



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTERILIZAÇÃO DE FÁRMACOS PARA TERAPIA OCULAR

Trabalho submetido por
Mickaël Jorge Nobre Dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTERILIZAÇÃO DE FÁRMACOS PARA TERAPIA OCULAR

Trabalho submetido por
Mickaël Jorge Nobre Dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Paula Serro

Outubro de 2015

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que estiveram presentes e me apoiaram na concretização deste trabalho:

À Prof. Doutora Ana Paula Serro pela constante disponibilidade, compreensão, generosidade, pelo saber e conhecimento que me transmitiu e pelas sugestões relevantes durante a orientação sem nunca me deixar de apoiar.

Aos professores que me acompanharam ao longo deste percurso académico pela atenção, simpatia, disponibilidade e partilha de conhecimentos.

Aos meus colegas de turma que transformaram-se em grande amigos por estarem sempre comigo nos bons e maus momentos, em especial ao António Tanganho, Pedro Coelho, Filipe Correia, Tatiana Mendes, Cláudia Coelho, Carolina Cavaleiro.

A Associação de Estudantes do Instituto Superior Ciências da Saúde Egas Moniz, por os melhores momentos da minha vida académica e pelas grandes amizades no qual criei.

Aos meus amigos que criei no meu percurso académico e ficaram amigos para a vida, sem eles tudo tinha sido mais difícil. Agradeço especialmente ao João Roxo, João Santana, David Baptista e João Perreira pelo o apoio nos bons e maus momentos.

À minha família pelo apoio, carinho, compreensão, dedicação, amor incondicional e a constante confiança nas minhas capacidades. Graças a vocês por toda a perseverança e sacrifícios, consegui chegar ao meu objectivo. Obrigado Pai, Mãe e Irmã por vocês serem os meus pilares.

À Ana Rita Luís pelo amor, apoio único, paciência, motivação, e sobretudo nunca ter desistido de mim quando mais precisava. Sem ti, não era o que sou hoje.

A todos, o meu sincero Muito Obrigado!

Resumo

As patologias oculares têm uma elevada incidência na população, podendo afectar significativamente a capacidade visual e a qualidade de vida dos indivíduos. Muitas dessas patologias são passíveis de serem tratadas com fármacos.

Esterilidade, desinfecção e assepsia são conceitos essenciais na área biomédica e farmacêutica para a prevenção de contaminações microbianas. Os fármacos para terapia ocular necessitam de ser estéreis, por forma a garantir a ausência de todas as formas de vida microbiana e pirogénios.

Os métodos de esterilização dividem-se, conforme a sua natureza, em químicos como é o caso da utilização de gases como o óxido de etileno, ou físicos, como a esterilização por calor húmido, calor seco, radiação e filtração esterilizante.

Os vários processos de esterilização para a produção de medicamentos estéreis devem respeitar a legislação e recomendações das entidades reguladores bem como as normas existentes. A escolha dos processos depende da natureza do produto e seus excipientes e deve ser feita de modo a não comprometer a actividade do fármaco.

Actualmente não existe um processo de esterilização único capaz de satisfazer os critérios necessários para todos os fármacos.

Palavras chaves: Esterilização; Terapia ocular; Preparações oftálmicas; Esterilidade

Abstract

The ocular pathologies have a high incidence on population and they can affect significantly the visual capacity and the individual's quality of life. Many of these pathologies can be treated by drugs.

The sterilization, disinfection and asepsis are the essential concepts in biomedical and pharmaceutical areas for the prevention of microbial contaminations. Drugs for ocular therapy need to be sterilized, therefore it's necessary to ensure the absence of all types of microbial and pyrogenic life in these pharmaceutical products, without affect the activity of them by the sterility process.

Sterilization processes are divided according to their nature, being the chemical ones used by gases as for an example ethylene oxide, and the physical ones as sterilization by moist heat, dry heat, radiation and filtration.

The several sterilization processes for the sterility medications production should respect legislation and recommendations of regulation entities.

Nowadays, there are not a once sterilization process capable to satisfy criteria's for all of drugs.

Keywords: Sterilization; Eye therapy; Ophtalmic preparations; Sterility

Índice Geral

Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	12
Lista de Abreviaturas	13
1. Introdução	15
2. O olho e suas patologias	17
2.1 Aspectos gerais sobre a anatomia e fisiologia do olho	17
2.2 Patologia Oculares	20
2.2.1 Blefarite	20
2.2.2 Conjuntivite	21
2.2.3 Edema Macular	23
2.2.4 Glaucoma	24
2.2.5 Queratite	24
2.2.6 Uveíte	26
3. Tratamentos de patologias oculares	29
3.1 Tipos de preparações oftálmicas	29
3.2 Fármacos utilizados para o tratamento	31
4. Esterilização de fármacos	33
4.1 Noções gerais de esterilização	34
4.1.1 Esterilização, desinfecção e assepsia	35
4.1.2 Parâmetros de cinética de morte microbiana	36
4.1.3 Sterility Assurance Level – SAL	38
4.2 Directrizes/ normas nacionais e internacionais para a esterilização de fármacos	40
4.2.1 Principais entidades reguladoras	41
4.2.2 Farmacopeia	43
4.2.3 Principais directrizes/normas reguladoras	45
4.3 Tipos de esterilização	49
4.3.1 Calor Húmido	49
4.3.2 Calor Seco	52
4.3.3 Filtração	53
4.3.4 Radiação ionizante (gama - γ)	54
4.3.5 Química (óxido de etileno)	55

4.4 Validação da esterilização	57
5. Conclusão	61
Bibliografia.....	63

Índice de Figuras

Figura 1. Globo ocular, corte horizontal.....	17
Figura 2. Blefarite anterior Estafilocócica.....	21
Figura 3. Exemplo de conjuntivite alérgica sazonal	22
Figura 4. Queratite bacteriana, apresentando edema da córnea ligeiro e três úlceras de córnea com diferentes tamanhos	25
Figura 5. Manifestações bilaterais de xeroftalmia. (a) A córnea é opaca e revestida por uma membrana amniótica. (b) Irritação conjuntival e opacificação da córnea	27
Figura 6. Curva de calor ideal na inativação de esporos bacterianos. (a) Declínio exponencial do número de sobreviventes durante o aquecimento a uma temperatura constante, expressa o valor D. (b) Declínio exponencial do valor D com o aumento de temperatura, designa o valor Z	38
Figura 7. Para uma carga microbiana inicial de 10^2 o processo de esterilização terá de alcançar uma redução de 8 log em organismos viáveis. Isso exigirá uma diminuição de 8 vezes o valor D (por exemplo, se o organismo tem um valor D de 2 minutos, serão necessários $8 \times 2 = 16$ minutos para alcançar uma redução de 8 log e um SAL de 10^{-6}), que corresponde ao valor Z	39
Figura 8. Fases do ciclo de esterilização na autoclave	50
Figura 9. Temperaturas de esterilização correspondentes aos microorganismos resistentes ao calor húmido.....	51
Figura 10 - Exemplo de uma tira de solução de ensaio, mudança de cor.....	58
Figura 12. Teste de Bowie-Dick.....	58

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais características da blefarite anterior (estafilocócica e seborreica) e da blefarite posterior.....	20
Tabela 2 - Características clínicas da conjuntivite viral, bacteriana e alérgica, e sua etiologia	21
Tabela 3 - Etiologia e características das formas mais comuns de EM.....	23
Tabela 4 - Principais microorganismos da queratite bacteriana e viral.....	25
Tabela 5 - Preparações oftálmicas e suas respectivas características	29
Tabela 6 - Patologias e exemplos de fármacos.....	31
Tabela 7-Exemplos de agentes antimicrobiano e respectiva utilização e local de acção	36
Tabela 8 - Normas ISO referentes aos vários métodos de esterilização.....	46
Tabela 9 - Número máximo permitido de partículas/m ³ em função do tamanho	47
Tabela 10 - Exemplo operações de fabrico de medicamentos estéreis (esterilização terminal) e sua respectiva classe.....	48
Tabela 11 - Relação ente pressão, tempo e temperatura no ciclo de esterilização de autoclave.....	50
Tabela 12 - Indicadores físicos e os vários tipos de esterilização	57
Tabela 13 - Indicadores biológicos e respectivo método de esterilização.....	60

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AIM - Autorização Introdução ao Mercado

AINEs - Anti-inflamatórios não esteróides

BPF - Boas Práticas de Fabrico

EM - Edema Macular

EMA - European Medicines Agency

EMC - Edema Macular Cistóide

EMD - Edema Macular Diabético

EP - European Pharmacopeia

FDA - Food and Drug Administration

FP IX - Farmacopeia Portuguesa IX

GMP - Good Manufacturing Practice

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamentos e Produtos de Saúde, I.P.

ISO - International Organization for Standardization

PIO - Pressão intra-ocular

PLGA - Poli(di-lactido-co-glicolido)

SAL - Sterility Assurance Level

USP - United States Pharmacopeia

1. Introdução

O olho é um órgão muito importante para o ser humano, sendo o principal responsável pela recepção e transmissão de informação para o cérebro (Kolb, 2007).

A nível global, os problemas de visão e de cegueira afectam cerca de 285 milhões de pessoas, onde 65% possuem problemas de visão e 82% apresentam cegueira, em indivíduos com idade superior a 50 anos (Zetterberg, 2015).

As patologias oculares podem não só serem causadas por infecções como também por lesões traumáticas (Figueira, Torrão, Dinis, & Palmares, 2010). As infecções por vezes ocorrem sem existir nenhuma evidência sistémica, podendo existir infecções visíveis a olho nu e ter-se um número normal de leucócitos (Durand, 2015). Nota-se que as infecções associadas aos cuidados de saúde são um factor importante de morbilidade e de mortalidade na actualidade, podendo ser causadas por bactérias, fungos ou vírus e ser tratadas com fármacos (Rutala & Weber, 2013).

Os fármacos utilizados no tratamento de patologias oculares devem apresentar-se estéreis. A esterilização é um processo físico ou químico que elimina todas as formas de vida microbiana, vírus ou mesmo esporos em qualquer material, superfícies ou medicamentos. Os métodos de esterilização mais comuns são a esterilização por calor húmido, calor seco, filtração, radiação e química (Shintani, 2011; Zajko & Klimant, 2013). Considera-se um produto estéril quando a probabilidade de existência de uma unidade não estéril no produto é de 10^{-6} , ou seja o processo de esterilização consegue reduzir uma população microbiana equivalente a um milhão, aproximando-se do valor pretendido que é zero (Allison, 1999; Isaacson, 2009).

O objectivo da utilização de um processo de esterilização é reduzir a carga microbiana num produto, para que este seja considerado um produto estéril, sem danificar a estabilidade do produto. O método de esterilização a utilizar deverá ser escolhido de acordo com a natureza e propriedades do produto para que o mesmo seja esterilizado em segurança (Parsons, 2012; Kazakis, Tsirliganis, & Kitis, 2015).

2. O olho e suas patologias

2.1 Aspectos gerais sobre a anatomia e fisiologia do olho.

O olho é um órgão muito importante para o nosso corpo. Cerca de 80% de toda a informação que o cérebro recebe vem do olho. O globo ocular é uma esfera ligeiramente assimétrica com cerca de 2,5 cm de diâmetro e um volume de cerca 6,5 cm³ (Kolb, 2007; E.Y.K. , Tan, Acharya, & Suri, 2012).

O globo ocular, figura 1, compreende três camadas ou túnicas: a camada externa ou túnica fibrosa, camada intermédia ou túnica coróideia e a camada interna ou túnica nervosa. Além das camadas ou túnicas, o globo ocular possui também dois compartimentos: um maior posterior ao cristalino e um mais pequeno, anterior ao cristalino, contendo o humor vítreo e o humor aquoso respectivamente (Seeley, Stephens, & Tate, 2011).

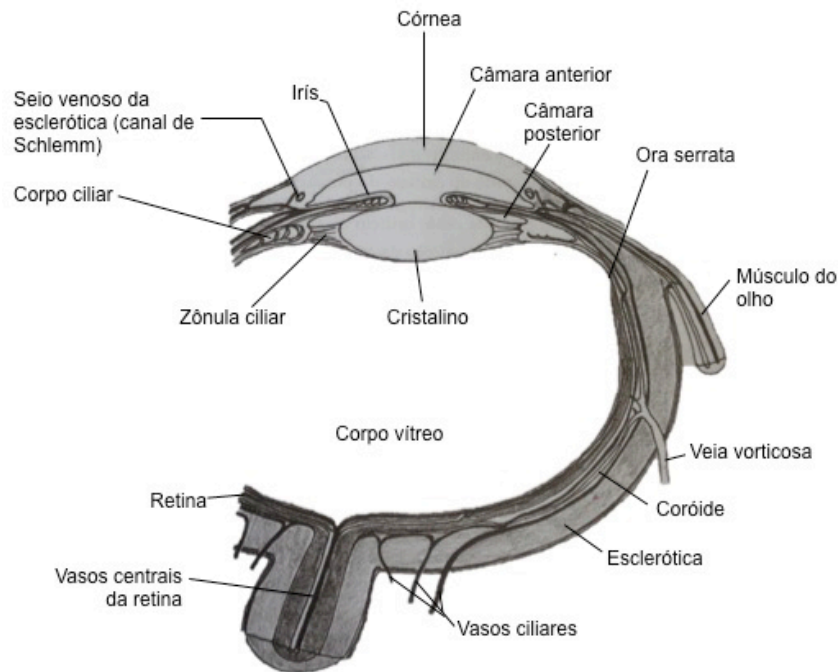


Figura 1. Globo ocular, corte horizontal (Santos, et al., 2011)

A camada externa ou esclerótica é constituída pela córnea e esclera. A córnea possui como função refractar e transmitir a luz para a lente ocular e para a retina, também sendo uma barreira protectora das partes mais profundas do olho e de agentes infecciosos (Willoughby, Ponzin, Ferrari, Lobo, Landau, & Omidi, 2010). A esclera forma uma camada de tecido conjuntivo opaco branco, sendo esta visível. Actua como revestimento de protecção exterior e interior do olho, mantendo a sua forma (Willoughby et al., 2010; E.Y.K et al., 2012).

