

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS - FARMANGUINHOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS INDUSTRIAIS FARMACÊUTICAS

Controle de Endotoxina na indústria Farmacêutica – Análise dos
Métodos In Vivo e In Vitro

DAYANE SANTOS GUIMARÃES

Rio de Janeiro

2017

DAYANE SANTOS GUIMARÃES

**Controle de Endotoxina na indústria Farmacêutica – Análise dos
Métodos In Vivo e In Vitro**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação Lato
Sensu como requisito para obtenção do título de
Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Me. Ricardo Cristiano de Souza Brum

Rio de Janeiro

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

G963c Guimarães, Dayane Santos

Controle de Endotoxina na indústria farmacêutica – Análise dos métodos in vivo e in vitro. / Dayane Santos Guimarães. – Rio de Janeiro, 2017.

x, 43 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ricardo Cristiano de Souza Brum.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas, 2017.

Bibliografia: f. 41-43

1. Endotoxinas. 2. Testes de Endotoxinas. 3. Produto Farmacêutico.
I. Título.

CDD 615.1

DAYANE SANTOS GUIMARÃES

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação Lato Senu como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Me. Ricardo Cristiano de Souza Brum

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

M.Sc. Ricardo Cristiano Brum, Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Orientador e Presidente da Banca

Membro: Tatiana Sanjuan Ganem Waetge

Membro: Sabrina Correa Enriquez

Rio de Janeiro

2017

RESUMO

Guimarães, Dayane Santos **Controle de Endotoxina na indústria Farmacêutica – Análise dos Métodos In Vivo e In Vitro**. Rio de Janeiro, 2017. Trabalho de conclusão de curso – Pós-Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, 2017.

Produtos estéreis sejam injetáveis ou não, bem como suas matérias-primas ou materiais envolvidos na fabricação ou embalagem dos mesmos têm por obrigatoriedade a realização do ensaio de endotoxinas bacterianas, uma vez que, os níveis de pirogênio tornaram-se cruciais na liberação de produtos farmacêuticos. Sendo assim, é necessário que os testes para detecção desse tipo de contaminante sejam cada vez mais eficazes e rápidos este trabalho faz uma abordagem dos testes disponíveis para detecção de endotoxinas e compara as vantagens e desvantagens de cada processo.

Palavras chave: Endotoxinas, testes de endotoxinas, produto farmacêutico.

ABSTRACT

Guimarães, Dayane Santos **Controle de Endotoxina na indústria Farmacêutica – Análise dos Métodos In Vivo e In Vitro**. Rio de Janeiro, 2017. Trabalho de conclusão de curso – Pós-Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, 2017.

Sterile products are injected or not, as well as their raw materials or materials involved in the manufacture or packaging thereof are mandatory to perform bacterial endotoxin testing, as pyrogen levels have become crucial in the release of pharmaceutical products. Thus, it is necessary that tests for this type of contaminant are increasingly effective and rapid this work, an approach of available tests for detection of endotoxins and comparisons as advantages and disadvantages of each process.

Keywords: Endotoxins, endotoxin tests, pharmaceutical product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais diferenças entre Exotocinas e Endotoxinas	14
Figura 2 - Endotoxina e a resposta pirogênica. O mecanismo proposto pelo o qual as endotoxinas causam febre.....	17
Figura 3 - Estrutura da parede celular de bactéria Gram-negativa.....	18
Figura 4 - Teste de Pirogênio <i>in vivo</i>	26
Figura 5 - Teste LAL.....	28
Figura 6 - Lisado de amebócitos de <i>limulus</i> (LAL), um reagente que é extraído do sangue azul do caranguejo em ferradura.	29
Figura 7 - Método coagulação em gel	31

LISTA DE ABREVIações

IgG -	Imunoglobulina G
LPS -	Lipopolissacarídeos
ADN -	Ácido Desoxirribonucléico
°C -	Graus Celsius
λ -	Lambda
HCl -	Ácido Clorídrico
% -	Porcentagem
USP -	<i>United States Pharmacopeia</i>
pH -	Potencial de Hidrogênio
mL/kg -	mililitro por kilograma
Kg -	Kilograma
mL -	Mililitro
LAL -	Limulus Amebocyte Lysate
UE/mL -	Unidade de endotoxina por mililitro
μ L -	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. JUSTIFICATIVA	12
4. METODOLOGIA	13
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
5.1. Pirogênio	13
5.1.1. Mecanismo da Febre	15
5.2. Endotoxinas	17
5.3. Processo de Despirogenização	19
5.3.1. Processo por Inativação da Endotoxina	19
5.3.1.1. Hidrólise Ácido-base	19
5.3.1.2. Oxidação	20
5.3.1.3. Alquilação	20
5.3.1.4. Tratamento por Calor Seco	20
5.3.1.5. Polimixina B	21
5.3.1.6. Radiação Ionizante	21
5.3.2. Por Remoção das Endotoxinas	22
5.3.2.1. Lavagem	22
5.3.2.2. Destilação	22
5.3.2.3. Ultrafiltração	22
5.3.2.4. Osmose Reversa	23
5.3.2.5. Carvão Ativo	23
5.3.2.6. Atração Eletrostática	23
5.3.2.7. Atração por Membrana Hidrófoba	24

5.4. Teste de Pirogênio	24
5.4.1. Método <i>in vivo</i>	24
5.4.1.1. Interpretação do Resultado	26
5.4.2. Método <i>in vitro</i>	27
5.4.2.1. Método de Coagulação em Gel	29
5.4.2.2. Interpretação do Resultado	31
5.4.2.3. Métodos Analíticos para Detecção de Endotoxinas.....	32
5.4.2.3.1. O Método Turbidimétrico	32
5.4.2.3.2. Método Cromogênico	32
5.4.2.3.3. Método Colorimétrico de Proteína de Lowry	33
5.4.2.3.4. Método Nefelométrico	34
5.4.2.4. Validação do Método <i>in vitro</i>	34
5.4.2.5. Fatores de Interferência no Teste de LAL	35
5.4.2.5.1. Sensibilidade do LAL	35
5.4.2.5.2. Testes de Inibição e Exacerbação de Resposta.....	36
5.4.2.5.3. Limite de Endotoxina	36
5.4.2.5.4. Teste de Compatibilidade.....	37
5.5. Principais Diferenças entre o Ensaio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	37
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêuticas têm impulsionado o mercado farmacêutico e representam uma importante fonte econômica deste setor. A necessidade de desenvolvimento de métodos de controle e gestão da qualidade tem se colocado como um fator de melhoria da competitividade e permanência das indústrias em seu setor de atuação. Nesse sentido, a realização do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas é de suma importância para assegurar a qualidade, segurança, eficácia e credibilidade dos seus medicamentos junto ao mercado consumidor (Rocha & Galende, 2014).

O controle de qualidade pode ser definido como um conjunto de operações, programação, coordenação e execução com o objetivo de verificar e assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, sempre através de algum tipo de análise e medição. Suas principais vantagens são: Otimização de processos, redução de tempos e desperdícios, padronização de procedimentos, aumento do grau de certeza da qualidade do ambiente, dos insumos utilizados e dos produtos finais (Rocha & Galende, 2014).

Na Indústria Farmacêutica o Controle de Qualidade inclui os Laboratórios de Físico-Químico, Microbiológico, Materiais de embalagem, controle em processo e laboratório de análises que requerem: áreas apropriadas, pessoal qualificado e recursos materiais. São atribuições do controle de qualidade na indústria farmacêutica: desenvolver, constituir, alterar e treinar metodologias analíticas e operações de laboratório fundamentadas em referências oficialmente reconhecidas e realização de estudos internos de validação de métodos; monitorar os aparelhos da empresa; determinar especificações escritas todos os produtos utilizados (matéria-prima, materiais de embalagem, produtos intermediários e produtos acabados); emitir certificados de análise e laudos analíticos, desenvolver e aplicar programas internos de auditoria, organizacionais e de documentação (Rocha & Galende, 2014).

Desse modo, Todos os produtos estéreis, sejam injetáveis ou não, bem como suas matérias-primas ou materiais envolvidos na fabricação ou embalagem dos mesmos, tem por obrigatoriedade a realização do ensaio de endotoxinas bacterianas, uma vez que, os níveis de pirogênio tornaram-se cruciais na liberação de produtos farmacêuticos.

Sob o ponto de vista de controle de qualidade, todos os injetáveis, bem como os acessórios para transfusão, infusão e todos os dispositivos implantáveis ou descartáveis empregados em terapia parenteral devem oferecer segurança ao paciente, sob o ponto de vista de contaminantes pirogênicos. Produtos injetáveis de grande volume e de pequeno volume, assim como produtos na forma de aerossol, para uso respiratório devem ser analisados. O potencial de periculosidade é maior quando se trata de injetável de uso exclusivo por via intravenosa. O risco será ainda maior quando se trata de produto com inoculação intratecal, em que a experiência demonstrou ser a endotoxina 1000 vezes mais potente que na via intravenosa (Pinto, 2003).

