular lens insertion. *Ophthalmology*, **89**: 1254-60, 1982.
19. HECHT, S. D.; LAPIDUS, C. S.; LAING, R. — Protection of corneal endothelium with intraoperative rehydrated blood coagulum coating of intraocular lenses. *Ophthalmic Surg.*, **11**: 604-5, 1980.
20. HOLLANDER & WOLFE — *Nonparametric statistical methods*. New York, John Wiley & Sons, 1973. 503p.
21. HUEPER, W. C. — Experimental studies in cardiovascular pathology. IV. Methyl cellulose atheromatosis and thesaurosis. *Arch. Pathol.*, **33**: 1-7, 1942.
22. JAFFE, N. S. — Corneal edema. In: JAFFE, N. S. — *Cataract surgery and its complications*. 4.ed. St. Louis, Mosby, 1984. p. 399-425.
23. JAFFE, N. S. — Elimination of contamination from ophthalmic solutions for intraocular surgery. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, **74**: 406-16, 1970.
24. KATZ, J.; KAUFMAN, H. E.; GOLDBERG, E. P.; SHEETS, J. H. — Prevention of endothelial damage from intraocular lens insertion. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, **83**: 204-12, 1977.
25. KAUFMAN, H. E. & KATZ, J. I. — Endothelial damage from intraocular lens insertion. *Invest. Ophthalmol. Visc. Sci.*, **15**: 996-1000, 1976.
26. KOSTER, R. & STILMA, J. S. — Comparison of vitreous replacement with Healon and with HPMC in rabbits' eyes. *Doc. Ophthalmol.*, **61**: 247-53, 1986.
27. LIESEGANG, T. J.; BOURNE, W. M.; ILSRUP, D. M. — Short- and long-term endothelial cell loss associated with cataract extraction and intraocular lens implantation. *Am. J. Ophthalmol.*, **97**: 32-8, 1984.
28. LIESEGANG, T. J.; BOURNE, W. M.; ILSRUP, D. M. — The use of hydroxypropyl methylcellulose in extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Am. J. Ophthalmol.*, **102**: 723-6, 1986.
29. LORENZETTI, O. J. & SANCILIO, L. F. — Procedure for evaluating drug effects on increased intraocular pressure. *Arch Ophthalmol.*, **78**: 624-8, 1967.
30. MACRAE, S. M.; EDELHAUSER, H. F.; HYNDIUK, R. A.; BURD, E. M.; SCHULTZ, R. O. — The effects of sodium hyaluronate, chondroitin sulfate, and methylcellulose on the corneal endothelium.

- lium and intraocular pressure. *Am. J. Ophthalmol.*, 95: 332-31, 1983.
31. McCULLEY, J. P.; STERN, M. E.; MEYER, D. R. — In vitro assessment of the comparative toxicity of viscoelastic substances. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26 (suppl.): 239, 1985. (abstract, 7) (ARVO abstract).
 32. MURPHY, J. A. & ROOMANS, G. M. — Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. O'Hare, Scanning Electron Microscopy Inc., 1984. 344p.
 33. NELSON, D. A. & HENRY, J. B. — Hematologia e coagulação: métodos básicos. In: HENRY, J. B. — *Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais*. 16. ed. São Paulo, Manole, 1982. v.1. p. 941-1004.
 34. OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. — *Farmacobotânica*. São Paulo, USP, 1979, v.1, 115p.
 35. OSOL, A. & PRATT, R. — Methylcellulose. In: OSOL, A & PRATT, R. — *The United States dispensatory*. 27.ed. Philadelphia, Lippincott, 1973. p. 742-3.
 36. PAPE, L. G. & BALAZS, E. A. — The use of sodium hyaluronate (Healon) in human anterior segment surgery. *Ophthalmology*, 87: 669-705, 1980.
 37. PARHAM, R. A. — Electron microscopy of pulp and paper. *Wood Science*, 6: 245-55, 1974.
 38. PEIFFER, R. L.; SAFRIT, H. D.; WHITE, E. & EIFRIG, D. E. — Intraocular response to cotton, collagen and cellulose in the rabbit. *Ophthalmic Surg.*, 14: 582-7, 1983.
 39. QUAGLIANO, J. V. & VALLARINO, L. M. — Soluções. In: QUAGLIANO, J. V. & VALLARINO, L. M. — *Química*. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1979. p. 395-419.
 40. REES, D. A. — Simple carbohydrate chains of the periodic type. In: REES — *Polysaccharide shapes*. New York, John Wiley & Sons, 1977. p. 41-61.
 41. ROSEN, E.; GREGORY, R. P. F.; BARNETT, F. — Is 2% hydroxypropylmethylcellulose a safe solution for intraoperative clinical applications? *J. Cataract Refract. Surg.*, 12: 679-84, 1986.
 42. SCHOTT, H. — Colloidal dispersions. In: OSOL, A. — *Remington's pharmaceutical sciences*. 16.ed. Easton, Mack, 1980, p. 285-93.
 43. SIEGEL, S. — *Estatística no paramétrica*. 2.ed. México, Trillas, 1975. 346p.
 44. SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. — *Biometry*. San Francisco, Freeman, 1969. 776p.
 45. SWAN, K. C. — Use of methyl cellulose in ophthalmology. *Arch. Ophthalmol.*, 33: 378-90, 1945.
 46. THEODORE, F. H. & FEINSTEIN, R. R. — Preparation and maintenance of sterile ophthalmic solutions. *JAMA*, 152: 1631-3, 1953.
 47. THOMSEN, M.; SIMONSEN, A. H.; ANDREASSEN, T. T. — Comparison of sodium hyaluronate and methylcellulose in extracapsular cataract extraction. *Acta Ophthalmol.*, 65: 400-5, 1987.
 48. TINKER, M. A.; BURDMAN, D.; DEYSINE, M.; TEICHER, I.; PLATT, N.; AUFSES JR., A. — Gramulomatous peritonitis due to cellulose fibers from disposable surgical fabrics. *Ann. Surg.*, 180: 831-5, 1974.
 49. VIEIRA, L. A.; FARAH, A. L. H. L.; VITA, J. B.; BELFORT JR., R. — Metilcelulose a 2% em cirurgia intraocular. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 48: 175-7, 1985.
 50. VILA, M. F. — *Metilcelulose a 2% na câmara anterior de olhos de coelhos: estudo histopatológico*. São paulo, 1987. 50p. [Tese — mestrado — Escola Paulista de Medicina].
 51. WEIBEL, E. R. — Principals and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.*, 12: 131-55, 1963.
 52. YAMADA, T.; JIKIHARA, S.; FUNAHASHI, M. — Ocular response to viscous substances in the rabbit. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF OPHTHALMOLOGY, 25, Roma, 1986. *Proceedings*. Milano, 1986. p. 46.