A camada intermédia é dividida em duas partes, a anterior (íris e corpo ciliar) e posterior (coróide). A íris, situa-se na porção mais interna da coróide e é bastante irrigada. É a zona pigmentada do olho, sendo variável a sua pigmentação conforme a genética do indivíduo. Regula a quantidade de luz que é recebida no olho através da dilatação da pupila. O corpo ciliar situa-se na zona anterior da coróide, acompanha a coróideia e na sua zona de circunferência maior é o local onde se insere a íris. O corpo ciliar actua no controlo da potência e da forma da lente, e é o local de produção do humor aquoso. A coróide é uma camada vascular fina, extremamente vascularizada e também pigmentada. Situa-se entre a retina e a esclerótica, fornecendo oxigénio e nutrientes para as camadas exteriores da retina (Willoughby et al., 2010; Santos, et al., 2011; Seeley et al., 2011).

A camada interna do globo ocular compreende a retina e o cristalino. A retina é uma estrutura complexa sendo a parte sensorial do olho, pois é nela que se encontra o nervo óptico. A retina é constituída por dois tipos de receptores de luz: os bastonetes e os cones. Os bastonetes são responsáveis pela visão nocturna, absorvem a luz branca e negra. Os cones são responsáveis pela visão de cores, absorvendo a luz mais forte. A retina transforma a luz captada em imagem, através da conversão da luz em impulsos nervosos (Santos, et al., 2011; Seeley et al., 2011; E.Y.K et al., 2012).

Como referido anteriormente, o maior compartimento posterior ao cristalino contém uma substância gelatinosa transparente, o humor vítreo sendo esta substância o conteúdo do corpo vítreo. A sua renovação é lenta comparada com a do humor aquoso, tendo na sua constituição mais de 95% de água (E.Y.K et al., 2012). Limitado pela retina, intervém no processo da refacção da luz no interior do olho, e ajuda a manter a pressão intra-ocular, contribuindo para manter a forma esférica do globo ocular, segurando o cristalino e a retina no seu lugar (Santos, et al., 2011; Seeley et al., 2011).

O compartimento menor, anterior ao cristalino, está dividido em duas câmaras, câmara anterior e câmara posterior, sendo estas completamente preenchidas pelo humor aquoso. A câmara posterior produz por processos ciliares o humor aquoso através de um filtrado de sangue. O humor aquoso fornece nutrientes e oxigénio à córnea e cristalino, região que não são vascularizados. O humor aquoso possui como principal função a regulação da manutenção da tensão intra-ocular sendo continuamente renovado através da sua remoção e produção. Um excesso de pressão intra-ocular, através de um aumento de produção de humor aquoso, pode conduzir a um quadro de hipertensão intra-ocular, nomeadamente a glaucoma (Santos, et al., 2011; Seeley et al., 2011; E.Y.K et al., 2012).

O cristalino ou lente, localiza-se atrás da pupila, é transparente e tem uma forma biconvexa, com maior convexidade na sua face posterior. Possui uma particularidade especial devido à sua cápsula elástica: podendo aumentar ou diminuir o seu diâmetro, contribuindo para a focagem de imagem e obtenção de uma imagem nítida. A opacificação do cristalino ou lente, designada por catarata, pode levar a cegueira (Santos, et al., 2011; Seeley et al., 2011; E.Y.K et al., 2012).

2.2 Patologia Oculares

Existem diversas patologias a nível do olho. Seguidamente serão descritas, dando particular ênfase à causa e desenvolvimento, algumas das patologias mais correntes, passíveis de ser tratadas com fármacos.

2.2.1 Blefarite

A blefarite decorrente de infecções ou alergias, é caracterizada pela inflamação das pálpebras, visão turva e sensação de corpo estranho. Tem uma elevada probabilidade de se tornar uma doença crónica quando não tratada na fase aguda (Marguerite & McDonald, 2009; Chiang, Lin, Tsai, Peng, Liao, & Sung, 2013).

Segundo o local de infecção, a blefarite pode ser classificada em blefarite anterior ou em blefarite posterior (Figura 2). Na tabela 1, descrevem-se as principais características de ambas.

Tabela 1 - Principais características da blefarite anterior (estafilocócica e seborreica) e da blefarite posterior (adaptado de Jackson, 2008; Chiang et al., 2013; Pflugfelder, Karpecki, & Perez, 2014)

Blefarite		
Posterior	Anterior	
	Estafilocócica	Seborreica
<ul style="list-style-type: none"> Exposição de vasos sanguíneos dilatados Desorganização das pestanas Deficiência lacrimal aquosa (frequente) Associado a rosácea Cicatrização e neovascularização da córnea 	<ul style="list-style-type: none"> Predominante na faixa etária adulta e jovem do sexo feminino Perda de cílios Deficiência lacrimal aquosa (frequente) Ulceração das pálpebras através dos cílios e cicatrizes nas pálpebras Alteração da córnea: erosões, infiltrações e neovascularização 	<ul style="list-style-type: none"> Faixa etária idosa, sem diferença no sexo Perda de cílios (rara) Deficiência lacrimal aquosa (frequente) Associada a dermatite seborreica e depósitos de gordura nas pálpebras Erosões epiteliais punctiformes inferiores

O tratamento das blefarites não infecciosas é geralmente sintomático e consiste na higiene das pálpebras, através da aplicação de compressas quentes durante 5 a 10 minutos nas pálpebras fechadas, para amolecer e remover as crostas e desobstruir o canal de secreção. Certas blefarites necessitam de tratamento através de medicamentos:

aplicação tópica ou de colírio de um antibiótico ou anti-inflamatório (Jackson, 2008; Pflugfelder et al., 2014).

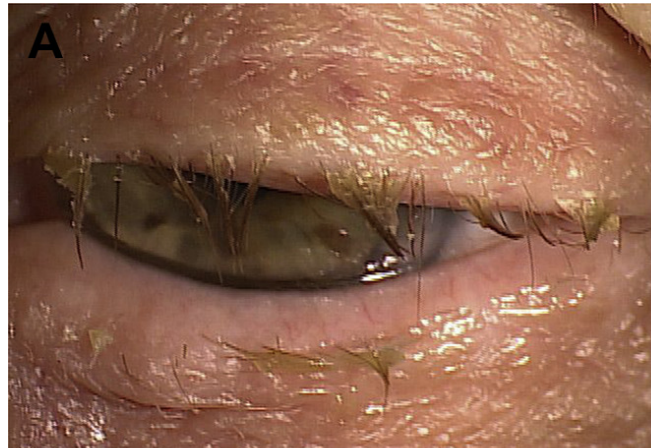


Figura 2. Blefarite anterior Estafilocócica (Pflugfelder et al., 2014)

2.2.2 Conjuntivite

A conjuntivite é caracterizada pela inflamação da conjuntiva, provocada por vírus e/ou bactérias. A época sazonal ou irritantes químicos também podem provocar a inflamação da conjuntiva. A conjuntivite caracteriza-se normalmente pelos olhos vermelhos e inflamados e por certo grau de desconforto (Senaratne & Gilbert, 2005; Pflugfelder et al., 2014).

Existem três principais tipos de etiologia da conjuntivite conforme se apresenta na tabela 2.

Tabela 2 - Características clínicas da conjuntivite viral, bacteriana e alérgica, e sua etiologia (adaptado de Ono & Abelson, 2005; Senaratne & Gilbert, 2005; Skevaki, Galani, Pararas, Giannopoulou, & Tsakris, 2011; Sheikh, Hurwitz, Schayck, McLean, & Nurmatov, 2012)

Conjuntivite		
	Etiologia	Características clínicas
Viral	Adenovirus; herpes simplex	<ul style="list-style-type: none"> • Corrimento ocular aquoso • Alta taxa de contágio • Edema da pálpebra • Sensação de areia nos olhos • Sintomas associados: constipação e tosse
Bacteriana	Pneumococo, estafilococos, <i>Haemophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Corrimento ocular mucopurulento • Auto-limitativa • Irritação ocular generalizada e difusa • Sensação de areia nos olhos

Alérgica	Sazonal ou perene	<ul style="list-style-type: none">• Corrimento ocular aquoso• Prurido• Edema da pálpebra• Inchaço da conjuntiva• Irritação ocular generalizada, mas mais intensa nos cantos dos olhos• Sintomas associados: Rinite, história de atopia.
----------	-------------------	--

O tratamento das conjuntivites varia conforme a sua etiologia e as suas manifestações clínicas. A conjuntivite viral geralmente reverte espontaneamente, sendo que o seu tratamento é sintomático através de medidas de higiene estritas, como a aplicação de compressas frias e lágrimas artificiais. Nalguns casos, pode ser necessário aplicar fármacos antivirais tópicos para certas estirpes de vírus, como o herpes simplex em que se aplica a pomada aciclovir. A conjuntivite bacteriana pode ser tratada com antibióticos de largo espectro, como o cloranfenicol ou tetraciclina sob a forma de colírios, apesar de os sintomas resolverem-se espontaneamente. Na conjuntivite alérgica (Figura 3), o tratamento é feito através de fármacos, para tratamento dos sintomas alérgicos como os anti-histamínicos orais e tópicos, inibidores da desgranulação dos mastócitos e anti-histamínicos vasoconstritores (Senaratne & Gilbert, 2005; Thanathanee & O'Brien, 2011; Bilkhu, Wolffsohn, & Naroo, 2012).

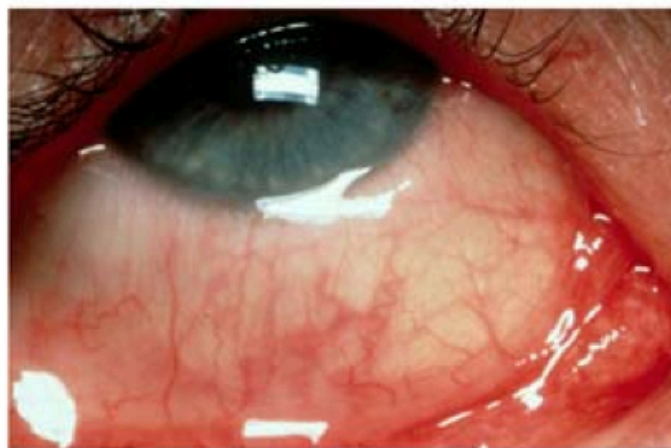


Figura 3. Exemplo de conjuntivite alérgica sazonal (Ono & Abelson, 2005)

2.2.3 Edema Macular

O edema macular (EM) é uma patologia multifactorial que afecta a retina, mais precisamente o compartimento intracelular e extracelular da retina neurosensorial. O EM é caracterizado pela acumulação de fluídos nos compartimentos, contendo água, proteínas e macromoléculas, que conduz ao aumento do volume das células de Müller da retina, responsáveis pela visão nítida do indivíduo (Tranos, Wickremasinghe, Stangos, Topouzis, Tsinopoulos, & Pavesio, 2004; Johnson, 2009). Na tabela 3 descreve-se de uma forma sucinta a etiologia e características das formas mais comuns de edema macular.

Tabela 3 - Etiologia e características das formas mais comuns de EM (adaptado de Tranos et al., 2004; Bhagat, Grigorian, Tutela, & Zarbin, 2009; Johnson, 2009)

Edema Macular	
Etiologia	Características
Edema Macular Diabético (EMD)	<ul style="list-style-type: none"> Retinopatia diabética é a causa mais comum de um indivíduo que possua diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2; <p>Manifestação focal ou difuso:</p> <ul style="list-style-type: none"> O focal é caracterizado pelo menor espessamento macular, libertação de microaneurismas, melhor acuidade visual e menor gravidade; Difuso é caracterizado pela libertação dos capilares que irão provocar edema, geralmente simétrico em ambos os olhos e de maior gravidade; <p>Tratamento</p> <ul style="list-style-type: none"> Inibidor da VEGF (proteína responsável pela dilatação dos vasos na presença de glicose) – Ranibizumabe
Edema Macular Cistóide (EMC)	<ul style="list-style-type: none"> Retinopatia venosa obstrutiva é formado através de quistos; <p>EMC pode ser desencadeado através de outras patologias oculares, como glaucoma, inflamação após cirurgias a cataratas, retinopatia diabética.</p> <p>Manifestação angiográfica ou clínica:</p> <ul style="list-style-type: none"> Angiográfica é a forma mais comum, não possui perda de visão; A forma clínica do EMC, o indivíduo possui perda de visão; <p>Tratamento:</p> <ul style="list-style-type: none"> AINEs (diclofenac); Corticosteróides (prednisolona); Inibidores da anidrase carbónica (acetazolamida)

2.2.4 Glaucoma

Antigamente, os oftalmologistas pensavam que o glaucoma e a elevada pressão intra-ocular eram sinónimos, mas estudos ao longo dos anos comprovaram que a elevada pressão intra-ocular (PIO) é um dos factores do glaucoma (Heijl, 2015). O glaucoma é uma neuropatia crónica, que provoca deficiências estruturais e funcionais num ou nos dois olhos, originando danos irreversíveis. A degeneração lenta e progressiva das células ganglionares da retina e dos axónios a nível do nervo óptico, tornam a patologia de difícil tratamento, actuando-se essencialmente na prevenção de danos maiores (Natu, Gaspar, Fontes Ribeiro, Cabrita, de Sousa, & Gil, 2011).

O glaucoma pode ser diferenciado em dois tipos, glaucoma de ângulo aberto e de ângulo fechado. O glaucoma de ângulo aberto é a forma mais frequente desta patologia. Sendo assintomático, progride de forma silenciosa até que o indivíduo perca a visão periférica, levando a cegueira. O aumento de pressão intra-ocular apesar de estar relacionado com o glaucoma, não é um critério determinante mas sim um factor que, conjuntamente com o aumento de stress gerado no nervo óptico e um aumento do fluxo sanguíneo, pode desencadear o glaucoma de ângulo aberto (Quigley, 2011).

Certos grupos de fármacos podem induzir ou potenciar o glaucoma de ângulo aberto como os corticosteróides oftálmicos ou sistémicos. No glaucoma de ângulo fechado, certos fármacos também podem induzir a patologia, como os anti-colinérgicos tópicos ou simpaticomiméticos tópicos (Schwartz & Budenz, 2004; Natu et al., 2011; Quigley, 2011).

O principal objectivo no tratamento do glaucoma de ângulo aberto é a redução da PIO para valores entre 20%-30% (Quigley, 2011). A redução/prevenção das manifestações clínicas do glaucoma pode ser feita através de cirurgia convencional, trabeculoplastia a laser ou aplicação de colírios. Existe um vasto número de fármacos disponível para a terapêutica do glaucoma, como os beta-bloqueadores, agonista alfa-2 selectivo, inibidor da anidrase carbónica, análogo das prostaglandinas ou associação de medicamentos (Brimonidina/Timolol).