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição define: O teste de endotoxina bacteriana é usado para detectar ou quantificar endotoxinas de bactérias gram negativas presentes em amostras para qual o teste é preconizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal fazer análise e descrição das diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo* já apresentadas em literatura relacionadas ao controle de endotoxinas na indústria farmacêutica.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e descrever as análises já existentes para detecção de endotoxinas.
- Comparar as técnicas *In vivo* e *In vitro*, descrevendo suas vantagens e desvantagens.

3. JUSTIFICATIVA

O teste de endotoxinas tem grande importância principalmente dentro da indústria farmacêutica, já que através dele é possível identificar bactérias que ao

entrarem na corrente sanguínea causam reações no sistema imune e a ativação de diferentes cascatas de reações não celulares.

Muitos meios são apropriados para crescimento de bactérias gram-negativas e que provocam efeitos tóxicos em muitos organismos e podem acometer os seres humanos causando diversas doenças, por isso é importante estudar os métodos para identificação de endotoxinas a fim de minimizar os riscos ao utilizar os produtos produzidos pela indústria.

4. METODOLOGIA

A pesquisa é do tipo exploratória e foi desenvolvida através de uma revisão sistemática bibliográfica de artigos, documentos oficiais e livros que contenham informações sobre endotoxinas. A revisão consiste em buscar artigos que descrevam os testes disponíveis para detecção de endotoxinas, descrição e comparação dos métodos existentes. Os termos de indexação utilizados foram (endotoxina, bacterial endotoxin, testes para detecção de endotoxinas). Foram utilizadas as bases de dados Scielo, Google acadêmico, EBSCO, BIREME, PUBMED.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. Pirogênio

Substâncias que induzem febre são chamadas pirogênio, a palavra pirogênio é relacionada a palavra grega *pyro*, que significa ardente ou fogo, uma descrição adequada para substâncias que produzem elevação da temperatura do corpo. A reação pirogênica é desencadeada pela presença, na corrente sanguínea, de soluções contaminadas, infundidas no paciente, contendo endotoxinas ou produtos de degradação proteica. (PEARSON, 1985). Pirogênios podem ser originados da parede de bactérias Gram negativas, Gram positivas, vírus ou fungos (Barth Et Al, 2007).



O pirogênio pode estar presente em injetáveis (intramuscular e endovenoso), correlatos ligados a injetáveis e qualquer produto implantado (fluidos para perfusão e infusão). A origem dos pirogênios nos injetáveis pode estar associada ao ambiente, à

matéria-prima, ao material de acondicionamento, ao operador ou ao tempo total até a esterilização (Elisson, 2000).

Eles são divididos em duas classes. Pirogênios exógenos são aqueles originários fora do corpo e induzem elevações térmicas quando injetados em humanos e animais. Embora o lipopolissacarídeo (endotoxina) seja o mais presente e importante pirogênio exógeno, há outros de constituição química diversa, que causam elevação de temperatura quando injetados sob condições específicas. Classes gerais de pirogênios exógenos incluem bactéria, fungos e vírus, como também pirogênios não microbianos, por exemplo, alguns fármacos, esteróides, frações do plasma e o adjuvante sintético muramil dipeptídeo (Pinto, 2003; Pearson, 1985).

O pirogênio endógeno, entretanto, é produzido internamente pelo hospedeiro em resposta ao estímulo de vários pirogênios exógenos. O pirogênio endógeno é uma substância homogênea sintetizada por diferentes células de hospedeiros após exposição aos pirogênios exógenos como a endotoxina. Hoje, está bem estabelecido que o pirogênio endógeno é o mediador central da febre (Pearson, 1985).

Figura 1 - Principais diferenças entre Exotocinas e Endotoxinas

Propriedade	Exotoxinas	Endotoxinas
		
Fonte bacteriana	Principamente bactérias gram-positivas	Bactérias gram-negativas
Relação com o microorganismo	Produto metabólico de células em crescimento	Presentes no LPS da membrana externa da parede celular e liberadas com a destruição da célula ou durante a divisão celular
Química	Proteínas, normalmente compostas de duas partes (A-B)	Porção lipídica (lipídeo A) do LPS da membrana externa (lipopolissacarídeo)
Farmacologia (efeito no organismo)	Específica para uma estrutura ou função celular particular no hospedeiro (afeta principalmente funções celulares, neurônios e trato gastrointestinal)	Geral, causando febre, fraqueza, dores e choque; todas produzem os mesmos efeitos
Estabilidade ao calor	Instável; normalmente podem ser destruídas em temperaturas entre 60 a 80°C (exceto a enterotoxina estafilocócica)	Estável; podem suportar a autoclavagem (121°C por uma hora)
Toxicidade (habilidade de causar doença)	Alta	Baixa
Geração de febre	Não	Sim
Imunologia (em relação aos anticorpos)	Podem ser convertidas em toxoides para imunização contra a toxina; neutralizadas por antitoxinas	Não são facilmente neutralizadas por antitoxinas; portanto, toxoides eficazes não podem ser produzidos para a imunização contra as toxinas
Dose letal	Pequena	Consideravelmente maior
Doenças representativas	Gangrena gasosa, tétano, botulismo, difteria, febre escarlatina	Febre tifóide, infecções do trato urinário e meningite meningocócica

Fonte: Microbiologia 12ª edição por Por Gerard J. Tortora, Christine L. Case, Berdell R.

A contaminação pirogênica pode ser considerada um grave problema de saúde pública, podendo levar o paciente a um quadro de choque que poderá culminar em óbito, por isso o controle da qualidade desses produtos é tão importante (Barth, Thiago Et Al,2007).

5.1.1. Mecanismo da Febre

A febre é um fenômeno de defesa do organismo, quando sofre qualquer tipo de agressão, médicos e cientistas antigos acreditavam que a febre deveria ser considerada como uma principal doença a ser combatida na época. Hipócrates acreditava que a febre servia para cozinhar os excessos de “humores” (a causa proposta da doença naquele dia) e, portanto, para remoção dos mesmos do corpo. Essas hipóteses eram válidas até o início do século XVIII, quando vários estudos puderam elucidar melhor as causas da febre. Estudos primários surgiram de observações associando o aparecimento de febre em homens e animais que tiveram contato com materiais orgânicos apodrecidos. Entre 1809 e 1822, Gaspard injetou extratos de fluidos podres em cachorros e foi verificado que estes extratos causavam febre e doença nos animais. Em 1823, François Magendie notou as péssimas condições de higiene em volta de muitos abrigos e fundamentou-se de que as águas poluídas eram responsáveis pela ocorrência de muitas doenças graves, incluindo a febre tifóide, febre intermitente, disenteria, febre amarela, cólera e assim por diante. Ele seguiu os experimentos liderados por Gaspard e descobriu que os peixes de águas contaminadas seriam um potente indutor de febre. Também demonstrou que na ausência de materiais orgânicos em decomposição nenhuma febre era induzida (Williams, 2007).

Foi sugerido que a mesma pudesse ser absorvida através da circulação. Concomitante às observações de Magendie, os farmacêuticos franceses Pelletier e Caventue isolaram “quinina” como uma droga antipirética pura de casca de “cinchona”. Então, piréticos e antipiréticos (do grego “pyreto” para febre) devem ser produzidos artificialmente e estudados. A compreensão do mecanismo da febre e o papel da bactéria em sua causa foi auxiliada pelo nascimento da teoria microbiológica moderna e seus métodos, e prosseguiu junto de muitas linhas de sobreposições de inquéritos, incluindo: higiene médica geral, infecção por feridas (ou sépticas), toxinas bacterianas, febre por injeção, terapia da febre, purificação química e elucidação estrutural da

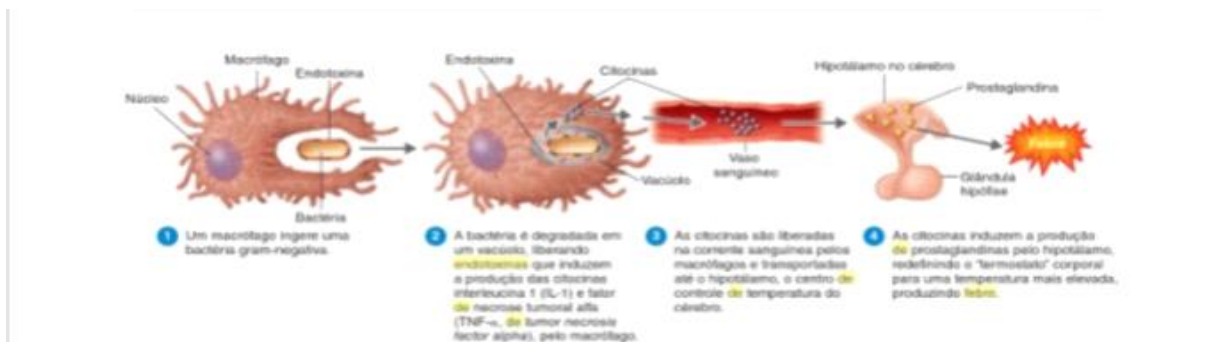
endotoxina e caracterização molecular moderna do lipopolissacarídeo (LPS) (Williams, 2007).