2.2.5 Queratite

A queratite é uma patologia ocular com uma elevada incidência, causada por acção de bactérias ou vírus, que consiste numa inflamação da córnea, com eventual formação de úlceras oculares, cicatrização e neovascularização (Papadopoulos, Vrouva, Bafa, Paterakis, & Chounta, 2013).

O seu diagnóstico precoce é de elevada importância para evitar alguma perda de visão ou mesmo a cegueira. Um diagnóstico tardio poderá aumentar o risco de perfuração da córnea (Dart, Radford, Minassian, Verma, & Stapleton, 2008).

Conforme a sua etiologia, tabela 4, bacteriana ou viral, o tratamento difere. O tratamento da queratite bacteriana (Figura 4) é realizado através de antibioterapia conforme o seu microorganismo responsável (por exemplo: para o *Staphylococcus aureus* o antibiótico poderá ser a vancomicina) enquanto que na queratite viral em geral opta-se por um tratamento sintomático, como lágrimas artificiais, compressas ou mesmo antivíricos (por exemplo: para o herpes simplex o antivírico poderá ser ganciclovir) (Keay, et al., 2006; Croxtall, 2011).

Tabela 4 - Principais microorganismos da queratite bacteriana e viral (adaptado de Keay, et al., 2006; Croxtall, 2011)

Queratite		
	Bacteriana	Viral
Principais microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Corynebacterium spp</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Herpes simplex (HSV-1 e HSV-2) • Citomegalovirus (CMV) • Epstein-Barr vírus (EBV) • Varicela Zoster (VZV)

A queratite é muitas vezes desencadeada pelo uso de lentes de contacto, traumas oculares, cirurgia ocular anterior ou mesmo por fármacos, como os corticosteróides tópicos, tendo como manifestações clínicas a dor ocular, lacrimejo e a diminuição da visão (Keay, et al., 2006).

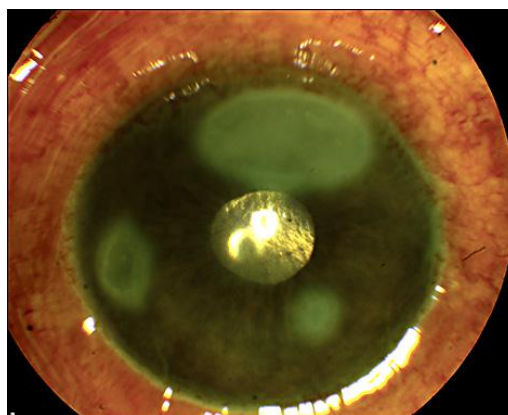


Figura 4. Queratite bacteriana, apresentando edema da córnea ligeiro e três úlceras de córnea com diferentes tamanhos (adaptado de Papadopoulos et al., 2013)

2.2.6 Uveíte

A uveíte é uma inflamação da úvea do olho. A uveíte pode ser diferenciada em uveíte anterior quando envolve a íris ou corpo ciliar, uveíte posterior quando afecta a coróide ou por extensão da inflamação à retina e uveíte intermédia quando a inflamação é limitada à retina periférica, corpo ciliar ou humor vítreo. A explicação da inflamação da úvea ainda é incerta não sendo completamente conhecida, mas sabe-se que existe factores predisponentes para provocar a patologia, que pode ser uma resposta auto-imune anormal (doença auto-imune), pode ser desencadeada através de lesões ou mesmo de infecções como a tuberculose. Os sintomas que a patologia provoca no indivíduo podem ser vermelhidão ocular, fotofobia ou fotosensibilidade, e visão turva. Um diagnóstico e tratamento tardio pode resultar em consequências mais graves como o edema macular ou mesmo glaucoma, podendo levar a perda de visão, por isso é de elevada importância um diagnóstico precoce e o seu respectivo tratamento. O tratamento da uveíte pode ser feito através de vários fármacos como os corticosteróides, antibióticos, anti-virais ou mesmo anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), sendo que estes apresentam vários efeitos secundários, e.g a diminuição das respostas imunitárias. A terapia de imunomodulação com corticosteróides é um tratamento cada vez mais utilizado nas doenças inflamatórias oculares devido aos poucos efeitos secundários que provoca a longo prazo (Munõz-Fernández & Martín-Mola, 2006; Srivastava, Rajappa, & Kaur, 2010; Tuli, Khuddus, & Tuli, 2010; Williams, Carnahan, & McPheeters, 2013).

2.2.7 Xeroftalmia

A xeroftalmia é uma patologia ocular, que é caracterizada pela deficiência ou redução da produção de lágrimas pelo o sistema ocular. Esta patologia é multifactorial, podendo ser desencadeada pela doença da glândula lacrimal (Síndrome de Sjogren), ou pela hipovitaminose da vitamina A. Em países em desenvolvimento a falta de vitamina A deve-se à escassez de certos alimentos contendo a vitamina, enquanto que nos países desenvolvidos está relacionada com problemas gastrointestinais. Os sintomas mais comuns da xeroftalmia são desconforto ocular, sensação de corpo estranho no globo ocular, xerose da conjuntiva, irritação ocular, fotofobia, visão turva, podendo mesmo envolver danos irreversíveis à superfície ocular (Figura 5). O tratamento da xeroftalmia tem como principal objectivo a lubrificação, recorrendo-se muitas vezes à aplicação de lágrimas artificiais e geles lubrificantes que vão diminuir a osmolaridade do filme

lacrimal, de modo a que se aproxime da normal (Sommer, 1998; Roncone, 2006; Gong, Sun, & Chapin, 2010; McLaughlin, Welch, MacDonald, Mantry, & Ramaesh, 2014).

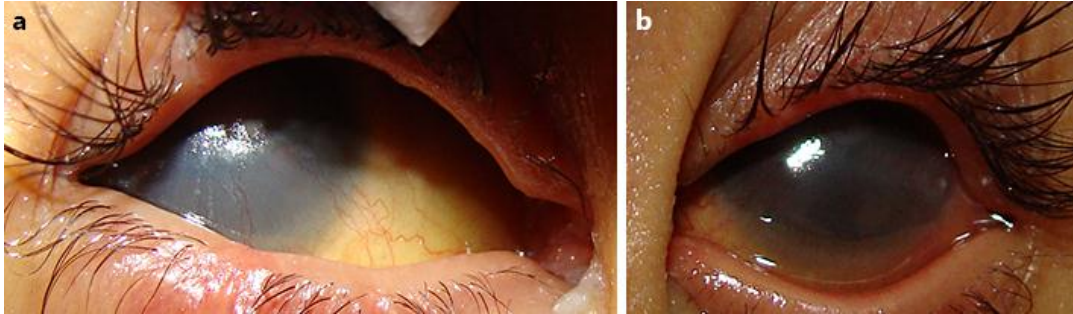


Figura 5. Manifestações bilaterais de xeroftalmia. (a) A córnea é opaca e revestida por uma membrana amniótica. (b) Irritação conjuntival e opacificação da córnea (adaptado de Moisseiev, Cohen, & Dotan, 2013)

3. Tratamentos de patologias oculares

3.1 Tipos de preparações oftálmicas

Os vários tipos de preparações oftálmicas podem apresentar-se como: colírios; soluções para lavagem oftálmica; pós para colírios e soluções de lavagem oftálmica; preparações oftálmicas semi-sólidas e insertos oftálmicos. Na tabela 5, são descritas as principais formas de apresentação e características dos diferentes tipos de preparações oftálmicas.

Tabela 5 - Preparações oftálmicas e suas respectivas características (adaptado de Farmacopeia Portuguesa IX, Monografias das formas farmacêuticas, 2008)

	Forma apresentação	Características
Colírios	<ul style="list-style-type: none"> Solução ou suspensão estéril; Aquosa ou oleada; 	<ul style="list-style-type: none"> Pode conter uma ou várias substâncias activas destinadas à aplicação de gota a gota no olho; Solução deve estar ausente de partículas e ser visivelmente límpida; Suspensão pode apresentar sedimentos de fácil dispersão;
Soluções para lavagem oftálmica	<ul style="list-style-type: none"> Solução aquosa estéril; 	<ul style="list-style-type: none"> Possuem como finalidade lavar ou banhar os olhos, ou impregnar compressas oculares; Solução deve estar ausente de partículas e ser visivelmente límpida; Os recipientes multidose não devem exceder os 200ml;
Pós para colírios ou soluções	<ul style="list-style-type: none"> Preparações secas estéreis; 	<ul style="list-style-type: none"> Dissolvem ou dispersam num líquido apropriado; Preparação satisfaz as exigências dos colírios ou soluções para lavagem oftálmica;
Preparações semi-sólidas	<ul style="list-style-type: none"> Pomadas; Cremes; Geles estéreis; 	<ul style="list-style-type: none"> Podem conter uma ou várias substâncias activas, dissolvidas ou dispersas num excipiente apropriado; O excipiente utilizado não deve ser irritante para a conjuntiva; São acondicionadas em tubos pequenos com cânulas, esterilizados e não devem exceder os 10g. Podem ser acondicionadas em recipientes unidose; Os tubos são de fecho inviolável, para impedir contaminação microbiana;
Insertos oftálmicos	<ul style="list-style-type: none"> Preparações sólidas; Preparações semi-sólidas; 	<ul style="list-style-type: none"> Aplicação no saco conjuntival, acção globo ocular; Reservatório de substância activa: Matriz ou membrana que controla o debito de libertação; Substância activa solúvel ou não, no liquido lacrimal;

Quando o acondicionamento das preparações oftálmicas é feito para várias doses, “multidose”, adiciona-se um conservante antimicrobiano. O prazo de utilização da preparação não deve ser superior a 4 semanas, a partir do momento da abertura do recipiente. No acondicionamento em “unidose” ou de dose múltipla, não se adiciona conservante, salvo justificação por parte do fabricante (Farmacopeia Portuguesa IX, Monografia das formas farmacêuticas, 2008).

Todas as preparações oftálmicas são obtidas através de produtos e métodos adequados, que assegurem a esterilidade e o impedimento de contaminantes que possam vir a danificar o produto. No processo de fabrico, as preparações que contenham partículas em dispersão, é necessário garantir medidas para que o tamanho das partículas seja apropriado para o uso previsto. No decorrer da produção destas, deve ser indicado que é possível retirar o conteúdo nominal das preparações oftálmicas líquidas ou semi-sólidas, aquelas que são acondicionados em recipientes unidose (Farmacopeia Portuguesa IX, Monografia das formas farmacêuticas, 2008).

3.2 Fármacos utilizados para o tratamento

Os fármacos utilizados para o tratamento de patologias oculares, variam conforme o microorganismo e a patologia em questão. Seguidamente na tabela 6 são descritas as patologias referidas no ponto 2.2 e alguns dos possíveis tratamentos através de fármacos.

Tabela 6 – Patologias e exemplos de fármacos (INFARMED, 2013)

Patologia	Nome comercial	Substância activa
Blefarite	• Clorocil®	• Cloranfenicol
	• Oftacilox®	• Ciprofloxacina
Conjuntivite	• Clorocil®	• Cloranfenicol
	• Ronic®	• Fosfato de dexametasona
Edema Macular	• Iluvien® (Edema macular diabético)	• Acetonido de fluocinolona
	• Lucentis® (Edema macular diabético)	• Ranibizumab
	• Voltaren® Colírio (Edema macular cistóide)	• Diclofenac sódico
Glaucoma	• Xalatan®	• Latanoprost
	• Dorzolamida®	• Dorzolamida
Queratite	• Clorocil®	• Cloranfenicol
Uveíte	• Ciclosporina®	• Ciclosporina
Xeroftalmia	• Visidic®	• Carbómero 980

4. Esterilização de fármacos

A esterilização das formas farmacêuticas para administração oftálmica constitui um passo essencial na sua produção e tem por objectivo garantir a ausência de microorganismos e pirogénios dos produtos, sem afectar a sua estabilidade. A presença de certos microorganismos nos produtos farmacêuticos pode conduzir à deterioração destes, devido a certas enzimas dos microorganismos que podem interagir com o fármaco ou excipiente originando reacções químicas que podem levar à sua degradação. Além disso, caso a esterilização não seja eficaz, a presença de microorganismos poderá ser nefasta para o consumidor. Conforme referido anteriormente, certas preparações oftálmicas, como as de multidoses, necessitam de um conservante antimicrobiano para impedir o crescimento dos microorganismos, devido à facilidade do consumidor 'acidentalmente' contaminar o produto na sua utilização, apesar de na produção estar garantida a sua esterilidade (Amin, Chauhan, Dare, & Bansal, 2010).

A selecção dos processos de esterilização mais adequados depende de vários factores, como a natureza do produto e seus excipientes, recipiente ou embalagem final, estabilidade química, as normas/directrizes e regulamentos a cumprir, sem esquecer os custos económicos implicados no processo pretendido (Shintani, 2011; Pinto, Kaneko, & Pinto, 2015). Existem vários métodos de esterilização. Na área de investigação e desenvolvimento de novos fármacos têm sido testados métodos convencionais bem como métodos inovadores. Com efeito, nem todos os fármacos conseguem manter a sua estabilidade após serem submetidos a certos processos de esterilização e é necessário identificar para cada produto qual ou quais os métodos mais adequados. Por exemplo, produtos da classe de fármacos glucocorticóides não podem ser sujeitos a temperaturas elevadas devido à sua sensibilidade ao calor, nem podem ser esterilizados por radiação em virtude de poderem ser degradadas (Zani, Veneziani, Bazzoni, Maggi, Caponetti, & Bettini, 2013).

Os processos de esterilização dividem-se em:

- Esterilização química, nos quais são utilizados gases ou líquidos como o óxido de etileno e o peróxido de hidrogénio,
- Esterilização física, onde se recorre por exemplo ao calor húmido ou seco, radiações ionizantes ou não ionizantes e a filtração esterilizante (Shintani, 2011).

Seguidamente são referidos alguns conceitos básicos relacionados com a esterilização, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. São também descritos e comparados os processos de esterilização mais usados pelos fabricantes, referindo-se as

particularidades de cada um, desde o mecanismo de eliminação/remoção da população microbiana, aos parâmetros do processo e sua aplicabilidade em produtos específicos.

4.1 Noções gerais de esterilização

As infecções associadas aos cuidados de saúde são um factor importante de morbidade e de mortalidade na actualidade. Embora se pense que a principal fonte de patógenos provenha da flora endógena do indivíduo, estima-se que cerca de 20% sejam adquiridos através do meio ambiente, e 20% a 40% é através de infecção cruzada, mais propriamente de mãos contaminadas (Rutala & Weber, 2013).