O mecanismo de indução de febre envolve a fagocitose do lipídeo A, sendo produzido pirogênio endógeno, que atravessa a barreira hematoencefálica e altera o ponto de equilíbrio dos neurônios reguladores de temperatura do hipotálamo anterior. Um significativo aumento na concentração de prostaglandina E2 e adenosina monofosfato cíclica (cAMP) foi encontrado no fluido cerebrospinal de coelhos nos quais foi induzida febre por injeção intravenosa de lipídeo A, indicando que ambos ocupam papel importante na indução de febre (Pearson, 1985).

À unidade lipídeo A da endotoxina são atribuídas diversas atividades biológicas como: pirogenicidade, toxicidade letal, leucopenia seguida de leucocitose, fenômeno de Shwartzman, necrose da medula óssea, reabsorção do osso embrionário, ativação do complemento, queda de pressão sanguínea, agregação plaquetária, ativação do fator de Hagemen, indução do fator plasminogênio, toxicidade aumentada pelo pré-tratamento com BCG, toxicidade aumentada pela adrenalectomia, reatividade dérmica aumentada à epinefrina, indução de resistência não específica à infecção, indução de tolerância à endotoxina, indução de síntese de IgG em camundongos neonatos, indução à produção de interferon, indução à produção de fator de tumor necrótico, indução à produção de quinase-piruvato em fígado de camundongo, hipotermia em camundongos, gelificação do lisado do amebócito de *Limulus* (LAL) (Pearson, 1985).

A figura 2 ilustra de maneira resumida o mecanismo da febre, onde (1) um macrófago ingere uma bactéria gram-negativa. (2) a bactéria é degradada em um vacúolo, liberando endotoxinas que induzem a produção de citocinas interleucina1 (IL 1) e fator de necrose tumoral alfa (TFN – α de tumor necrosis fator alpha), pelo macrófago. (3) as citocinas são liberadas na corrente sanguínea pelos macrófagos e transportadas até o hipotálamo, o centro de controle de temperatura do cérebro. (4) as citocinas induzem a produção de prostaglandinas pelo hipotálamo, redefinindo “termostato” corporal para uma temperatura mais elevada, produzindo febre.

Figura 2 - Endotoxina e a resposta pirogênica. O mecanismo proposto pelo o qual as endotoxinas causam febre.



Fonte: Microbiologia 12ª edição por Por Gerard J. Tortora, Christine L. Case, Berdell R.

5.2. Endotoxinas

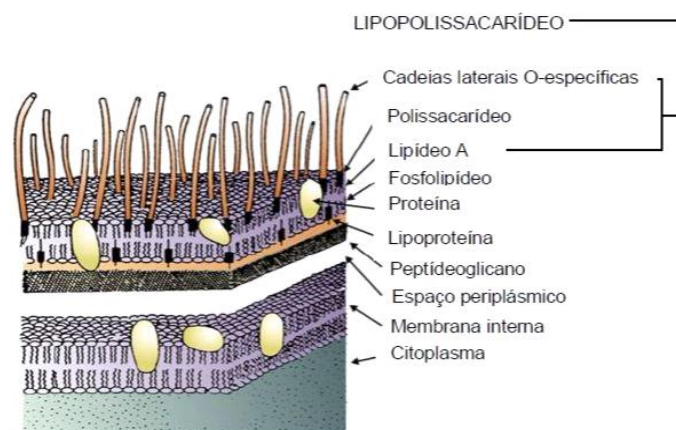
Existem inúmeros microorganismos, sobretudo bactérias, que conseguem elaborar toxinas, substâncias que passam para a periferia ou se difundem através do organismo e provocam alterações funcionais de diversa gravidade, conforme o caso. Estes microorganismos nem sempre infectam os órgãos internos de forma a provocarem graves prejuízos nas suas vítimas, um exemplo bem comum deles são as endotoxinas que são complexos de alto peso molecular, associado à membrana externa de bactérias Gram-negativas e constituem a mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica. As endotoxinas podem conter lipídeos, carboidratos e proteínas, porém quando purificadas são denominadas de lipopolissacarídeos (LPS), para enfatizar a sua natureza química. Por isso, como nos produtos farmacêuticos podem ser encontradas unidades não purificadas nas fases de processo ou nos produtos terminados, prefere-se a terminologia de endotoxinas (Kaneco, 2004).

Embora a maior parte das endotoxinas mantém-se ligadas à parede celular até a desintegração da bactéria, quantidades ínfimas de endotoxinas são liberadas, na forma solúvel, por culturas de bactérias jovens ou também por bactérias Gram-negativas como *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* e outros agentes patogênicos, em crescimento. (Pinto, 2003)

As endotoxinas são tóxicas à maioria dos mamíferos. Estudos têm demonstrado que a injeção de células de bactérias Gram-negativas vivas ou mortas, ou LPS

purificados causa uma série de reações patofisiológicas que podem variar de uma leve alteração de temperatura (febre), mudança na contagem de células brancas do sangue, coagulação intravascular disseminada, hipotensão, choque, até mesmo a morte. Por isso, a detecção e a eliminação de endotoxina bacteriana em fármacos de uso in vivo são de vital importância aos pacientes. (Fukumori, 2008)

Figura 3 - Estrutura da parede celular de bactéria Gram-negativa



Fonte: Charles River Laboratories

Uma das maiores preocupações na indústria biofarmacêutica de um modo geral é o problema da contaminação por endotoxinas (LPS), componente estrutural de paredes celulares de bactérias gram-negativas, também conhecidas como pirogênio, principalmente por suas consequências à saúde humana, pois é capaz de gerar febre, inflamação e até morte, se seus níveis não estiverem dentro dos padrões estabelecidos. O controle de endotoxinas deve ocorrer desde a água de formulação até o produto acabado. Por esta razão, a utilização de materiais apirogênicos deve ser prioridade nos processos de produção (Grandics, 2000).

As endotoxinas são contaminantes frequentes em soluções aquosas/fisiológicas e produtos obtidos pela tecnologia de ADN recombinante em modelo bacteriano. Devido a seus efeitos biológicos in vivo e in vitro, sua detecção e remoção são essenciais para a administração parenteral segura dos produtos injetáveis (Brum, 2009).

5.3. Processo de Despirogenização

A endotoxina é notoriamente resistente à destruição pelo calor, dessecação, pH extremos e vários tratamentos químicos, por isso a validação do processo de destruição ou remoção da endotoxina na produção de injetáveis é um fator crítico para o fabricante (Fukumori, 2008).

A eliminação de endotoxinas permanece como um problema importante. Os métodos tradicionais aplicados nas indústrias, como esterilização em autoclaves ou a ultrafiltração, têm pouco efeito na eliminação da endotoxina. A melhor alternativa atual é a despirogenização em forno, à temperatura de 250°C por 30 minutos ou 180°C por 3 horas (Sharma, 1986).

Dois grandes classes de processos de despirogenização que podem ser aplicadas a componentes, dispositivos, materiais que entram em contato com injetáveis e às próprias drogas incluem a inativação e a remoção da endotoxina. A inativação pode ser obtida pela detoxificação da molécula de LPS usando tratamentos químicos que quebrem pontes lábeis ou bloqueiem sítios necessários à atividade pirogênica: hidrólise ácida, oxidação com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, periodato de sódio, permanganato de potássio diluído, alquilação com anidrido acético e succínico, ou mesmo óxido de etileno. Outros processos que levam à inativação de endotoxinas são: tratamento por calor seco, radiação ionizante e tratamento com o antibiótico polimixina B (Fukumori, 2008).

5.3.1. Processo por Inativação da Endotoxina

5.3.1.1. Hidrólise Ácido-base

A hidrólise ácida ocorre na ligação do lipídeo A com o núcleo de polissacarídeos separando o lipídeo A do restante da molécula, que isolado é insolúvel em meio aquoso tem sua atividade pirogênica reduzida ou eliminada. A hidrólise ácida também pode agir sobre a fração lipídeo A, alterando a conformação da molécula em sítios funcionais essenciais, ou clivando ácidos graxos, afetando a solubilidade e pirogenicidade do lipídeo (DING; HO, 2001).

Por esse método, reduz-se ou elimina-se a atividade biológica de LPS, desativando o lipídeo A, presente no LPS bacteriano (PINTO, 2003).

Na despirogenização de materiais utiliza-se HCl 0,05 N por 30 minutos a 100 °C ou ácido acético glacial 1,0% por 2 a 3 horas a 100 °C (Fukumori, 2008).