Inúmeros estudos foram realizados desde o século XIX, sugerindo que a melhor forma de evitar as infecções era prevenir, ou mesmo impedir que os microorganismos contactassem com as feridas e tecidos biológicos sensíveis expostos. À cerca de 50 anos, Earle Spaulding criou uma metodologia racional sobre a esterilização e desinfecção, que dividia os materiais em 3 categorias com base no grau de risco de infecção: os críticos (contacto com tecido estéril, o material necessita ser estéril), semicríticos (contacto com a membrana mucosa, o nível de desinfecção deve ser alto) e não críticos (contacto com a pele, requer um nível de desinfecção baixo) (Rutala & Weber, 2013).

A esterilização é um processo físico ou químico que elimina todas as formas de vida microbiana, vírus ou mesmo esporos em qualquer material, superfícies ou medicamentos. Não existe actualmente nenhum processo de esterilização capaz de satisfazer todos os critérios necessários aplicáveis a vários fins, como os cuidados de saúde, dispositivos, alimentos, materiais e medicamentos (Zajko & Klimant, 2013).

4.1.1 Esterilização, desinfecção e assepsia

Esterilização, desinfecção e assepsia são conceitos essenciais na área biomédica e farmacêutica.

A esterilidade corresponde à ausência de microorganismos vivos, bem como das suas formas germinativas (ovos, esporos e endosporos). Um produto esterilizado foi submetido a um processo de esterilização físico ou químico, que destrói todas as formas microbianas, existindo indicadores biológicos e físicos que garantem a eficácia do processo. Um produto é considerado estéril quando a probabilidade de existência de uma unidade não estéril no produto é de 10^{-6} (Allison, 1999). A aplicação de um método de esterilização, por vezes não é suficiente para garantir a esterilidade de um produto (McDonnell, 2007).

A desinfecção refere-se à redução do número de microorganismos viáveis, ou biocarga, através de um procedimento físico ou de agentes químicos, capazes de remover ou neutralizar a maioria dos microorganismos patogénicos, com a excepção dos esporos bacterianos e alguns microorganismos mais resistentes. Os desinfectantes podem ser subdivididos em três classes: de alto nível, intermédio e de baixo nível, dependendo da sua actuação. Os desinfectantes de alto nível são considerados eficazes contra a maioria dos microorganismos patogénicos, com a excepção de alguns esporos bacterianos. Os de nível intermédio são eficazes contra *mycobacteria*, bactérias vegetativas, e a maioria dos fungos e vírus que não sejam esporos. Finalmente, os desinfectantes de baixo nível são considerados eficazes contra a maioria das bactérias, vírus que possuam involucro e alguns fungos, mas não são eficazes contra a *mycobacteria* e esporos bacterianos. O aumento do tempo de exposição aos desinfectantes pode criar condições para que estes sejam esporicidas (McDonnell, 2007). A desinfecção normalmente aplica-se a materiais semicríticos e não críticos. Na tabela 7 são referidos alguns exemplos de desinfectantes (germicidas líquidos e gasosos) e o seu respectivo local de acção.

A assepsia é um conjunto de técnicas aplicadas para prevenir a contaminação por microorganismos. Ela permite manter um ser vivo ou um material isento de bactérias. Os antissépticos são produtos que destroem ou inibem microorganismos que estão em contacto com a pele ou mesmo com a mucosa. Os antissépticos não possuem o mesmo poder de actuação que os agentes de esterilização e não tem acção esporicida, no qual estes podem ser facilmente inactivados quando entram em contacto com certos tipos de matéria orgânica ou mesmo quando não são correctamente diluídos (Barroso, Meliço-

Silvestre, & Taveira, 2014). Na tabela 7 são dados alguns exemplos de agentes antimicrobiano e seu respectivo local de acção.

Tabela 7 - Exemplos de agentes antimicrobiano e respectiva utilização e local de acção (adaptado de Barroso et al., 2014)

Classe de composto	Utilização	Local de acção
Aldeídos	Esporicida	Parede celular, proteínas
Álcoois	Desinfectante, antisséptico de uso geral	Membrana citoplasmática, proteínas
Compostos de iodo	Antisséptico	Proteínas
Compostos com cloro	Esporicida	Parede celular, ácidos nucleicos
Compostos fenólicos	Desinfectante de uso geral	Membrana citoplasmática, proteínas, ADN
Ozono	Esporicida	Oxidação geral: lípidos, ADN, ribossomas
Peróxido de hidrogénio	Esporicida (vapor) e antisséptico (líquido)	Oxidação geral: lípidos, ADN, ribossomas
Bisguanidinas	Antisséptico	Membrana citoplasmática, proteínas
Ácido paracético	Esterilizante (vapor e líquido)	Oxidação geral: lípidos, ADN, ribossomas
Óxido de etileno	Esterilizante (vapor)	Oxidação geral, grupos amino, grupos tiol, grupos – SH (enzimas)
Compostos de amónio quaternário	Desinfectante, antisséptico de uso geral	Membrana celular
Lactonas	Esporicida	Oxidação geral

4.1.2 Parâmetros de cinética de morte microbiana

No processo de esterilização, os parâmetros mais comuns de cinética de morte microbiana são D, Z e F.

O valor D corresponde ao tempo que é necessário para que o número de indivíduos da população microbiana seja reduzido por um factor de 10 ou uma unidade logarítmica, podendo ser também designado como o tempo necessário para reduzir 90% da população microbiana inicial como se representa na figura 6. O valor D permite prever o número de microorganismos que sobrevivem após um determinado tempo num processo de esterilização. A equação seguinte permite calcular o valor D:

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N} \quad \text{Eq. (1)}$$

sendo t o tempo de exposição em min, N_0 a carga microbiana inicial e N a carga microbiana sobrevivente após tempo t (Van Doornmalen & Kopinga, 2009; Chotyakul, Velazquez, & Torres, 2011; Pinto et al., 2015).

O valor Z é definido como a temperatura que é necessária para reduzir o valor D de uma unidade logarítmica, podendo também expressar a resistência relativa de certos microorganismos a diferentes temperaturas. O valor Z , depende das características específicas dos microorganismos, bem como do agente de esterilização e condições do processo de esterilização. A equação seguinte permite calcular Z :

$$Z = \frac{T_1 - T_0}{\log D_0 - \log D_1} \quad E. q. (2)$$

sendo T_0 e T_1 os valores de temperatura (°C) inicial e final correspondentes ao valor D_0 e D_1 respectivamente (Van Doornmalen & Kopinga, 2009; Aulton & Taylor, 2013).

O valor F corresponde ao tempo necessário (min) à letalidade de um processo de esterilização a uma determinada temperatura T e um valor Z específico. A equação seguinte permite calcular o valor F :

$$F = \Delta t \sum 10^{(T_0 - T_1)/Z} \quad E. q. (3)$$

sendo Δt o intervalo de tempo entre medições de temperatura, T_0 o valor de temperatura da medição, T_1 a temperatura de referência e Z a taxa de inativação do microorganismo directamente relacionado com a temperatura utilizada, representado na figura 6 (Van Doornmalen & Kopinga, 2009).

Na autoclavagem, a temperatura é em geral 121°C, e o valor padrão de Z é 10°C. A equação seguinte representa a eficácia do processo de esterilização por calor húmido com uma temperatura constante desde o início do ciclo de esterilização até ao final do ciclo, sendo D_0 o valor do microorganismo em estudo, N_0 a população de microorganismos inicial e N_1 a população final (Van Doornmalen & Kopinga, 2009; Rodrigues, Luna, Henriques, & Costa, 2012).

$$F_0 = D_0 (\log N_0 - \log N_1) \quad E. q. (4)$$

A letalidade no processo de esterilização por calor húmido pode ser calculada através da temperatura instantânea no ciclo, como representa a equação 5, sendo Δt o intervalo

entre medições, T a temperatura de medição e 10 o valor padrão Z (Rodrigues et al., 2012).

$$F_0 = \Delta t \sum 10^{(T-121)/10} \quad E. q. (5)$$

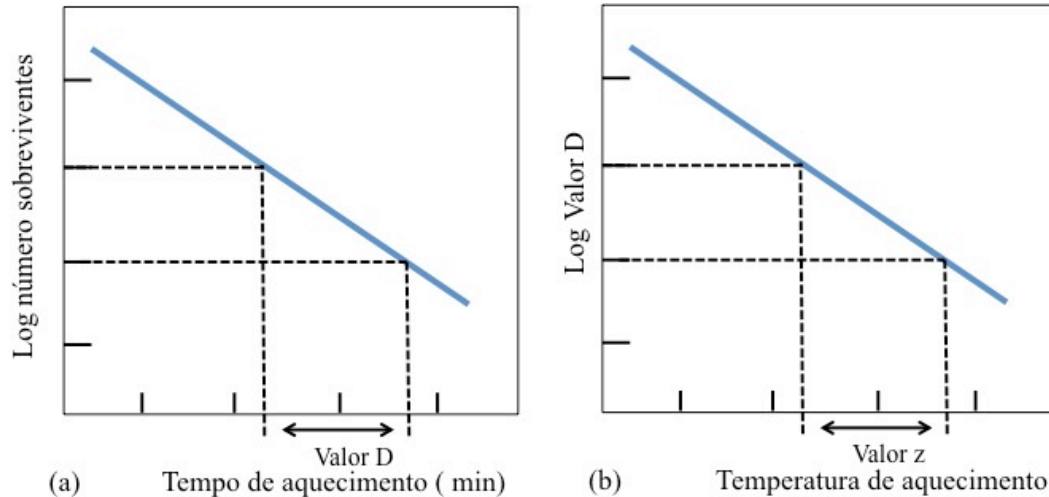


Figura 6. Curva de calor ideal na inativação de esporos bacterianos. (a) Declínio exponencial do número de sobreviventes durante o aquecimento a uma temperatura constante, expressa o valor D. (b) Declínio exponencial do valor D com o aumento de temperatura, designa o valor Z (adaptado de Fraise, Maillard, & Sattar, 2013)

4.1.3 Sterility Assurance Level – SAL

O conceito nível de segurança de esterilidade (SAL, em inglês Sterility Assurance Level), refere-se à probabilidade de um produto ser não estéril após submetido ao processo de esterilização, ou seja a probabilidade de existir um único microorganismo viável após o processo de esterilização. Por outras palavras, descreve a probabilidade de um processo de esterilização não ser capaz de eliminar todos os microorganismos presentes (Sandle, 2013).

A redução dos indicadores biológicos na população em logaritmos (10^{-1}) define o valor SAL do produto final. Cada redução de um logaritmo (10^{-1}) representa 90% de redução da população microbiana, sendo que um processo de esterilização deve alcançar uma redução de um logaritmo de -6 (10^{-6}), figura 7. Quando tal acontece, o processo consegue reduzir uma população microbiana equivalente a um milhão (10^6) chegando perto do valor teórico esperado que será 0 (Isaacson, 2009; Silva, 2011; Sandle, 2013).

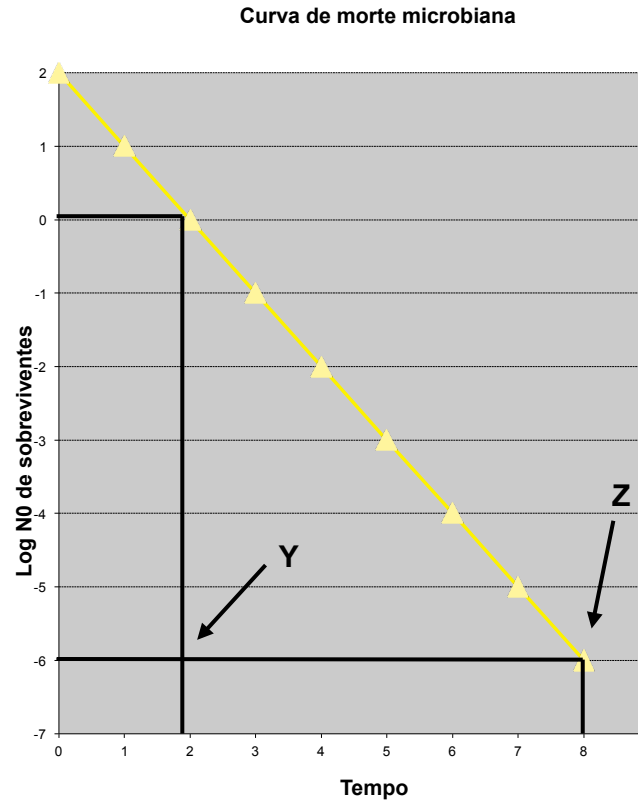


Figura 7. Para uma carga microbiana inicial de 10^2 o processo de esterilização terá de alcançar uma redução de 8 log em organismos viáveis. Isso exigirá uma diminuição de 8 vezes o valor D (por exemplo, se o organismo tem um valor D de 2 minutos, serão necessários $8 \times 2 = 16$ minutos para alcançar uma redução de 8 log e um SAL de 10^{-6}), que corresponde ao valor Z (adaptado de Isaacson, 2009)

4.2 Directrizes/ normas nacionais e internacionais para a esterilização de fármacos

A indústria farmacêutica é uma indústria altamente regulamentada, em que todas as actividades têm de obedecer a normas nacionais e internacionais. O controlo microbiológico é imprescindível para que os medicamentos sejam seguros para o doente, sendo constante o controlo de factores de contaminação em todo o processo de produção de medicamentos.

As normas e directrizes na indústria farmacêutica estão em constante actualização, e têm como objectivo informar, regulamentar e uniformizar todos os procedimentos e técnicas que sejam necessárias para a produção de medicamentos. As normas e directrizes, servem de guias (“*guidelines*”) para que as indústrias consigam obter um produto final em conformidade com o estipulado/legislado, que seja seguro, eficaz e de qualidade. As “*guidelines*” determinam não só requisitos a que o local de fabrico deve obedecer, *e.g.* as características das infra-estruturas, mas também procedimentos relativos ao processo de fabrico dos medicamentos, *e.g.* as técnicas que os operadores devem utilizar na produção, controlo de qualidade e prevenção da existência de contaminantes no produto.

Seguidamente referem-se as principais entidades e normas que regulamentam a esterilização de produtos farmacêuticos oftálmicos na Europa/Estados Unidos e Portugal.

4.2.1 Principais entidades reguladoras

4.2.1.1 EMA

A EMA – European Medicines Agency, é uma agência que possui como principal função a protecção e promoção da saúde pública e animal através da supervisão e avaliação de medicamentos. A agência trabalha em cooperação com varias autoridades nacionais dos 30 países da União Europeia. A Farmacopeia Europeia, a Organização Mundial da Saúde e conferencias trilaterais (UE, Japão e Estados Unidos da América), entre outras, contribuem para as actividades da EMA, visando sempre a protecção e segurança de saúde pública a nível europeu e mundial. (EMA, 2015)

Os novos pedidos de AIM - Autorização Introdução no Mercado, necessitam de ser avaliados cientificamente pela EMA, que será vigente em toda a União Europeia, designado por um processo centralizado, de modo a facilitar todo o processo apresentado assim um único pedido de AIM (EMA, 2015).

4.2.1.2 FDA

A autoridade regulamentar do medicamento nos Estados Unidos da América, FDA – U.S. Food and Drug Administration, pertence a uma agência governamental, a HHS – U.S. Department of Health & Human Services. A FDA é responsável pelo controlo de alimentos (animais e humanos), suplementos alimentares, medicamentos (uso veterinário e humano), cosméticos, derivados do sangue humano (e.g. plasma), equipamentos e dispositivos médicos (FDA, 2015).

A FDA, como principal entidade regulamentar da área nos EUA, possui os seus próprios guias de boas práticas de fabrico para a produção de medicamentos estéreis na indústria e seguidamente a aprovação dos medicamentos. Esta entidade elaborou as “guidelines” para a produção dos medicamentos estéreis com os dois tipos de processamento, a nível asséptico e por esterilização terminal. As boas práticas de fabrico elaborados pela FDA, regem-se pela USP – United States Pharmacopeia (FDA, 2015).

4.2.1.3 INFARMED

A autoridade regulamentar do medicamento em Portugal, o INFARMED- Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. rege-se pela principal referência para a produção de medicamentos na União Europeia, “EudraLex – Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) guidelines”. O documento referido anteriormente menciona os princípios e directrizes das Boas Práticas de Fabrico de medicamentos para uso humano e veterinário, vigentes na União Europeia. Estas directrizes são aquelas que os fabricantes devem seguir na produção de medicamentos, respeitando sempre os padrões de referência dos pedidos de autorização de fabrico bem como das inspecções.

As indústrias farmacêuticas que produzem medicamentos estéreis, e em particular as que produzem preparações oftálmicas, regem-se pelo “Anexo 1 – Fabrico de Medicamentos Estéreis” do “EudraLex – Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) guidelines”. Conforme descrito no ponto 83 do Anexo, todos os processos de esterilização necessitam de ser validados, devendo-se ter uma especial e redobrada atenção relativamente a métodos que não estejam patentes na Farmacopeia Portuguesa ou Europeia, ou quando se trata de soluções aquosas ou oleosas simples como por exemplo colírios ou soluções para lavagem oftálmica. O método preferencial para realizar a esterilização de medicamentos é, por defeito, a esterilização por calor. (Comissão Europeia, 2009)

Em 1992, o INFARMED publicou o ‘Guia para o bom fabrico de medicamentos’ (Portaria nº42/92, de 23 de Janeiro) que definia os princípios e directrizes que deviam ser usados no fabrico de medicamentos para uso humano. Na sequência da adopção da directiva nº91/356/CEE de 13 Junho de 1991 da Comissão das Comunidades Europeias, a portaria acima mencionada foi revogada por diversas vezes, sendo que a última alteração (Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 Agosto) designada por “Estatuto do Medicamento” marcou uma profunda mudança sobre o sector do medicamento, desde as áreas de produção, controlo de qualidade, segurança, eficácia e AIM, até à sua comercialização (Estatuto do Medicamento, 2006),

Além do INFARMED, é importante também referir o papel do Instituto Português da Qualidade, que estabelece e implementa normas da International Organization for Standardization (ISO), também seguidas pela indústria.

4.2.2 Farmacopeia

A produção de medicamentos na União Europeia, baseia-se na Farmacopeia Europeia, EP – European Pharmacopeia, e também na farmacopeia do respectivo país. Em Portugal, utiliza-se a Farmacopeia Portuguesa IX, a que se fará referência seguidamente. Nos Estados Unidos da América, o fabrico de medicamentos rege-se pela sua própria farmacopeia, USP – United States Pharmacopeia.

Farmacopeia Portuguesa IX

A Farmacopeia Portuguesa IX é baseada na Farmacopeia Europeia. Segundo a Farmacopeia Portuguesa IX (FP IX), no texto “monografia das formas farmacêuticas”, as preparações oftálmicas podem ser preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, estéreis, cuja finalidade é a aplicação no globo ocular, conjuntiva ou saco conjuntival. As várias preparações podem apresentar-se como: colírios; soluções para lavagem oftálmica; pós para colírios ou soluções para lavagem oftálmica; preparações oftálmicas semi-sólidas e insertos oftálmicos, conforme se referiu no ponto 3.1 (Farmacopeia IX, Monografia das formas farmacêuticas, 2008).

Segundo a FP IX (texto “métodos de preparação de produtos estéreis), as preparações oftálmicas são obtidas a partir de produtos e métodos que consigam garantir a sua esterilidade e impedir o crescimento de microorganismos que possam vir a contaminar as preparações aquando da sua produção.

Deverão tomar-se sempre elevadas precauções para evitar a contaminação microbiana, procurando utilizar-se matérias primas com baixo grau de contaminação. Quando utilizados produtos biológicos de origem animal ou humana nos processos de produção é necessário que exista uma validação que demonstre que o processo seja capaz de remover ou inactivar os componentes virais relevantes (Farmacopeia IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008). Se na formulação duma preparação oftálmica se utilizar um conservante antimicrobiano, este necessita de satisfazer as regras definidas pelas autoridades competentes, relativamente à eficácia do mesmo através de ensaios apropriados e critérios de avaliação do antimicrobiano (Farmacopeia IX, Monografia das formas farmacêuticas, 2008).

Na produção das preparações oftálmicas que contenham partículas dispersas na sua formulação é necessário garantir que o tamanho das partículas seja devidamente controlado e apropriado para o uso previsto (Farmacopeia IX, Monografia das formas farmacêuticas, 2008).

Segundo a FP IX, é essencial que o efeito do procedimento de esterilização no produto seja investigado, para assegurar a eficácia e integridade do mesmo, procedendo-se à sua validação, para à posteriori obter um produto adequado para a comercialização.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa IX, é sempre preferível que um produto seja esterilizado na sua embalagem final (esterilização terminal) pois tal elimina os riscos decorrentes de uma eventual contaminação do produto durante o processo de fabrico. A escolha do recipiente que seja conciliável com o tipo de esterilização é de elevada importância, dado que este pode afectar o produto na esterilização terminal. Se a esterilização terminal não for possível, deve-se recorrer a esterilização por filtração usando um filtro que retenha as bactérias, ou então recorre-se a técnica asséptica. Sempre que possível, deve-se aplicar um tratamento complementar (e.g. aquecimento) ao produto no seu recipiente final, para garantir a totalidade de ausência de microorganismos. Todos os produtos que sejam submetidos a métodos de esterilização terminal, podem ser libertados por libertação paramétrica, ou seja, a libertação de um lote esterilizado ocorre com base nos dados obtidos de produção, ao invés de uma amostra que tem que ser submetida a testes confirmatórios de esterilidade (Farmacopeia IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008).

4.2.3 Principais directrizes/normas reguladoras

4.2.3.1 Normas ISO

A International Organization for Standardization (ISO) é uma organização não governamental que desenvolve normas internacionais que garantem a qualidade, segurança e eficiência de produtos, serviços e sistemas. As normas ISO são recomendadas em todos os sectores, desde a tecnologia, segurança alimentar, e agricultura, à saúde. No sector da saúde, mais propriamente na produção de medicamentos estéreis, existem várias normas sobre os processos de esterilização que um produto deve obedecer (ISO, 2015)

A norma internacional ISO 14937:2009 - *Sterilization of health care products*, descreve os requisitos para a caracterização dos agentes de esterilização físicos ou químicos. A norma específica a forma de desenvolver, validar e implementar rotinas de controlo dos processos de esterilização. (ISO 14937, 2009).

A especificação técnica ISO/TS 11139:2006 fornece definições de termos relativos aos processos de esterilização. No entanto não refere quaisquer requisitos para a validação ou controlo de um processo de esterilização. (ISO/TS 11139, 2006)

Os vários métodos de esterilização são referidos em diferentes normas. Na tabela 8 são abordadas normas relativas ao método de esterilização por calor húmido, calor seco, filtração esterilizante, irradiação (radiação gama) e esterilização química (óxido etileno).

Tabela 8 - Normas ISO referentes aos vários métodos de esterilização. (adaptado de ISO/TC 198, 1990)

Método de Esterilização	Norma ISO	Título
Calor húmido (autoclave)	17665-1:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Calor húmido - Parte 1: Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	17665-2:2009	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Calor húmido - Parte 2: Orientações sobre a aplicação da ISO 17665-1
	11138-3:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Indicadores biológicos - Parte 3: Indicadores biológicos para os processos de esterilização por calor húmido
Calor seco	20857:2010	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Calor seco - Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11138-4:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Indicadores biológicos - Parte 4: Indicadores biológicos para os processos de esterilização por calor seco
Filtração esterilizante	13408-1:2008	Processamento asséptico de produtos de saúde - Parte 1: Requisitos gerais
	13408-2:2003	Processamento asséptico de produtos de saúde - Parte 2: Filtração
Radiação ionizante (irradiação)	11137-1:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Radiação - Parte 1: Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11137-2:2013	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Radiação - Parte 2: Estabelecer a dose de esterilização
	11137-3:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Radiação - Parte 3: Orientação sobre aspectos dosimétricos
Química (óxido de etileno)	11135:2014	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Óxido de etileno - Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11138-2:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde - Indicadores biológicos - Parte 2: Indicadores biológicos para os processos de esterilização por óxido de etileno

4.2.3.2 Boas Práticas de Fabrico

Embora a esterilização terminal seja muitas vezes o passo final no processo de produção de medicamentos, a observação das “Boas Práticas de Fabrico” (BPF) por parte das indústrias pode minimizar significativamente o grau de contaminação dos produtos e eventualmente originar produtos estéreis. As indústrias farmacêuticas ao observar as BPF, necessitam de respeitar e assegurar que possuem os seguintes requisitos: (Farmacopeia IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008)

- Pessoal qualificado com formação adequada, que respeite as normas;
- Instalações adequadas, de acordo com as normas;
- Equipamento de produção adequado, sendo planeado para assegurar uma fácil limpeza e esterilização;
- Precauções adequadas para garantir a carga microbiana mínima antes do processo de esterilização;
- Procedimentos validados para todas as etapas de produção críticos;
- Monitorização ambiental, bem como dos procedimentos;

As boas praticas de fabrico que regulam a produção de medicamentos na União Europeia, “EudraLex – Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) guidelines” mais propriamente o fabrico de medicamentos estéreis, “Anexo 1 – Fabrico de Medicamentos Estéreis” indicam que o fabrico de produtos estéreis pode ser conseguido se ocorrer em áreas limpas em que as entradas de pessoal, equipamento e materiais sejam efectuadas de forma pressurizada, mantendo sempre um nível de limpeza adequado e um ar sem partículas, afim de evitar a contaminação do produto fabricado.

Existem 4 tipos de classes para as salas de fabrico de medicamentos (tabela 9), conforme a EN ISO 14644-1. As várias classes diferenciam-se de acordo com as etapas do fabrico de produtos estéreis e o número máximo de partículas permitido por m³ e tamanho dessas partículas. (Comissão Europeia, 2009)

Tabela 9 - Número máximo permitido de partículas/m³ em função do tamanho (adaptado de ISO 14644,2008)

Classe	Em repouso		Em operação	
	≥ 0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Não definido	Não definido

Na produção de medicamentos utilizando técnicas assépticas, o manuseamento de matérias primas e componentes esterilizados ou não filtrados deve ocorrer numa sala de classe A com uma envolvente de classe B, salvo se os componentes forem depois sujeitos a uma esterilização ou uma filtração para eliminar os microorganismos presentes. A preparação de soluções que irão *a posteriori* ser esterilizadas por filtração deve ocorrer numa sala de classe C. (Comissão Europeia, 2009)

Os produtos que são submetidos a esterilização terminal, devem ser processados no mínimo num ambiente de classe D, sendo que o enchimento de produtos para esterilização terminal deve ocorrer no mínimo num ambiente de classe C. Se o produto apresentar um elevado risco de contaminação, deve utilizar-se um ambiente de classe A com uma envolvente de classe C no mínimo, a tabela 10 demonstra a relação da operação de fabrico com a respectiva classe.

Tabela 10 - Exemplo operações de fabrico de medicamentos estéreis (esterilização terminal) e sua respectiva classe (adaptado de Comissão Europeia, 2009).

Classe	Processo de fabrico
A	<ul style="list-style-type: none">• Enchimento de produtos com elevado risco de contaminação
C	<ul style="list-style-type: none">• Enchimento de produtos (classe mínima)• Preparação e enchimento de pomadas, cremes e suspensões, antes da esterilização terminal
D	<ul style="list-style-type: none">• Preparação de soluções e componentes para enchimento posterior

Conforme referido no subcapítulo 4.2.1.3 INFARMED, todos os processos de esterilização necessitam de ser validados. Antes do início do processo de esterilização, é obrigatório demonstrar através de medições físicas e indicadores biológicos, que o processo é adequado ao produto e que é eficaz conforme a carga processada. Os registos dos indicadores do processo de esterilização de um produto devem ser efectuados anualmente e sempre que o equipamento sofra alterações. (Comissão Europeia, 2009)

As boas práticas de fabrico recomendam a implementação de métodos que permitam distinguir claramente produtos esterilizados e não esterilizados, para que não exista contaminação cruzada. Os registos de esterilização para cada série devem ser aprovados, para que exista a libertação do lote e conseqüentemente para sua comercialização. (Comissão Europeia, 2009)

4.3 Tipos de esterilização

A selecção de um método de esterilização deve ter em conta a natureza do produto. Além disso, a forma de acondicionamento das preparações oftálmicas também influencia o método de esterilização escolhido. (Fraise et al., 2013).

Seguidamente serão abordados os principais métodos utilizados na esterilização de fármacos, dando particular ênfase ao processo e referindo alguns exemplos de fármacos para aplicações oftalmológicas que podem ou não ser esterilizados pelos referidos métodos.

4.3.1 Calor Húmido

A esterilização por calor é bastante utilizada na indústria farmacêutica, podendo ser feita de duas formas: calor húmido e calor seco.