5.3.1.2. Oxidação

No processo de oxidação, o peróxido de hidrogênio é efetivo na eliminação do pirogênio da Água Estéril para Injeção USP, solução salina normal e salina dextrose, com vantagem adicional da ausência de peróxidos em seu final. O processo é dependente do tempo, pH e concentração (Fukumori, 2008).

Além de ser um agente oxidativo muito importante na degradação de solutos e soluções, fornece vantagens em aplicações específicas. Existem outros agentes oxidantes a serem citados, como por exemplo, ácido hipoclorito, ácido periódico, permanganato de potássio diluído, neutro, ácido nítrico, dicromato e dióxido de selênio (Silveira Et Al, 2004).

5.3.1.3. Alquilação

O tratamento de endotoxinas com agentes alquilantes, como anidrido acético e succínico, promove redução de atividade pela acetilação e succinilação, respectivamente. O óxido de etileno é um forte agente alquilante com ação eficaz na destruição de endotoxinas (Pinto; Kaneko; Ohara, 2003).

Este tipo de esterilização é usada para materiais que são sensíveis ao calor e à umidade (como, por exemplo, materiais médicos e cirúrgicos, cateteres, agulhas, seringas descartáveis na embalagem plástica), além de outras preparações termolábeis, como antibióticos e outros medicamentos. O óxido de etileno ou gás de óxido de propileno são gases inflamáveis, que se diluídos com o gás inerte adequado, podem ser empregados com total segurança. Para este processo de esterilização, utiliza-se um equipamento especializado igual à autoclave (Ansel; Popovich; Loyd, 2000).

5.3.1.4. Tratamento por Calor Seco

Para materiais resistentes à temperatura, como frascos de vidro e instrumentos metálicos, o método de escolha para inativação de endotoxina é o tratamento por calor

seco obtido em estufas ou túneis de convecção, condução ou irradiação (Infravermelho). O método padrão é de exposição a não menos de 250 °C, por não menos que 30 minutos, sendo o mecanismo de inativação a incineração (Fukumori, 2008).

O LPS apresenta duas vezes mais resistência térmica ao se comparar com a endotoxina ativa da qual foi derivada. Quando a exposição é menor do que a citada anteriormente, não ocorre a redução do LPS e não se destrói as bactérias Gram intactas (Boomer; Ritz, 1987).

O tratamento por calor seco é realizado em estufas específicas para este fim, que funcionam com gás ou eletricidade, controladas por termostato. Este tratamento é considerado menos eficaz para matar microrganismos do que o calor úmido, pois utiliza altas temperaturas por períodos mais longos (Ansel; Popovich; Loyd, 2000).

Para verificar a eficácia do processo de despirogenização por calor seco, devem ser realizados experimentos utilizando quantidades conhecidas de endotoxina de *Escherichia coli*. A toxicidade de endotoxinas bacterianas é reduzida com Cobalto-60, sendo que as alterações físicas e biológicas relatadas são dependentes da dose. Como este processo aumenta a possibilidade de alterações químicas desconhecidas em fármacos e soluções parenterais, o uso de radiação ionizante na despirogenização de materiais não tem sido considerado. Os riscos de toxicidade decorrentes do processo superam os benefícios (Fukumori, 2008).

5.3.1.5. Polimixina B

A polimixina B é um antibiótico catiônico que pode anular a atividade biológica da Endotoxina, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer a sua ação. A remoção de endotoxinas pode ocorrer por diferentes métodos, baseada em características físicas da endotoxina, a saber, tamanho, peso molecular, carga eletrostática ou afinidade da endotoxina em diferentes superfícies: lavagem com água estéril para injeção USP, destilação, ultrafiltração (o tamanho da subunidade básica do LPS é cerca de 10.000 a 20.000 daltons), osmose reversa, adsorção em carvão ativo ou em asbestos, por atração eletrostática, ou em membrana hidrofóbica (Fukumori, 2008).

5.3.1.6. Radiação Ionizante

Esse método consiste em reduzir a toxicidade das endotoxinas (alterações físicas e biológicas) e aumenta a chance de alterações químicas de fármacos e soluções parenterais. Alguns riscos de toxicidade superam o que é benéfico com relação às propriedades do método (Pinto; Kaneko; Ohara, 2003).

A radiação aplicada em produtos farmacêuticos altera as substâncias presentes nos microrganismos ou as que os protegem. A destruição celular, que é irreversível e completa, ocorre através de uma combinação de efeitos da radiação (Ansel; Popovich; Loyd, 2000).

5.3.2. Por Remoção das Endotoxinas

5.3.2.1. Lavagem

A lavagem com solvente livre de pirogênio, como Água Estéril para Injeção USP, é um dos métodos mais simples e antigos para a remoção de endotoxina de superfícies sólidas. Com procedimentos adequados de lavagem podem-se remover níveis baixos de endotoxina superficial de vidraria, tampas e dispositivos (Fukumori, 2008).

5.3.2.2. Destilação

Na destilação, as moléculas de lipopolissacarídeos permanecem na fase líquida enquanto a água pela fervura passa ao estado de vapor. Moléculas de LPS que estiverem nas gotículas de água transportadas pelo vapor tendem a cair por gravidade devido ao seu elevado peso molecular. Sabe-se que a água recém destilada, coletada e mantida em frascos despirogenizados estéreis, é apirogênica (Fukumori, 2008).

A destilação é usada para grandes pesos moleculares e na estabilidade das endotoxinas. Os baixos pesos moleculares presentes em soluções podem ser purificados pela fervura e condensação em forma de vapor (Palla, 2007).

5.3.2.3. Ultrafiltração

Membranas de ultrafiltração são efetivas como filtros despirogenizantes, pois seu mecanismo é fundamentado em limites de exclusão de peso molecular. Endotoxinas são retidas na superfície da membrana quando excedem um valor limite de peso molecular, normalmente 10.000 daltons. A ultrafiltração como método de remoção de pirogênios tem sido aplicada com sucesso a uma ampla faixa de fármacos e soluções de baixo e médio peso molecular (Fukumori, 2008).

5.3.2.4. Osmose Reversa

Membranas convencionais de osmose reversa (com porosidade nominal decerca de 10 Å) removem endotoxinas por simples exclusão de tamanho, já que os poros da membrana são pequenos o suficiente para impedir a passagem de pirogênios. São extremamente efetivas na remoção de endotoxinas da água, porém o seu uso na despirogenização tem sido limitado, porque muitas moléculas distintas da água também passam através dos poros na membrana de osmose reversa (Fukumori, 2008).

5.3.2.5. Carvão Ativo

O procedimento mais adotado para a despirogenização de soluções pela adsorção de endotoxinas ao carvão ativo é a sua adição à solução e após agitação, o carvão é removido por filtração ou precipitação. Como o carvão possui grande afinidade por substâncias não ionizadas de elevado peso molecular, a sua aplicação é limitada (Fukumori, 2008).

5.3.2.6. Atração Eletrostática

Os agregados de endotoxina são negativamente carregados e se comportam como ânions em pH acima de 2. No passado, o asbestos em pH abaixo de 8,3, foi empregado para remoção de endotoxinas por adsorção, por apresentar superfície com carga positiva. Atualmente, procura-se adotar material sintético à base de poliamidas ou aminas. Produtos microporosos com carga modificada, utilizando membranas com potencial negativo são comercialmente disponíveis e empregados com sucesso na despirogenização de várias soluções farmacêuticas (Fukumori, 2008).

5.3.2.7. Atração por Membrana Hidrófoba

Polipropileno, polietileno, fluoreto de polivinilideno e poli tetra fluoretileno apresentam afinidade para ligação à endotoxina. Estudos deste mecanismo de ação sugeriram que interações iônicas ou hidrófobas contribuem para a adsorção de endotoxina. Ocorre então um processo de filtração em membrana, permitindo a retenção de 10 microgramas de LPS por centímetro quadrado da área filtrada (Palla, 2007).

5.4. Teste de Pirogênio

O teste de pirogênio determina a presença de endotoxinas bacterianas que podem estar presentes em injetáveis (intramuscular e endovenoso); em correlatos ligados a injetáveis ou em qualquer produto implantado, fluídos para perfusão e infusão. Este teste é obrigatório para produtos injetáveis e determinam, em níveis aceitáveis, os riscos de uma possível ação febril em pacientes receptores do produto injetado (Palla, 2007).

Os testes realizados para detecção de pirogênios são muito importantes para o controle de contaminantes em produtos de uso para saúde principalmente, a seguir serão abordados os testes de hipertermia que utiliza coelhos (teste *in vivo*) e o do LAL (*teste in vitro*).

5.4.1. Método *in vivo*

Conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição o teste de pirogênios fundamenta-se na medida do aumento da temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa da solução estéril em análise. Para produtos bem tolerados pelos animais, utilizar uma dose que não exceda 10 mL/kg, injetada em tempo não superior a 10 minutos. Para os produtos que necessitem preparação preliminar ou condições especiais de administração, devem-se seguir as recomendações estabelecidas.

Para a realização do teste é necessário utilizar coelhos do mesmo sexo, adultos, saudáveis, preferencialmente da mesma raça, pesando, no mínimo, 1,5 kg. Após a seleção, manter os animais em gaiolas individuais em sala com temperatura uniforme entre 20 e 23 °C livre de perturbações que possam estressá-los. A temperatura selecionada pode variar até ± 3 °C (Farmacopéia Brasileira 5ª edição).

Realizar condicionamento para determinação da temperatura dos animais, pelo menos uma vez, até sete dias antes de iniciar o teste. Os animais deverão ser condicionados segundo o mesmo procedimento do teste apenas sem inoculação do produto. Animais que apresentarem elevação de temperatura igual ou superior a 0,5 °C, em relação à temperatura inicial, não deverão ser utilizados no teste. Quando da realização do teste, usar apenas animais com temperatura igual ou inferior a 39,8 °C e que não apresentem, de um para o outro, variação superior a 1,0 °C (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

Deve-se tomar muito cuidado para não alterar a hipersensibilidade do animal durante o manuseio. No dia do teste, não se devem fornecer alimentos, mas sim, água em abundância. Cada animal, respeitando o período de descanso, deve ser pesado e colocado em contentor (Barth Et Al, 2007).

Para registro de temperatura deve-se introduzir o termômetro no reto do animal em profundidade aproximada de 6 centímetros. Se for utilizado dispositivo registrador, que deva permanecer no reto durante o período do teste, conter os coelhos de maneira que fiquem em postura natural de repouso. Quando se empregar termômetro clínico, deixar transcorrer o tempo necessário (Farmacopéia Brasileira 5ª edição).

O teste é feito sob condições ambientais controladas, livre de perturbações que possam estressar os coelhos. Nas duas horas precedentes e durante o mesmo, suprimir a alimentação. O acesso à água é permitido, mas pode ser restringido durante o teste. No máximo 40 minutos antes da injeção da dose do produto a ser testado, registrar a temperatura de cada animal mediante duas leituras efetuadas com intervalo de 30 minutos. A média das duas leituras será adotada como temperatura de controle necessária para avaliar qualquer aumento individual de temperatura subsequente à injeção da amostra. Para o teste de pirogênios de materiais de uso hospitalar lavar, com solução fisiológica estéril, as superfícies do material que entram em contato com o produto, local de injeção ou tecido interno do paciente. Efetuar os procedimentos assegurando que a solução não seja contaminada. Injetar pela veia marginal da orelha de três coelhos não menos do que 0,5 mL nem mais que 10 mL da solução por kg de peso corporal. A injeção não deve durar mais que 10 minutos, a menos que na monografia se especifique tempo diferente. Registrar a temperatura de cada animal em intervalos de 30 minutos durante 3 horas após a injeção (Farmacopéia Brasileira 5ª edição).

5.4.1.1. Interpretação do Resultado

O resultado deve ser interpretado da seguinte maneira: Se nenhum dos três coelhos apresentarem aumento individual da temperatura igual ou superior a 0,5 o C, em relação às suas respectivas temperaturas controle, o produto cumpre com os requisitos do teste de pirogênios. Se algum coelho apresentar aumento da temperatura igual ou superior a 0,5 o C, repetir o teste utilizando outros cinco animais. O produto em exame cumpre os requisitos para ausência de pirogênios se no máximo três dos oito coelhos apresentarem aumentos individuais de temperatura iguais ou superiores a 0,5 o C, e se a soma dos aumentos individuais de todos os coelhos não exceder a 3,3 o C (Farmacopéia Brasileira 5º edição).

Figura 4 - Teste de Pirogênio *in vivo*



Fonte: <https://revolucaoanimalistasite.wordpress.com/tipos-de-experimentos/>

Cabe ressaltar que coelhos apresentam o mesmo limiar de endotoxina que causa febre no homem, ou seja, 1ng/kg ou 5 UE/kg (Melandri, Vanessa et al; 2010).

Alternativas para o refinamento do teste, incluindo a comparação da resposta do animal para duas preparações de endotoxinas diferentes, sugerem que a temperatura de corte de 0,6°C deve ser diminuída para 0,5°C, como critério para um resultado positivo. Entretanto, o teste de pirogênio em coelhos tem alguns inconvenientes, incluindo baixa sensibilidade, ausência de quantificação, resistência e estresse do animal e a questão ética do envolvimento de animais nos experimentos. Embora o teste de pirogênio *in vivo* ainda seja necessário em algumas situações, vem sendo substituído aos poucos

pelo teste *in vitro* – LAL (lisado de amebócitos do *limulus*). Portanto, a validação do teste de LAL e as especificações estabelecidas para os produtos biológicos contribuirão para confirmação da qualidade e segurança de produtos farmacêuticos injetáveis (Silveira, 2004).

As Farmacopeias preconizam, como forma de redução, a reutilização de animais para o teste de pirogenio *in vivo*. Dessa forma, quando um ensaio é considerado negativo, os animais podem ser reutilizados, respeitando intervalo de 48 horas. No caso de teste positivo, deve-se obedecer a um intervalo de 14 dias para que eles tornem a ser usados em novo ensaio (United states pharmacopeia, 2000; European pharmacopeia, 2006).

A Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, não recomenda a reutilização de coelhos para produtos biológicos devido a falta de estudos anteriores, porém mantém as condições de reutilização de animais para os demais produtos (Farmacopeia Brasileira, 2003; Schindler et al., 2009).

5.4.2. Método *in vitro*

Em 1956 o reagente de LaL foi descoberto quando o pesquisador Frederick B. Bang relata a morte, por coagulação intravascular, de um caranguejo ferradura americano *Limulus polyphemus*. Bang, junto com Jack Levin, revela em 1964 que as endotoxinas são responsáveis pela coagulação da hemolinfa do *Limulus*. Mais tarde, estes pesquisadores comprovam que os elementos responsáveis pela coagulação induzida por endotoxina são de natureza enzimática, e se encontram nos amebócitos, únicos tipos de célula presente na hemolinfa do caranguejo. O reagente de LAL é um extrato aquoso de amebócitos, composto por uma cascata de enzimas serino-proteases do tipo tripsina capaz de reagir frente a pequenas quantidades de endotoxinas (Morales, 2004).

O teste de endotoxina bacteriana é usado para detectar ou quantificar endotoxinas de bactérias gram negativas presentes em amostras para qual o teste é preconizado. Utiliza-se o extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus* preparado e caracterizado como reagente LAL (Brum, 2009).

Submetem-se os caranguejos *Limulus polyphemus* à sangria, introduzindo uma agulha estéril e apirogênica de 18 G no músculo entre as regiões cefalo-torácica e abdominal. A mistura de N- etilmaleimida em 3% de cloreto de sódio estabiliza a

membrana do amebócito. Após centrifugação por 10 minutos desta mistura, despreza-se o sobrenadante azul, que contém hemocianina. Lavam-se os amebócitos em cloreto de sódio 3%, para retirada dos componentes do soro e dos anticoagulantes (Yamamoto Et Al, 2000).

Ao adicionar água destilada apirogênica, ocorre choque osmótico e consequente rompimento da membrana, para liberação do líquido intracelular. O produto na forma aquosa é liofilizado, ficando estável à 4°C por 3 anos, no mínimo (Pinto; Kaneko; Ohara, 2003).

Figura 5 - Teste LAL



Fonte: <http://rhodel.com/2014/09/this-crabs-blood-could-save-your-life/>

Figura 6 - Lisado de amebócitos de *limulus* (LAL), um reagente que é extraído do sangue azul do caranguejo em ferradura.



Fonte: <http://rhodel.com/2014/09/this-crabs-blood-could-save-your-life/>

Um estudo feito em 1970 mostrou que o teste de LAL é mais sensível do que os testes realizados em coelhos, pois a intensidade com que o gel é formado é semelhante à concentração das endotoxinas (LEVIN; BANG, 1964).

5.4.2.1. Método de Coagulação em Gel

O procedimento mais simples e amplamente usado para detecção de endotoxinas baseia-se na gelificação (Pinto, 2003; Cooper, 1970). Este método forma coágulo ou gel (método semi-quantitativo). Os trabalhos de Levin e Bang indicaram que a formação de gel ocorre quando a enzima de coagulação dos amebócitos ativada pela endotoxina, na presença de cátions divalentes, é adicionada à proteína coagulante (coagulogênio) (Fukumori, 2008).

A reação entre o lisado de amebócito e a endotoxina é dependente da concentração de endotoxina, temperatura e pH.

Volumes iguais de reagente LAL e da solução a ser analisada são transferidos a tubos de ensaio. A mistura homogeneizada é incubada em banho de água a 37°C por

uma hora. O ponto final da reação é facilmente verificado pela remoção dos tubos e inversão a 180°. A presença do gel que se mantém sólido durante a inversão é considerada positiva para endotoxinas. O ensaio se constitui em teste limite, levando-se em consideração a sensibilidade do LAL empregado, que varia de 0,25 a 0,015 UE mL⁻¹. (Pinto, 2003; Cooper, 1970).