O calor húmido pode ser produzido em autoclaves ou por esterilizadores a vapor, sendo que este método é o mais estudado no âmbito dos métodos de esterilização. Os produtos que sejam tolerantes ao calor normalmente são esterilizados por calor húmido, dado que este método se encontra entre os mais económicos, eficazes e confiáveis (Killeen & McCourt, 2012). A esterilização por calor húmido é o método recomendado para as soluções aquosas (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008). A esterilização por calor húmido é mais eficiente que com calor seco. Com efeito, com calor húmido é possível utilizar uma temperatura e tempo inferior à utilizada com calor seco. A difusão do vapor quente, (autoclave), é mais rápida e eficiente que o calor seco, (estufa ou forno) (Killeen & McCourt, 2012; Barroso et al., 2014).

A eficiência deve-se ao facto de, à medida que a água é aquecida, ser absorvida energia até se chegar ao ponto de ebulição, (calor latente). O calor latente corresponde à energia necessária para que ocorra o processo de transição de fase de líquido para gasoso. Como existe um elevado consumo de energia, o processo inverte-se originando condensação do gás, originando vapor saturado. Toda a energia despendida no processo, confere à esterilização por calor húmido um elevado rendimento (Rodrigues et al., 2012).

A esterilização por calor húmido, mais concretamente em autoclave, funciona habitualmente com as condições padrão, sendo a pressão relativa de 1 atmosfera (15 psi) e a temperatura de 121°C. Podem utilizar-se outros valores de temperatura, bem como de pressão relativa, em que o aumento de temperatura (e aumento de pressão) irá diminuir o tempo de esterilização, como é representado na tabela 11.

Tabela 11 - Relação ente pressão, tempo e temperatura no ciclo de esterilização de autoclave (adaptado de Denyer, Hodges, & Gorman, 2004)

Temperatura (°)	Tempo de esterilização (min)	Pressão (psi)
115	30	10
121	15	15
126	10	20
134	3	30

É reconhecido que o contacto directo do vapor saturado com o produto à uma temperatura de 121°C durante 10 min consegue eliminar a maioria das formas bacterianas e outros microorganismos. Contudo, o tempo de exposição do processo varia conforme a carga microbiana do produto ou o seu volume (Barroso et al., 2014). A figura 8 descreve as fases de um ciclo de esterilização por calor húmido, mais propriamente de autoclave (Najafpour, 2015).

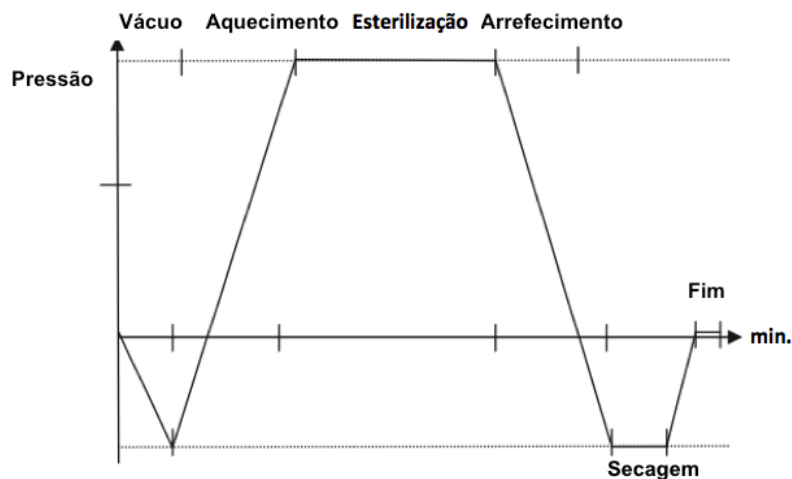


Figura 8. Fases do ciclo de esterilização na autoclave (adaptado de Najafpour, 2015)

O mecanismo de acção que leva à eliminação dos microorganismos no processo de esterilização por calor húmido, baseia-se no facto do vapor de água a uma temperatura elevada, conseguir desnaturar e coagular as proteínas celulares, destruindo pontes de hidrogénio, o que origina na disfuncionalidade das enzimas. A elevada temperatura aliada ao vapor de água, altera a estabilidade da membrana citoplasmática, provocando o efluxo dos constituintes celulares essenciais para o crescimento e sobrevivência dos microorganismos e bactérias. Assim, ocorrerá morte celular e não se observará crescimento dos microorganismos (Shintani, 2011; Barroso et al., 2014).

No processo de esterilização por calor húmido, podem utilizar-se diversas temperaturas na autoclave sem ser a das condições padrão, caso existam microorganismos resistentes ao calor húmido, a fim de garantir que estes sejam eliminados (figura 9).

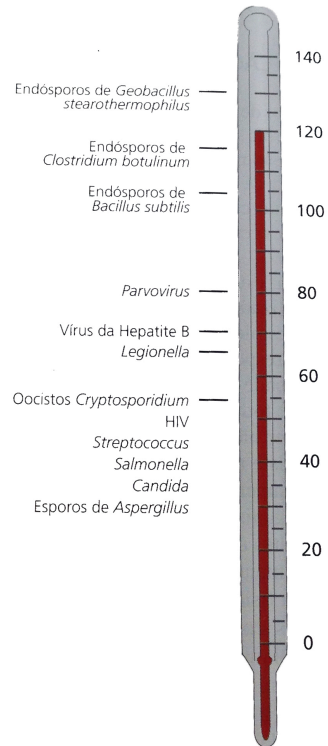


Figura 9. Temperaturas de esterilização correspondentes aos microorganismos resistentes ao calor húmido (adaptado de Barroso et al., 2014)

A esterilização por calor húmido pode influenciar a actividade do produto. Por exemplo, ao esterilizar-se uma solução de diclofenac de sódio a altas temperaturas, por autoclavagem, pode influenciar-se na acção terapêutica deste anti-inflamatório devido à alteração de certas características físico-químicas, como o pH. Apesar dessa modificação, é seguro administrar o diclofenac de sódio. A vantagem decorre de poder esterilizar em larga escala (Asasutjarit, Thanasanchokpibull, Fuongfuchat, & Veeranondha, 2011).

Os corticosteróides (classe de fármacos a que pertence a dexametasona) podem ser esterilizados através de calor húmido. A adição de um gás, como o CO₂, permite criar condições não oxidativas dentro da autoclave. Assim, pode utilizar-se vapor saturado com CO₂, para esterilizar pó seco ou húmido deste tipo de fármaco (Zani et al., 2013).

4.3.2 Calor Seco

Ao longo dos séculos, o calor foi conhecido como um agente purificador e de limpeza. Um estudo realizado por William Henry em 1832, descobriu o efeito do calor sobre roupa contaminada por doentes com tifo e escarlatina. Colocou a roupa contaminada num recipiente equipado com uma válvula de segurança a uma temperatura superior a 100°C e concluiu no final do estudo que estas já não se encontravam contaminadas e podiam ser usadas novamente sem que se contraísse as doenças (Fraise et al., 2013).

A esterilização por calor seco é utilizado para esterilizar material de vidro, peças ou objectos metálicos, substâncias em pó, e outras substâncias que possam suportar elevadas temperaturas. A produção de calor seco para o processo de esterilização pode ser feita através de estufa ou forno tipo Pasteur (equipado com um termóstato e um dispositivo que assegura a circulação do ar no interior do forno) (Shintani, 2011; Barroso et al., 2014).

Como foi referido no ponto 4.3.1, a esterilização por calor húmido é mais eficaz que por calor seco. No entanto para certos produtos que possuam água em pequena percentagem na sua formulação e que não se deixem penetrar pela humidade, como a vaselina, óleos, gorduras sólidas ou líquidas e pós, o procedimento que em geral se adopta é a esterilização por calor seco. Na esterilização em estufa, o calor penetra mais lentamente que o calor húmido, por isso é necessário utilizar temperaturas mais elevadas e tempos mais prolongados (Barroso et al., 2014). A esterilização por calor seco, funciona habitualmente com as condições padrão de temperatura de 160°C e um tempo mínimo de 2 horas. As combinações de temperatura e tempo para o processo de esterilização podem variar, desde que se assegure uma taxa de letalidade adequada (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008).

A esterilização por calor seco elimina/inactiva as células através de incineração. O mecanismo de actuação do calor envolve um processo oxidativo dos microorganismos, onde os componentes celulares são destruídos/inactivados devido às elevadas temperaturas a que são submetidos. Embora muitas toxinas bacterianas e fúngicas sejam inactivadas a certas temperaturas, as endotoxinas bacterianas necessitam de temperaturas mais elevadas para que sejam definitivamente eliminadas (Shintani, 2011; Barroso et al., 2014).

4.3.3 Filtração

A filtração é utilizada quando certas substâncias activas ou produtos não podem ser submetidas a um processo de esterilização terminal mais agressivo. O processo de esterilização por filtração é aplicada a líquidos, gases termolábeis ou mesmo o ar atmosférico. Utilizam-se filtros que são capazes de reter os microorganismos aquando da sua passagem (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Barroso et al, 2014).

Na filtração não ocorre destruição dos microorganismos quando passam no filtro, em contraste com os outros métodos de esterilização que envolvem a eliminação dos microorganismos. O mecanismo de acção do processo de filtração baseia-se na eliminação física dos microorganismos, retendo-se e removendo-se todos os microorganismos que não passam no filtro. Não existe nenhuma classificação ao nível de segurança de esterilidade para este processo, dado que não se consegue calcular o valor (Shintani, 2011).

O processo de esterilização por filtração é utilizado frequentemente em laboratórios farmacêuticos ou hospitais, em produtos, nomeadamente soluções que são facilmente alteráveis pelo calor, como as vitaminas, soro, plasma ou soluções proteicas (Barroso et al., 2014).

As soluções são filtradas por uma membrana antibacteriana com uma porosidade nominal inferior ou igual a 0,22 μm , que assegura a eliminação dos microorganismos, com dimensões maiores. Actualmente através da técnica de microfiltração, podem ser removidas partículas até 0,05 μm , que corresponde ao tamanho de vários microorganismos ou mesmo vírus (Barroso et al., 2014).

O filtro não deve ser reutilizado durante um espaço de tempo superior àquele que foi definido aquando da sua validação, devido ao risco de libertação do contaminante. Em determinados casos, e para minimizar o risco de contaminação, realiza-se uma pré-filtração com um filtro antibacteriano (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008).

A glicerina, bastante utilizada nas formulações farmacêuticas como excipiente nos fármacos para administração via oral, tópica, preparações parentéricas e oftálmicas é muitas vezes esterilizada por filtração. Com efeito, conforme a finalidade da glicerina, algumas preparações necessitam de serem estéreis, por exemplo nos fármacos para administração oftálmica. As propriedades físicas da glicerina, como a elevada viscosidade e o teor mínimo em água, limitam os vários processos de esterilização. A

esterilização por calor húmido não é adequada para esterilizar a glicerina, devido ao teor mínimo de água. O método por esterilização química não é adequado devido aos resíduos de substâncias que advém do método, podendo comprometer a pureza da glicerina. A radiação ionizante, também é preterida devido às instalações especiais que necessita e outros factores limitativos, como o custo. Deste modo, a filtração esterilizante e o calor seco são os métodos adequados para esterilizar o excipiente em questão. A esterilização por calor seco, como referido anteriormente, envolve um forno de alta temperatura que destrói os microorganismos, sem que altere a composição dos produtos devido à não utilização de vapor saturado. A esterilização por filtração é preferível ao calor seco, devido às condições que são precisas para o processos, e às necessidades de validação. Na esterilização por filtração, o caudal da solução que atravessa o filtro, é afectado pela resistência do filtro, a viscosidade da solução ou a pressão do processo. Como a glicerina possui uma elevada viscosidade, a taxa de fluxo pode ser aumentada para atravessar mais rapidamente no filtro, aumentando a área da superfície do filtro ou aumentando o diferencial de pressão através do filtro (McCluskey, 2008).

4.3.4 Radiação ionizante (gama - γ)

A esterilização por radiação pode envolver radiação ionizante (raios γ e raios X) e radiação não ionizante (raios ultravioletas).

A radiação mais utilizada pela indústria farmacêutica é a radiação ionizante por raios γ , que é emitida por isótopos radioactivos como o cobalto-60 (^{60}Co) ou feixes de electrões de alta velocidade (e-electrões). A radiação é produzida por aceleradores de partículas, e constitui uma alternativa aos outros tipos de esterilização, quando os produtos são sensíveis ao calor, já que a esterilização por radiação utiliza tipicamente temperaturas entre 4-5°C. A dose padrão de radiação que se utiliza para este método é de 25 kGy, sendo que se podem utilizar outros valores desde que seja assegurada um NSE de 10^{-6} (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Fraise et al., 2013). As moléculas orgânicas de grande tamanho, como por exemplo o ADN (ácido desoxirribonucleico), demonstram ser sensíveis a radiação ionizante. Os raios γ possuem um efeito microbicida, uma vez que a estrutura do ADN é afectado pela radiação, bem como as proteínas celulares e outros constituintes das células. Estas mutações provocam a inviabilidade dos microorganismos. Os raios γ , podem provocar

também efeitos indirectos nas reacções de ionização e da água (radical de peróxido e hidroxilo) (Shintani, 2011).

As principais vantagens do método são: ser de alta segurança, libertação paramétrica dos produtos tratados, permitir o uso imediato dos mesmos, não existir mais ensaios de qualidade sem ser os de validação biológica, permitir esterilizar simultaneamente um volume elevado de produtos, ocorrer a uma temperatura baixa e permitir esterilizar o interior das embalagens e produtos farmacêuticos (Fraise et al., 2013).

O aciclovir revestido por microesferas, PLGA - Poli(di-lactido-co-glicolido), para tratar certas patologias oculares, pode ser esterilizado por radiação ionizante, mais propriamente radiação gama γ . As condições padrão de esterilização, demonstram que o fármaco não altera a sua eficácia e que as características das microesferas se mantêm intactas. A esterilização por calor húmido ou seco, não é adequado para microesferas, como o PLGA, por alterarem a composição química e física do polímero (Sancho, Vanrell, & Negro, 2004).

Em muitos polímeros (biodegradáveis ou não), mais propriamente nos hidrogéis, o método de esterilização por radiação ionizante não influencia a estrutura e propriedades dos polímeros. Contrariamente, o calor seco degrada a nível físico e químico o polímero, o que constitui um entrave à preparação das formas farmacêuticas para o tratamento de patologias oculares (Khutoryanskiy, 2015).

4.3.5 Química (óxido de etileno)

A esterilização por óxido de etileno deve ser apenas utilizada em último recurso, devido aos efeitos nocivos que o produto possa sofrer durante o processo e ao vestígio do gás residual que o mesmo ainda pode conter, podendo transformar-se e provocar efeitos tóxicos no organismo (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008).

Embora se recomende que a esterilização química apenas seja utilizada em último recurso, cerca de 50% do mercado industrial utiliza o método como esterilização terminal, com o óxido de etileno como o gás preferencial para este tipo de esterilização (Lambert, Mendelson, & Craven, 2011).

O método de esterilização por óxido de etileno é utilizado quando os produtos são sensíveis a temperaturas superiores a 60°C ou sensíveis a radiação. A esterilização é geralmente praticada a uma temperatura entre os 30°C e 60°C, com um humidade relativa superior a 60%, uma concentração de gás entre 200 e 800 mg/L e com uma

duração de pelo menos 3 horas, sendo estes valores variáveis, conforme as características dos produtos a serem esterilizados. No processo de esterilização, é necessário determinar e registar a humidade, o gás (óxido de etileno), a temperatura e o tempo de exposição (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Hsiao, Liu, Ueng, & Chan, 2012).

O processo de esterilização por óxido de etileno é normalmente dividido nas seguintes fases (Pinto et al., 2015):

- Pré-acondicionamento
- Acondicionamento,
- Exposição ao óxido de etileno,
- Lavagem do produto
- Ventilação final

O mecanismo de acção do processo de esterilização química, envolve a interacção do óxido de etileno com os componentes celulares e as macromoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas/enzimas. O óxido de etileno é um agente alquilante (transferência de um grupo alquilo de uma molécula para outra molécula), que reage com os componentes celulares e as macromoléculas constituintes dos microorganismos, eliminando-os. A sua eficácia é elevada, relativamente a esporos bacterianos, vírus, bactérias e fungos. Os grupos funcionais das macromoléculas, carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfidrílo (-SH) e grupo amino (-NH₂), são de elevada importância na estrutura e função da proteína, sendo que a actuação do óxido de etileno sobre estes grupos irá perturbar a sua actividade e conseqüentemente, se a proteína for essencial para a replicação celular, irá originar a morte celular, e conseqüentemente a eliminação do microorganismo (Shintani, 2011). Apesar do processo ser de elevada eficácia, é recomendado que a utilização do óxido de etileno só ocorra em condições estritamente necessárias, devido ao potencial efeito de carcinogenicidade genotóxica do gás (Hsiao et al, 2012).

A título de exemplo, refira-se que para esterilizar insertos oftálmicos, o processo mais adequado de todos os já referidos, é a esterilização química com gás de óxido de etileno. Este método mantém as propriedades dos insertos, não deformando o material, quando, em contra partida, a autoclavagem, devido às altas temperaturas altera o inserto (Kozakiewicz, 2014).

4.4 Validação da esterilização

O processo de esterilização não é directamente mensurável. Para confirmar se o produto ficou realmente estéril (validar a esterilidade), existem diversas técnicas que podem ser aplicadas (Doornmalen & Kopinga, 2008). A validação da eficácia da esterilização pode ser feita por indicadores físicos, químicos e biológicos (Sandle, 2013).

Segundo a FP IX e as boas práticas de fabrico que regulam a produção de medicamentos na União Europeia, “EudraLex – Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) guidelines”, mais propriamente o fabrico de medicamentos estéreis, “Anexo 1 – Fabrico de Medicamentos Estéreis”, os indicadores físicos para os vários tipos de esterilização são os descritos na tabela 12.

Tabela 12 - Indicadores físicos e os vários tipos de esterilização (adaptado de Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Comissão Europeia, 2009).

Tipo de esterilização	Indicador físico
Calor húmido	<ul style="list-style-type: none"> • Medição de temperatura e pressão em cada ciclo (sonda); • Colocação de sonda em recipientes representativos no local mais frio da câmara;
Calor seco	<ul style="list-style-type: none"> • Medição de temperatura em cada ciclo (sonda); • Colocação de sonda em recipientes representativos no local mais frio da câmara;
Filtração	<ul style="list-style-type: none"> • Integridade do filtro antes e após sua utilização (ponto de bolha, taxa de difusão ou teste manutenção de pressão);
Radiação	<ul style="list-style-type: none"> • Indicador dosimétrico que absorva radiação; • Se for um indicador dosimétrico de plástico (perspex);
Química (óxido de etileno)	<ul style="list-style-type: none"> • Medição de temperatura e pressão em cada ciclo; • Concentração de gás, humidade, tempo de esterilização;

Nos indicadores químicos utiliza-se um ou mais produtos químicos que sofrem uma alteração física ou química, mudando em geral a cor para ser visível a olho humano (Ames, 2014). A ISO 11140-1:2014 fornece especificações sobre os requisitos e métodos de ensaio a utilizar para proceder à validação da esterilização por indicadores químicos. Os indicadores químicos não fornecem informação sobre a presença ou ausência de algum microorganismo vivo no produto, mas sim se o produto foi devidamente esterilizado (ISO 11140,2014). Os indicadores químicos podem ser divididos em dois grupos: tiras de ensaio para soluções ou mesmo indicadores

químicos. As tiras são utilizadas em processos de esterilização química no qual os produtos a esterilizar são líquidos. As tiras permitem verificar se o esterilizante químico está acima ou abaixo da concentração eficaz para esterilizar. A formulação da tira, ao reagir com o esterilizante químico, originará uma mudança de cor. A mudança de cor, bem como o tempo da interação da tira com o esterilizante, varia conforme o tipo de tira e a solução em processamento, como é representado na figura 10.

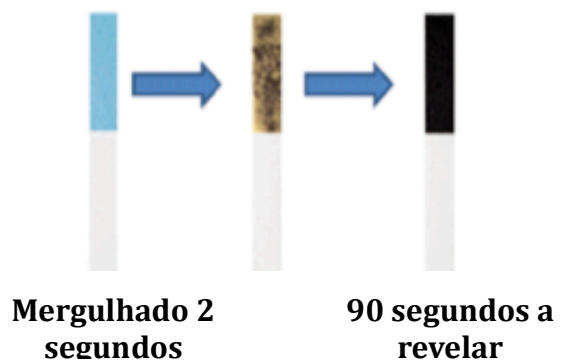


Figura 10 - Exemplo de uma tira de solução de ensaio, mudança de cor (adaptado de Ames, 2014)

O segundo grupo de indicadores químicos referido, é utilizado frequentemente em ensaios de controlo de qualidade dos processos de esterilização baseados em vapor/gás como o óxido de etileno. Basicamente consistem numa fita, que é colocada na parte externa da embalagem quando está dentro da câmara. testes de remoção de ar para verificar se existe alguma fuga, nomeadamente esterilizadores que funcionam com vapores. Existem outros tipos de indicadores químicos, como o de Bowie-Dick, que é um teste específico para remoção de ar no processos de esterilização a vapor (figura 11) (Ames, 2014).

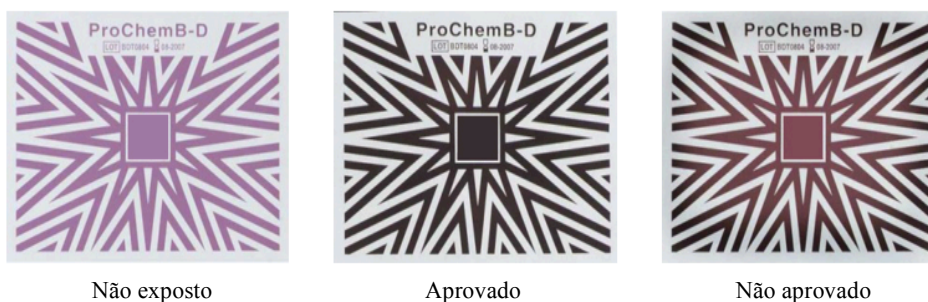


Figura 11. Teste de Bowie-Dick (adaptado de Mesa Laboratories, 2014)

A FP IX bem como a USP exigem o uso de indicadores biológicos para validar os diferentes processos de esterilização nomeadamente calor húmido, calor seco, radiação e química (óxido de etileno) (Sandle, 2013).

Segundo a FP IX, os indicadores biológicos são preparações aferidas de microrganismos previamente seleccionados, que possuem como finalidade avaliar a eficácia de um processo de esterilização (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008). Os microorganismos são seleccionados conforme os critérios pré-estabelecidos, não devendo ser patogénicos. Devem ser de fácil cultura e devem ter uma resistência acima da média ao processo de esterilização escolhido (Sandle, 2013).

Os indicadores biológicos são tipicamente preparações de esporos bacterianos que são apresentadas em diversas formas, como esporos em discos, suspensão em água ou meio de cultura, esporos numa tira de papel, tubos de ensaio ou ampolas. As várias formas destas preparação devem ser devidamente embaladas para que fiquem protegidas de uma eventual contaminação ou alteração, permitindo que só no processo de esterilização, o agente esterilizante, entre em contacto com o indicador, neste caso o microorganismo (Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Sandle, 2013).

A norma ISO 11138-1:2006 fornece os requisitos gerais do indicadores biológicos, desde a sua produção até à monitorização da validação do processo de esterilização. Na tabela 13 referem-se as principais características de diversos indicadores biológicos, em conformidade com as referidas normas e consoante o tipo de esterilização.

A preparação dos indicadores biológicos implica um mínimo de população microbiana previamente definido pela farmacopeia, sempre superior a 1×10^5 , podendo variar conforme o tipo de aplicação. Este valor é usado para que exista um alcance da redução da população microbiana em valores 10^{-6} de acordo com o conceito de segurança de esterilidade. Para confirmar a redução da população, é normalmente feita uma contagem dos microorganismos e os critérios de aceitação não devem ser inferiores a 50% e nunca mais do que 300% da população inicial (Sandle, 2013).

Tabela 13 - Indicadores biológicos e respectivo método de esterilização (adaptado de Farmacopeia Portuguesa IX, Textos gerais sobre esterilidade, 2008; Sandle, 2013)

Método de Esterilização	Indicador biológico	População	Características
Calor húmido	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 5×10^5 	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição durante 6 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, os esporos mantêm-se revivificáveis; • Exposição durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, os microorganismos não se desenvolvem;
Calor seco	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus atrophaeus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 • 1×10^6 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperaturas superiores a 220°C eliminam pirogénios no material de vidro; • A temperatura superior a 220°C, se reduzir de 3 log de endotoxinas bacterianas resistentes, substitui um indicador biológico;
Radiação ionizante	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus pumilus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^7 	<ul style="list-style-type: none"> • Valor D necessita de ser superior a 1,9 kGy; • Os microorganismos não se desenvolvem a uma exposição de 25 kGy (dose mínima absorvida);
Química (óxido de etileno)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus atrophaeus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 5×10^5 • 5×10^5 	<ul style="list-style-type: none"> • Valor D superior 2,5 min por ciclo de esterilização de 600 mg/l de óxido de etileno à temperatura de 54°C com 60% de humidade relativa; • Após 60 min de ciclo, ausência de desenvolvimento de microorganismos;
Filtração	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas diminuta</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^7 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de produzir um filtrado estéril a partir de um indicador biológico; • Filtro com porosidade nominal inferior ou igual a $0,22 \mu\text{m}$;

5. Conclusão

O olho, sendo um órgão de elevada importância, necessita de um tratamento correcto sempre que é afectado por uma patologia. O tratamento das patologias oculares envolve muitas vezes a utilização de fármacos, que para evitar outras complicações, necessitam de serem estéreis. Evitar/eliminar contaminação dos fármacos é de extrema importância, devido ao desenvolvimento de microorganismos que podem influenciar o tratamento da patologia. Por exemplo, se um fármaco para o tratamento de uma conjuntivite viral, nomeadamente a substância activa ou excipiente, não for devidamente esterilizado na sua preparação e produção, a condição patológica do doente pode piorar.

A esterilização de fármacos para terapia ocular pode ser feita por diferentes métodos: esterilização por calor húmido, calor seco, filtração, radiação ionizante e esterilização química são os mais comuns.

Os processos de esterilização têm por objectivo garantir a ausência de microorganismos e pirogénios no produto, sem afectar a sua estabilidade. Utilizam-se indicadores biológicos para validar os processos de esterilização, confirmando se houve uma eliminação ou redução de microorganismos efectiva.

As principais entidades reguladoras do medicamento, estabelecem normas e regras conforme a legislação para aprovação de medicamentos, sendo o INFARMED a entidade principal reguladora do medicamento em Portugal. As BPF e a FP IX são de extrema importância na produção de medicamentos estéreis, nomeadamente as preparações oftálmicas.

As preparações oftálmicas para as várias patologias oculares apresentam-se sob diferentes formas (e.g. colírios, pó, inserto oftálmico ou preparações semi-sólidas), e contendo diferentes substância activas e excipientes. Esta variabilidade irá influenciar a escolha do processo de esterilização.

Os vários fármacos, devido às suas características químicas e físicas, não são passíveis de ser esterilizados através de um único processo de esterilização. O método recomendado por defeito pela FP IX, BFP e o INFARMED é esterilização por calor húmido (autoclave) devido à simplicidade do equipamento envolvido, possibilidade de esterilização de produtos em larga escala e facilidade do processo. De acordo com a literatura, a esterilização por calor húmido e química (óxido de etileno) encontram-se entre os métodos mais utilizados por parte da indústria farmacêutica. A esterilização por autoclave não é, no entanto aconselhável em produtos que possuam quantidades de água diminutas, como a glicerina, dado que pode influenciar as suas propriedades. Apesar de

ser um dos métodos mais utilizados pelas indústrias, ele é também desaconselhável no caso de fármacos termosensíveis, muitos com aplicação para terapia ocular.

A radiação ionizante apesar de não ser o método de eleição das entidades e normas reguladores, constitui uma alternativa bastante utilizada pelas indústrias farmacêuticas, visto ser um processo de alta segurança que permite esterilizar um elevado número de produtos.

A esterilização química, tem um elevado efeito tóxico nos produtos a esterilizar, sendo por isso o último processo de esterilização a ser escolhido apesar de ser bastante utilizado pelas indústrias.

Certas substâncias activas ou produtos que não podem ser esterilizadas por esterilização terminal, são esterilizadas por filtração.