A técnica da coagulação em gel permite a detecção e quantificação de endotoxinas baseada na reação de gelificação do reagente (Farmacopéia brasileira 5ª edição).

O teste de interferência do método de coagulação em gel deve ser feito em alíquotas da amostra na qual não há endotoxina detectável e em diluições que não exceda o MDV (máxima diluição válida). Executar o teste, como no procedimento do teste, na amostra sem adição de endotoxina (solução A) e na amostra com endotoxina adicionada (solução B), nas concentrações de $\frac{1}{4} \lambda$, $\frac{1}{2} \lambda$, 1λ e 2λ , em quadruplicatas, e testando também em paralelo as mesmas concentrações de endotoxina em água (solução C) e controle negativo em água grau reagente LAL (solução D) em duplicata. Calcular a média geométrica da concentração de endotoxina do ponto final de gelificação da amostra como descrito acima no teste para confirmação da sensibilidade do LAL. O teste é válido para a amostra sob análise se a média geométrica desta concentração for maior ou igual a $0,5 \lambda$ e menor ou igual a 2λ . Se o resultado obtido nas amostras nas quais foram adicionadas endotoxina estiver fora do limite especificado, o teste de inibição ou potencialização de endotoxina deverá ser repetido após neutralização, inativação ou remoção das substâncias interferentes ou após a diluição da amostra por fator que não exceda a MDV. Repetir o teste numa diluição maior não excedendo a MDV ou usar um LAL de sensibilidade maior para que a interferência possa ser eliminada na amostra analisada. Interferências podem ser eliminadas por um tratamento adequado como filtração, neutralização, diálise ou aquecimento (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

Quando a monografia contém requerimentos para limite de endotoxina é utilizado um teste limite para coagulação em gel, onde é feito os testes em duplicatas com as soluções A, B, C, D como se segue. Na solução A, prepare amostra diluída sem adição de endotoxina; Solução B prepare amostra com adição de endotoxina (controle positivo do produto) a 2λ ; Solução C com água grau reagente LAL com adição de endotoxina a 2λ e solução D (controle negativo) água grau reagente LAL sem adição de

endotoxina. A diluição da solução A e B não deve ultrapassar o MDV (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

Para o teste ter validade é necessário que as réplicas dos controles positivos das soluções B e C formem gel, e a réplicas dos controles negativos das soluções A e C não formem gel. Resultados contrários, não serão válidos e deverão ser repetidos(Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

Figura 7 - Método coagulação em gel



Fonte: <http://controledequalidadeemindustria.blogspot.com.br/2016/08/endotoxinas-bacterianas.html>

5.4.2.2. Interpretação do Resultado

O ensaio do teste pela coagulação em gel é feito com a mistura de um volume (ex. 100 µL) de LAL com igual volume das soluções acima, amostra, padrões, e controle negativo do teste em tubos de ensaio 10 x 75mm, em duplicatas. Os tubos são incubados por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, evitando vibrações. Após este período são retirados um a um, virando a 180 graus e verificando a integridade do gel; se o gel permanecer firme após a inversão dos tubos considere o resultado como positivo, e se não houver formação de gel ou o mesmo não se apresentar firme considere como negativo. O teste somente será válido se as seguintes condições forem obedecidas: Se ambas as réplicas do controle negativo (D) apresentarem reações negativas; Se ambas as

réplicas do controle positivo do produto (B) apresentarem reações positivas; Se a média geométrica da solução C estiver dentro da faixa de $0,5 \lambda$ a 2λ . Para calcular a concentração de endotoxina da solução A, calcule a concentração do ponto final de cada réplica da serie de diluições, multiplicando cada fator de diluição do ponto final pela sensibilidade rotulada do reagente LAL (λ) A concentração de endotoxina na solução teste é a média geométrica da concentração do limite das replicas. Se o teste é realizado na amostra diluída, determine a concentração de endotoxina na solução original multiplicando o resultado pelo fator de diluição da amostra. Se nenhuma das diluições da amostra teste for positiva, expresse o resultado da concentração de endotoxina como menor que a sensibilidade do LAL (λ) ou menor do que a sensibilidade do LAL multiplicado pelo menor fator de diluição da amostra. Se todas as diluições da amostra apresentarem reações positivas, a concentração de endotoxina é expressa como igual ou maior que λ multiplicado pelo mais alto fator de diluição da amostra (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

5.4.2.3. Métodos Analíticos para Detecção de Endotoxinas

5.4.2.3.1. O Método Turbidimétrico

É baseado no desenvolvimento de turbidez após quebra de um substrato endógeno. A técnica turbidimétrica baseia-se na medida de aumento de turbidez (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

Este método tem uma considerável medida quantitativa da endotoxina, ao contrário do ponto final de gelificação, que impede a quantificação da endotoxina a níveis abaixo daqueles em que se forma o gel consistente (DING; HO, 2001). É um método sofisticado, que exige equipamentos complexos, aumentando os custos de execução (Santos Et Al, 2000).

O teste é realizado numa temperatura de incubação recomendada de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.2.3.2. Método Cromogênico

É baseado no desenvolvimento de cor após quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno. Qualquer um destes procedimentos pode ser realizado, a menos que exista uma indicação contrária no procedimento ao qual será utilizado (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

O ensaio de LAL cromogênico foi otimizado usando um LAL reativo, designado para o método Gel-Clot, e um substrato cromogênico. O procedimento deste método envolve a incubação do LAL reativo e um padrão de endotoxina (ou uma amostra), seguido de incubações subsequentes com o substrato cromogênico (Bussey; Tsuji, 1984). Como no método turbidimétrico, este método consiste na exigência de equipamentos complexos, pois é um método sofisticado, com consequente aumento do custo (Santos Et Al, 2000).

Este é um método quantitativo e específico para enzima de coagulação ativada. O teste requer mistura de 0,1 mL do LAL com 1,0 mL da amostra, incubando-se por 8 minutos. Depois de devida incubação, adiciona-se 0,5 mL de substrato cromogênico na solução e incuba-se novamente por 3 minutos. Para finalizar a reação, utiliza-se 0,1 mL de ácido acético glacial em água, a 25% v/v e, em espectrofotômetro, lê-se a densidade óptica (Pinto; Kaneko; Ohara, 2003).

5.4.2.3.3. Método Colorimétrico de Proteína de Lowry

Este método quantitativo é considerado muito importante na detecção de endotoxinas, baseando-se em concentrações crescentes de endotoxinas que são proporcionais à proteína do reagente de LAL, formando coagulogênio (proteína coagulante). O teste é semelhante ao da gelificação, mas a quantidade do lisado-específico é determinado usando-se a proteína de Lowry (usa-se um espectrofotômetro, com leitura à 660nm). Comparam-se os resultados com uma curva padrão (Pinto; Kaneko; Ohara, 2003).

É necessário que se acompanhe o ensaio com controles positivo e negativo, para assegurar a não interferência de amostras e ausência de contaminantes (Santos Et Al, 2000).

No método colorimétrico, a absorvância é medida durante todo o período da reação e os valores da taxa são determinados naquelas leituras. A reação chega ao seu final pela adição de um agente de enzimas finalizadoras de reações, antes das leituras (United, 2000).

5.4.2.3.4. Método Nefelométrico

Este método tem sido pesquisado para detectar a presença do pirogênio em parenterais de grande volume (Crawford; Narducci; Augustine, 1991). A diferença deste para o método espectrofotométrico é que este usa um nefelômetro (empregando-se a luz relativa dispersa) enquanto o outro método consiste em utilizar a concentração da endotoxina para leitura da densidade óptica. Usa-se o sulfato de dodecil sódico para finalizar a reação enzimática e como estabilizador da suspensão, utiliza-se a Carboximetilcelulose (CMC). O teste de LAL é rápido sendo finalizado em 1 hora (Ding; Ho, 2001).

O método pode ser automatizado, com resultados mais sensíveis que o método cromogênico. Este método não tem sido aceito como promissor como o método colorimétrico da proteína de Lowry (Palla, 2007).

5.4.2.4. Validação do Método *in vitro*

Esta validação tem como objetivo liberar o produto acabado, com base no limite de endotoxinas e comprovando a sensibilidade do LAL.

Historicamente, fabricantes de parenterais de grande volume têm se dedicado principalmente ao desenvolvimento de ensaios de endotoxina bacteriana devido à problemática de concentrações mínimas de endotoxina bacteriana em soluções administradas em grandes quantidades. Porém, muitos dos problemas atuais se referem à recuperação do controle positivo do padrão de endotoxina, exacerbada pela natureza química dos materiais que estão sendo validados (Williams, 2007).

Os controles são necessários para que um teste seja validado, usando-se controles positivos e negativos (em 2 tubos contendo Endotoxina (controle positivo), adiciona-se a água e a pirogênica (livre de pirogênio). Em 2 outros tubos sem Endotoxina (controle negativo), em um deles adiciona-se água a ser testada e no outro, adiciona-se água a pirogênica. Coloca-se as amostras no banho-maria por 1 hora junto com as amostras a serem testadas. Após este processo, verificam-se os resultados (Santos Et Al, 2000).

A validação do teste é realizada através da inibição ou potencialização da reação de formação do gel. Quando há inibição do gel, ou seja, quando há quantidade suficiente pode ocorrer formação de gel, porém a amostra impede a sua formação, tem-se média geométrica menor que a sensibilidade do LAL (Lourenço; Kaneko; Pinto, 2005).

As características de uma boa validação do ensaio de LAL que contempla em termos gerais, os métodos cinéticos e de formação de gel, incluem ausência de interferência (positivos são positivos e negativos são negativos), solubilidade adequada do produto quando reconstituído e diluído ou simplesmente diluído, demonstração de que o método escolhido não reduz ou destrói a endotoxina que pode estar presente caso sejam empregadas condições drásticas ou solventes, meio de pH neutro da amostra com o reagente LAL (6,0 a 8,0), documentação dos artigos consumíveis no ensaio atestando a condição livre de endotoxina, registros apropriados dos equipamentos utilizados (Williams, 2007).

Após a validação do teste, pode ser aplicado à rotina de trabalho para aprovação ou rejeição dos lotes produzidos. O teste é usado quando a monografia apresenta as especificações para o limite de endotoxina e, na situação de escolha entre os diferentes métodos (gelificação, fotométrico e turbidimétrico), a decisão final é baseada no ensaio de gelificação (Lourenço; Kaneko; Pinto, 2005).

Uma validação deve demonstrar que as amostras não interferem no ensaio de LAL considerando dois fatores importantes: (1) determinação da sensibilidade do LAL e (2) determinação da potencialização ou inibição do teste de LAL (Fukumori, 2008).

5.4.2.5. Fatores de Interferência no Teste de LAL

5.4.2.5.1. Sensibilidade do LAL

A sensibilidade é a habilidade de o método detectar uma amostra verdadeiramente positiva como positiva (Palla, 2007).

A sensibilidade do LAL rotulada é a concentração de endotoxina necessária para causar uma gelificação do reagente LAL. Para garantir a precisão e validade do teste são necessários testes para confirmar a sensibilidade do LAL rotulada assim como testes para verificação de fatores interferente. A confirmação da sensibilidade do LAL é feita utilizando no mínimo 01 frasco de reagente LAL e preparando uma série de diluições de

endotoxina usando o padrão de Endotoxina de referência (RSE) ou o padrão de Endotoxina (CSE), com razão geométrica igual a 2 para obter as concentrações de $0,25 \lambda$, $0,5 \lambda$, λ e 2λ s, onde λ é a sensibilidade declarada do LAL em UE/mL. Executar o teste com as quatro concentrações do padrão de endotoxina em quadruplicata e incluir controles negativos. A média geométrica da concentração do ponto final cujo cálculo e interpretação encontram-se a seguir deve ser maior ou igual a $0,5 \lambda$ e menor ou igual a 2λ . A confirmação da sensibilidade do LAL deve ser realizada para cada novo lote de LAL. O cálculo e interpretação do ponto final de gelificação é o ultimo teste da serie decrescente de concentração de endotoxina padrão que formou gel (Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

5.4.2.5.2. Testes de Inibição e Exacerbação de Resposta

Para que o método de formação de gel seja considerado válido, deve ser confirmado se o produto inibe ou potencializa a reação de LAL para a detecção de endotoxinas. Ocorre inibição quando há quantidade suficiente de endotoxina para a formação de gel, porém a amostra impede a sua formação. Ocorre potencialização quando há formação de gel mesmo sem haver quantidade suficiente de endotoxina (Lourenço; Kaneko; Pinto, 2005)

A inibição ou exacerbação pode ser eliminada com diluição, aquecimento, ajuste de pH, adição de substância que neutralize a inibição ou adição de agente dispersante de endotoxina. Esta inibição/potencialização da resposta deve ser considerada e a avaliação desses efeitos é efetuada contaminando-se a amostra na diluição em que é testada com quantidades determinadas de endotoxina bacteriana, de forma a permitir verificar se a amostra interfere (inibe ou potencializa) a reação de formação do gel (Palla, 2007).

5.4.2.5.3. Limite de Endotoxina

O padrão de referência de endotoxina (RSE) tem sua potência definida de 10.000 Unidades de Endotoxina (EU) por frasco. Constitui-se cada frasco com 5mL de água apirogênica. Agita-se por 30 minutos no vortex e usa-se então este concentrado para fazer diluições em série apropriadas. Mantém-se esta concentração no congelador, para subseqüentes diluições, por não mais de 14 dias (Palla, 2007).

Para produtos parenterais, o limite é correspondente a K/M , onde K é igual a $5Ue/kg$ de peso corpóreo e M é igual à dose máxima humana recomendada por quilograma. Para correlatos, os limites são de $0,5 UE/ mL$ e para aqueles em contato com a medula espinal, o limite é de $0,06 UE/ mL$. São isentos do limite de endotoxina: os produtos para novas aplicações ou produtos biológicos com limites distintos e produtos farmacêuticos ou biológicos, que não possam ser testados pelo método LAL (Palla, 2007).

5.4.2.5.4. Teste de Compatibilidade

O perfil de compatibilidade é uma extensão da pesquisa preliminar para a inibição. A finalidade exclusiva deste perfil é encontrar uma concentração compatível da droga que não iniba ou aumente a recuperação de endotoxina. O passo para encontrar esta compatibilidade é testar uma série de diluições tipo base dois na amostra e identificar a faixa onde o controle positivo do produto é totalmente recuperado (Brum, 2009).

A não interferência do produto é muito importante durante a realização do teste. Se for detectada em primeira instância a interferência do produto, deve-se aplicar a Concentração Máxima Válida (CMV), que consiste numa etapa preliminar para determinar a diluição máxima de um produto na qual a concentração limite de endotoxina possa ser detectada ou a Diluição Máxima Válida (DMV), onde a concentração pode ser calculada (Roslansky; Dawson; Novitsky, 1990).

5.5. Principais Diferenças entre o Ensaio *in vivo* e *in vitro*

Existem numerosas limitações na utilização do teste pirogênio em coelho para determinação do conteúdo em endotoxinas, uma vez que as endotoxinas e os pirogênios se tratam de dois ser bem distintos. A endotoxina é uma molécula contida na parede celular de bactérias Gram-negativas e são pirogênios reconhecidos. Por outro lado, pirogênios propriamente ditos são toda e qualquer substância capaz de desencadear uma resposta febril tanto em humanos como em coelhos, englobando assim muitas outras coisas e situações para além das endotoxinas. As micobactérias, os fungos e os vírus não possuem endotoxinas e são também capazes de causar reações febris. Nós próprios

possuímos pirogênios endógenos, substâncias inerentes ao nosso sistema metabólico capazes de induzir febre. Por exemplo, temos interleucinas que se sabe aumentarem a temperatura corporal na ativação da resposta inflamatória ou hormonas tiroideias e estrogénios capazes de fazerem subir ou descer a temperatura do corpo consoante o estado de atividade. Simultaneamente, agentes pirogênio exógenos quando introduzidos no nosso organismo podem causar uma resposta febril. Bactérias, as suas toxinas, vacinas e outros microrganismos como fungos, vírus e organismos parasíticos podem produzir febre. Sangue e seus derivados quando transfundidos podem determinar a elevação da temperatura corporal, assim como medicação que entre outras reações corporais que causa pode também a incluir.

Em 1959, com a publicação do livro “The principles of humane experimental technique” foi introduzido o conceito dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) no meio científico que consiste na redução do número de animais, refinamento das técnicas experimentais, minimizando o sofrimento do animal e preservando o seu bem estar e, quando possível, a substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro*.

Esse conceito evoluiu como uma tendência mundial, iniciando uma forte pressão com implicações éticas quanto a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no árduo trabalho da validação de métodos alternativos na área de toxicologia (Russel; Burch, 1959; Balls Et Al., 1995).

Por mais de 40 anos o ensaio de pirogênio em coelhos permaneceu invariável e sua efetividade foi pouco questionada. Hoje, para a aprovação e comercialização de grande parte dos produtos farmacêuticos e biotecnológicos administrados por via parenteral, os principais órgãos reguladores internacionais exigem o controle de endotoxina pelo método de LAL (Morales, 2004).

O teste de LAL somente detecta as endotoxinas oriundas de bactérias gramnegativas, consistindo em grande parte da resposta pirogênica. O teste de pirogênio *in vivo* (que detecta o pirogênio total) ainda é mantido, pois existem pirogênios que não são endotoxinas e, portanto, não detectáveis pelo método de LAL.