Actualmente, a esterilização de fármacos para terapia ocular não possui muita literatura específica. Além disso as indústrias que produzem este tipo de fármacos/formulações não fornecerem dados relativos aos processos, em particular, não tornam público os métodos que utilizam para esterilizar as diferentes substâncias activas. Tal é expectável que decorra do facto de existir uma elevada competitividade no mercado para conseguir a melhor relação custo/benefício no processo de produção, que envolve a esterilização do produto.

Finalmente, dado que os microorganismos, bactérias e vírus, tem tendência a criar mais mecanismos de resistência ao longo do tempo, é de extrema importância a pesquisa e evolução dos actuais processos de esterilização.

Bibliografia

- Allison, D. (1999). A REVIEW: Taking the sterile out of sterility. *Journal of Applied Microbiology* , 87, 789-793.
- Ames, H. (2014). Which chemical indicator is right for me? *Healthcare Purchasing News* , 38 (11), 48-52.
- Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., & Bansal, A. K. (2010). Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 206-212.
- Aulton, M. E., & Taylor, K. M. (2013). *Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines* (4th Edition ed.). Churchill Livingstone.
- Asasutjarit, R., Thanasanchokepibull, S., Fuongfuchat, A., & Veeranondha, S. (2011). Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels. *International Journal of Pharmaceutics* , 411, 128-135.
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *MICROBIOLOGIA MÉDICA I* (Vol. 1). Lisboa, Portugal: Lidel.
- Bhagat, N., Grigorian, R. A., Tutela, A., & Zarbin, M. A. (2009). Diabetic Macular Edema: Pathogenesis and Treatment. *SURVEY OF OPHTHALMOLOGY* , 51 (1), 1-32.
- Bilkhu, P. S., Wolffsohn, J. S., & Naroo, S. A. (2012). A review of non-pharmacological and pharmacological management of seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Contact Lens & Anterior Eye* , 35 (1), 9-16.
- Chiang, C.-C., Lin, C.-L., Tsai, Y.-Y., Peng, C.-L., Liao, Y.-T., & Sung, F.-C. (2013). Patients with Blepharitis Are at Elevated Risk of Anxiety and Depression. *Plos One* , 8 (12), 2.
- Chotyakul, N., Velazquez , G., & Torres, J. (2011). Assessment of the uncertainty in thermal food processing decisions based on microbial safety objectives. *Journal of Food Engineering* , 102, 247-256.

- Comissão Europeia. (2009). Anexo 1 - Fabrico de Medicamentos Estéreis. In Comissão Europeia, *EudraLex - Normas que Regulam os Medicamentos na União Europeia* (Vol. 4). Bruxelas: European Commission.
- Croxtall, J. D. (2011). Ganciclovir Ophthalmic Gel 0.15% In Acute Herpetic Keratitis (Dendritic Ulcers). *Drugs*, 71 (5), 603-610.
- Dart, J. K., Radford, C. F., Minassian, D., Verma, S., & Stapleton, F. (2008). Risk Factors for Microbial Keratitis with Contemporary Contact Lenses: A Case-Control Study. *Ophthalmology*, 115 (10), 1647-1654.
- Denyer, S. P., Hodges, N. A., & Gorman, S. P. (2004). *Pharmaceutical Microbiology*. Oxford: Blackwell.
- Doornmalen, J. v., & Kopinga, K. (2008). Review of surface steam sterilization for validation purposes. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, 36 (2), 86-92.
- Durand, M. L. (2015). 113 – Introduction to Eye Infections. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th Edition ed., pp. 1388-1391). Philadelphia: Elsevier.
- EMA. (2015). *European Medicines Agency*. Disponível Setembro 28, 2015, em European Medicines Agency: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- Estatuto do Medicamento, decreto-lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto (2006)
- E.Y.K., N., Tan, J. H., Acharya, R. U., & Suri, J. S. (2012). *Human Eye Imaging and Modeling* (1 Edition ed.). Florida: CRC Press.
- FDA. (2015). *U.S. Food and Drug Administration*. Disponível Setembro 28, 2015, em About FDA: <http://www.fda.gov/AboutFDA/default.htm>
- Figueira, L., Torrão, L., Dinis, A. S., & Palmares, J. (2010). *ANTIBIOTERAPIA OCULAR SUPERFÍCIE OCULAR EXTERNA - Guia Prático*. Porto.
- Fraise, A. P., Maillard, J.-Y., & Sattar, S. A. (2013). *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* (5th Edition ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell.

- Gong, L., Sun, X., & Chapin, W. J. (2010). Clinical Curative Effect of Acupuncture Therapy on Xerophthalmia. *The American Journal of Chinese Medicine* , 38 (4), 651-659.
- Heijl, A. (2015). Glaucoma treatment: by the highest level of evidence. *The Lancet* , 386 (9975), 1264-1266.
- Hsiao, C.-Y., Liu, S.-J., Ueng, S. W.-N., & Chan, E.-C. (2012). The influence of g irradiation and ethylene oxide treatment on the release characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) composites. *Polymer Degradation and Stability* , 97 (5), 715-720.
- INFARMED. (2008). Monografias das formas farmacêuticas. In INFARMED, *Farmacopeia Portuguesa IX* (pp. 899-902). Lisboa: Ministério da Saúde.
- INFARMED. (2008). Texto gerais sobre esterilidade. In INFARMED, *Farmacopeia Portuguesa IX* (pp. 649-653). Lisboa: Ministério da Saúde.
- INFARMED. (2013). Prontuário Terapêutico. Disponível em <https://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>
- ISO. (2015). *International Organization for Standardization*. Disponível Setembro 28, 2015, em About ISO: <http://www.iso.org/iso/home/about.htm>
- ISO 11140:2014. Sterilization of health care products - Chemical indicators - Part 1: General requirements. (2014). Switzerland
- ISO 14397:2009. Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. (2009). Switzerland
- ISO 14644-1:1999. Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness. (2008). Switzerland
- ISO/TC 198. Sterilization of health care products. (1990). Switzerland
- ISO/TS 11139:2006. Sterilization of health care products - Vocabulary (2010). Switzerland
- Isaacson, R. (2009). Sterilization - validation, qualification requirements. *Manufacture of sterile medicines – Advanced workshop for SFDA GMP inspectors* (pp. 1-9). Nanjing: World Health Organization.

- Jackson, W. B. (2008). Blepharitis: current strategies for diagnosis and management . *Canadian Journal of Ophthalmology* , 43 (2), 171-172.
- Johnson, M. W. (2009). Etiology and Treatment of Macular Edema. *American Journal of Ophthalmology* , 147 (1), 11-21.
- Kazakis, N. A., Tsirliganis, N. C., & Kitis, G. (2015). Preliminary thermoluminescence investigation of commercial pharmaceutical glass containers towards the sterilization dosimetry of liquid drugs. *Applied Radiation and Isotopes* , 105, 130-138
- Keay, L., Edwards, K., Naduvilath, T., Taylor, H. R., Snibson, G. R., Forde, K., et al. (2006). Microbial keratitis predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology*, 113 (1), 109-116.
- Khutoryanskiy, E. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* , 65, 252-267.
- Killeen, S., & McCourt, M. (2012). Decontamination and sterilization. *Surgery* , 30 (12), 687-692.
- Kolb, H. (2007). Gross Anatomy of the Eye. In F. E. Kolb H, *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salk City.
- Kozakiewicz, M. (2014). Computer-aided orbital wall defects treatment by individual design ultrahigh molecular weight polyethylene implants. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* , 42, 283-289.
- Lambert, B. J., Mendelson, T. A., & Craven, M. D. (2011). Radiation and Ethylene Oxide Terminal Sterilization Experiences with Drug Eluting Stent Products. *AAPS PharmSciTech* , 12 (4), 1115-1126.
- Lemp, M. A., & Nichols, K. K. (2009). Blepharitis in the United States 2009: A Survey-based Perspective on Prevalence and Treatment . *The Ocular Surface* , 7, 1-4.
- Macknight, A. D., McLaughlin, C. W., Peart, D., Purves, R. D., Carré, D. A., & Civan, M. M. (2000). Formation Of The Aqueous Humor. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* , 100-106.

- Marguerite, B., & McDonald, M. (2009). The Patient's Experience of Blepharitis. *The Ocular Surface*, 7 (2), 17.
- McCluskey, S. V. (2008). Sterilization of glycerin. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 65 (12), 1173-1176.
- McDonnell, G. E. (2007). *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*. Washington, USA: ASM Press.
- McLaughlin, S., Welch, J., MacDonald, E., Mantry, S., & Ramaesh, K. (2014). Xerophthalmia—a potential epidemic on our doorstep? *Eye*, 28 (5), 621-623.
- Mesa Laboratories. (2014, Março 4). *Biological Indicators*. Disponível Outubro 14, 2015, em Air Removal (Bowie-Dick Type) Tests | Biological Indicators: <http://biologicalindicators.mesalabs.com/air-removal/>
- Moisseiev, E., Cohen, S., & Dotan, G. (2013). Alagille Syndrome Associated with Xerophthalmia. *Case Reports in Ophthalmology*, 4, 311-315.
- Munõz-Fernández, S., & Martín-Mola, E. (2006). Uveitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20 (3), 487-505.
- Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical Engineering and Biotechnology* (2nd Edition ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Natu, M. V., Gaspar, M. N., Fontes Ribeiro, C. A., Cabrita, A. M., de Sousa, H. C., & Gil, M. (2011). In vitro and in vivo evaluation of an intraocular implant for glaucoma treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 415 (1-2), 73-82.
- Ono, S. J., & Abelson, M. B. (2005). Allergic conjunctivitis: Update on pathophysiology and prospects for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 (1), 118-122.
- Papadopoulos, T. A., Vrouva, G., Bafa, M., Paterakis, N., & Chounta, M. (2013). Chronic Ocular Hypertension after Treated Multifocal Bacterial Keratitis. *Case Reports in Ophthalmology*, 4 (1), 23-26.
- Parsons, B. (2012). 8 – Sterilisation of healthcare products by ionising radiation: sterilisation of drug-device products and tissue allografts. In S. Lerouge, & A. Simmons, *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices* (1st Edition ed., pp. 212-239). Cambridge: Woodhead Publishing

- Pflugfelder, S. C., Karpecki, P. M., & Perez, V. L. (2014). Treatment of Blepharitis: Recent Clinical Trials. *The Ocular Surface* , 12 (4), 273-275.
- Pinto, T. J., Kaneko, T. M., & Pinto, A. F. (2015). *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos* (4ª Edição ed.). São Paulo: Manole.
- Quigley, H. A. (2011). Glaucoma. *The Lancet* , 377 (9774), 1367-1377.
- Reybrouck, G. (2007). Milestones in the testing of surface disinfectants: from Robert Koch to CEN TC 216. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* , 2 (1), 1-5.
- Rodrigues, L. T., Luna, A. S., Henriques, C. A., & Costa, A. C. (2012). STRATEGIES FOR THE VALIDATION OF STEAM STERILIZATION PROCESS IN AUTOCLAVES FROM THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY. *International Journal of Life Science & Pharma Research* , 2 (4), 73-81.
- Roncone, D. P. (2006). Xerophthalmia secondary to alcohol-induced malnutrition. *Optometry* , 77 (3), 124-133.
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2013). Disinfection and sterilization: An overview. *American Journal of Infection Control* , 41.
- Sancho, C. M., Vanrell, R. H., & Negro, S. (2004). Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *Journal of Controlled Release* , 99, 41-52.
- Sandle, T. (2013). *Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Santos, J. M., Cavacas, A., Silva, A. S., Zagalo, C., Evangelista, J. G., Oliveira, P., et al. (2011). *Anatomia Geral - Moreno* (6ª Edição ed.). Egas Moniz Publicações.
- Schwartz, K., & Budenz, D. (2004). Current management of glaucoma. *Current Opinion Ophthalmology* , 2, 119-126.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2011). *Anatomia e Fisiologia* (8ª Edição ed.). Loures: Lusociência.
- Senaratne, T., & Gilbert, C. (2005). Conjunctivitis. *Community Eye Health Journal* , 18 (53), 73-75.

- Sheikh, A., Hurwitz, B., Schayck, C. P., McLean, S., & Nurmatov, U. (2012). Antibiotics versus placebo for acute bacterial conjunctivitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (9), 1-2.
- Shintani, H. (2011). Validation of Sterilization Procedures and Usage of Biological Indicators in the Manufacture of Healthcare Products. *Biocontrol Science* , 16 (3), 85-94.
- Silva, J. C. (2011). *Qualificação e Validação, conceitos básicos* (Vol. 1). São Paulo: Clube de Autores.
- Skevaki, C. L., Galani, I. E., Pararas, M. V., Giannopoulou, K. P., & Tsakris, A. (2011). Treatment of Viral Conjunctivitis with Antiviral Drugs. *Drugs* , 71 (3), 331-347.
- Sommer, A. (1998). Xerophthalmia and vitamin a status. *Progress in Retinal and Eye Research* , 17 (1), 9-31.
- Srivastava, A., Rajappa, M., & Kaur, J. (2010). Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. *Clinica Chimica Acta* , 411, 1165-1171.
- Thanathanee, O., & O'Brien, T. P. (2011). Conjunctivitis: systematic approach to diagnosis and therapy. *Current Infectious Disease Reports* , 13 (2), 141-148.
- Tranos, P. G., Wickremasinghe, S. S., Stangos, N. T., Topouzis, F., Tsinopoulos, I., & Pavesio, C. E. (2004). Macular Edema. *Survey of Ophthalmology* , 49 (5), 470-490.
- Tuli, S., Khuddus, N., & Tuli, S. S. (2010). Uveitis Presenting With Decreased Vision and Leukocoria. *Journal of Pediatric Health Care* , 24 (6), 403-407.
- Van Doornmalen , J., & Kopinga, K. (2009). Temperature dependence of F-, D- and z-values used in steam sterilization processes. *Journal of Applied Microbiology* , 107 (3), 1054-1060.
- Williams, S. E., Carnahan, R., & McPheeters, M. L. (2013). A systematic review of validated methods for identifying uveitis using administrative or claims data. *Vaccine* , k87-k89.

- Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K., & Omid, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* , 38, 2-11.
- Zajko, Š., & Klimant, I. (2013). The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 177, 86-93.
- Zani, F., Veneziani, C., Bazzoni, E., Maggi, L., Caponetti, G., & Bettini, R. (2013). Sterilization of corticosteroids for ocular and pulmonary delivery with supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics* , 450, 218-224.
- Zetterberg, M. (2015). Age-related eye disease and gender. *Maturitas* .