No entanto, o teste Pirogenio apresenta como desvantagens:

- o gasto de tempo, pois é um teste demorado e trabalhoso, onde se deve medir a temperatura do coelho num intervalo curto de tempo;
- A necessidade de extrapolação entre as espécies de coelhos para os seres humanos apesar do limiar de febre semelhante entre humanos e coelhos. As questões éticas envolvendo o uso de animais em experimentação também pode ser alvo de críticas

tendo em vista a variabilidade biológica dos animais e as interferências que podem levar a uma resposta falso-positiva ou falso-negativa. Como exemplo, podemos citar a elevação de temperatura por estresse causado por um ruído na sala de experimentação, as diferenças de resposta entre raças de coelhos e a influência de fatores ligados ao sexo. A postura que o animal adota na gaiola de contenção, entre outros fatores, pode resultar numa resposta negativa, sem contar com fatores ambientais que devem ser bem controlados (Melandri, et al, 2010).

- É um método inadequado para determinar pirogênios em medicamentos como os esteroides, os utilizados em quimioterapia e outros que pertencem ao grande grupo de substâncias que quando são administradas ao organismo podem responder com mecanismos que causam o aumento da temperatura, sendo esta, outras dos grandes limitadores deste ensaio quando se estão fazendo pesquisas com medicamentos ou se trata do controle de endotoxinas na indústria farmacêutica.

- Uma desvantagem muito grande é o fato de não poder quantificar o conteúdo de endotoxinas presentes em uma amostra mediante este ensaio, que oferece somente um resultado qualitativo.

Já o Teste de LAL é apropriado na substituição do teste de pirogênio para determinados produtos, como água para injeção e medicamentos que não podem ser aplicados em animais. Possui a vantagem de utilizar hemolinfa de animal invertebrado, além de avaliar a contaminação frente a um padrão de endotoxina que permite uma medição semiquantitativa, no caso do método de gelificação ou quantitativa, quando se trata do LAL cromogênico.

Uma das principais desvantagens do teste em LaL é a incapacidade de detectar outros tipos de pirogênio que não sejam gram-negativas e também a capacidade da endotoxina de se ligar a proteínas plasmáticas e não ser detectada no LAL já que este só quantifica endotoxina livre. (Melandri, et AL, 2010)

Uma das maiores vantagens do LAL principalmente do ponto de vista das associações protetoras dos animais é seu uso como uma alternativa de substituição ao teste de pirogênio em coelhos e como consequência redução de aproximadamente 80% dos testes in vivo. Além disso, essa inclusão permite que o LAL, assim como o teste em coelhos, também possa ser usado como referência para estabelecer uma correlação, no processo de validação de novos ensaios in vitro (Schindler Et Al., 2004).

O LAL também apresenta desvantagens, dentre elas, a ineficiência em detectar outros tipos de pirogênios que não sejam de origem Gram-negativa impedindo uma

completa substituição do teste de pirogênio em coelhos, a limitação em relação às interferências de produtos biológicos, tais como soros hiperimunes, vacinas, hemoderivados e amostras ambientais sólidas, e ainda existe a possibilidade da endotoxina se ligar a proteínas plasmáticas e não ser detectada no LAL já que este só quantifica endotoxina livre.

6. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento da tecnologia na área da qualidade, estudos vêm mostrando que é possível a substituição do teste pirogênio *in vivo* por métodos não agressivos aos animais, no entanto, existem algumas particularidades do processo que não permite essa total substituição ainda.

O uso de métodos *in vitro* além de eficaz na maioria dos casos também reduz custos, como por exemplo, o custo com a manutenção dos animais de laboratórios e gasto de tempo para obtenção dos resultados por essas e todas as razões discutidas anteriormente, o ensaio de LAL é o método recomendado atualmente pelas principais empresas farmacêuticas e organismos internacionais que regulam o controle de qualidade dos medicamentos e alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C; POPOVICK, N. G; LOYD, Jr. A. V. Medicamentos parenterais e líquidos estéreis. In _____. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000, cap. 8, p. 317-372.

BARTH, Thiago et al . Avaliação de pirogênios em produtos de uso veterinário pelos testes da hipertermia em coelhos e do lisado de amebócitos do *Limulus*. *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 37, n. 1, p. 190-194, fev. 2007 . Disponível em >. acessos em 02 jul. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000100030>.

BOOMER, J.; RITZ, E. Water quality- a neglected problem in hemodialysis. *Nephron*. v. 46, p. 1-6, 1987.

Brum, Ricardo. Padronização e Validação da técnica do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco Alfa interferona 2b Humana Recombinante. 2009

COOPER, J. F.; LEVIN, J.; WAGNER JUNIOR, H. N. New, Rapid, In Vitro Test for Pyrogen in Short-Lived Radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, v. 11, p. 310, 1970.

DING, J. L.; HO, B. A new era in pyrogen testing. *Trends in Biotechnology*. v. 19, n. 8, p. 277-281, aug. 2001.

ELISSON, S. L. R. Uncertainties in qualitative testing and analysis. *Accred Quality Assurance*. v. 5, p. 346-348, 2000.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1. Disponível em <
http://www.fptl.ru/biblioteka/farmakopei/evropeyskaya_farmakopeya_8_vol-1.pdf >
acesso em 08/07/2017

Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf .acesso em 08/07/2017

Fukumori, Neuza. Determinação De Endotoxina Bacteriana (Pirogênio) Em Radiofármacos Pelo Método De Formação De Gel. Validação. 2008. Dissertação (Mestrado Em Ciências) - Instituto De Pesquisas Energéticas E Nucleares, Autarquia Associada À Universidade De São Paulo, São Paulo¹

Grandics P. Pirogênios em Produtos para uso Parenteral. Pharmaceutical Technology, 2000:12-6.

KANEKO, Telma Mary. Pyrogens, LAL testing, and despyrogenation. Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo , v. 40, n. 2, p. 270, June 2004 . >. Acesso em 15 Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000200022>.

Komski, L. A necessidade de testes LAL para a detecção de endotoxinas. Disponível em <http://www.wakopyrostar.com/blog-pt/post/a-necessidade-de-testes-lal-para-a-detecao-de-endotoxinas/> > acesso em 15 Nov 2016

LEVIN, J.; BANG, F. B. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hospital. v. 115, p. 337-345, may. 1964.

LOURENÇO, F. R.; KANEKO, T. M.; PINTO, T. J. A. Estimativa da Incerteza Melandri, Vanessa et al. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. Universitas Ciências da saúde, v. 8, n. 2 (2010) . Disponível em <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/view/1150/1228> > .acesso em 02 jul. 2017

Método Coagulação em gel – Blog Controle de qualidade em indústria. [online] [capturado em 20/09/2017]. Disponível em <http://controledequalidadeemindustria.blogspot.com.br/2016/08/endotoxinas-bacterianas.html>

Morales RP. Ensayo de lisis de amebocitos del Limulus (LAL). Revista Cubana de Farmacología, Artigos de Revisão, 2004; 38:1-8.

NOLOTAMIPRODJO, G. Validation of the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) p. 161-168, 2004.

PALLA, M.B. Análise De Pirogênio Em Produtos Injetáveis E Soluções Parenterais. Monografia - Centro Universitário Das Faculdades Metropolitanas Unidas – São Paulo, 2007.

PEARSON, F. C. Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation. New York, NY: Marcel Dekker, p. 3-7, 11-14, 23-44, 89- 214, 1985.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. ed., São Paulo: Atheneu , p. 179-215, 2003.

Rocha, Thiago Galdino; Galende, Sharize Betoni. A IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. Revista UNINGÁ Review. Vol.20,n.2,pp.97-103 (2014). Disponível em <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20141106_165613.pdf> acesso em 15 jul 2017

SANTOS, F. et al. Detecção de endotoxina pelo teste do *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) em unidades de hemodiálise. Revista Virtual de Medicina, Rio Grande do Sul, v. 1, ano I, n. 6, Out./ Nov./ Dez., 2000). Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med8/endotox.htm>. Acesso em: 21/09/2017.

Silveira RL et al. Comparative Evaluation of Pyrogens Tests in Pharmaceutical products. Brazilian Journal of Microbiology, 2004; 35:48.

Test for Routine PET Radiopharmaceuticals. Appl. Radiat. Isot., v. 48, p. 51-
Teste de LAL – Rhodel Kabah digital strategist [online] [capturado em 20/09/2017]. Disponível em: <http://rhodel.com/2014/09/this-crabs-blood-could-save-your-life/>

Teste de pirogênio in vivo – Revolução animalista. [online] [capturado em 20/09/2017]. Disponível em: <https://revolucaoanimalistasite.wordpress.com/tipos-de-experimentos/>

UNITED States Pharmacopeia. 24 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. 2569p.

Williams, KL. Endotoxins. Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation. 3rd ed. Indianapolis. Informa Healthcare, 2007

YAMAMOTO, A. et al. Evaluation of the applicability of the bacterial endotoxin test to antibiotic products. Biologicals. v. 28, p. 155-167, 2000.
ZIJLSTRA, S; GERHEN, P; RECHIN, C; WORTMANN, R.;