

FBF0439 – Controle de Qualidade de Medicamentos, Correlatos e Cosméticos

Tema: Controle de Qualidade de Formas Farmacêuticas Estéreis

Obtenção de Produtos Estéreis

As exigências de qualidade microbiológica dos produtos farmacêuticos são diferentes de acordo com suas vias de administração. Os produtos orais e tópicos são referidos como produtos não estéreis. Por outro lado, produtos injetáveis e oftálmicas têm exigência de esterilidade.

O conceito de esterilidade refere-se à ausência de formas viáveis capazes de reprodução. É importante destacar que a condições de esterilidade de um produto deve ser considerada com base no resultado do teste de esterilidade, assim como em seu processamento sob condições ótimas.

Devido a limitação do teste de esterilidade quanto ao aspecto estatístico (mesmo a análise de amostra representativa não tem condição de assegurar a esterilidade do lote) e analítica (limitações na detecção da presença de vírus e micobactérias), atualmente, existe a possibilidade de, considerando-se um rígido processo de obtendo do produto estéril, dispensar a realização do teste de esterilidade (liberação paramétrica).

Os produtos estéreis, tais como medicamentos parenterais, oftálmicos e correlatos, podem ser obtidos por dois tipos de processo: 1) processos de esterilização terminal; ou 2) processo de manipulação asséptica.

Processos de esterilização terminal

Os processos de esterilização terminal, sejam eles físicos (p.e. calor úmido) ou químico (p.e. óxido de etileno), fundamentam-se morte microbiana. Neste contexto, um microrganismo é definido como morto quando não prolifera (cresce) em meios de cultura. Alguns termos matemáticos podem ser utilizados para descrever a cinética de morte microbiana:

1) valor D: é definido no tempo necessário (em minutos) para redução de 90% (ou 1 ciclo log) de uma população de microrganismo específico (p.e. valor D para *Bacillus stearothermophilus*), dada uma condição esterilizante (p.e. calor úmido a 121°C). O valor D é uma medida da resistência microbiana ao processo esterilizante. Usualmente, esporos

bacterianos ($>$ valor D) são mais resistentes aos processos esterilizantes que as bactérias vegetativas, bolores, leveduras e vírus ($<$ valor D).

2) valor Z: é definido como a elevação de temperatura necessária (em °C) para reduzir o valor D em 90% (ou 1 ciclo log). O valor Z permite a integração dos efeitos letais decorrente das variações de temperatura (p.e. durante aquecimento e esfriamento), assim como a comparação da letalidade a diferentes temperaturas.

3) valor F. é definido como o tempo equivalente (em minutos) a temperatura de referência (121°C para calor úmido) de exposição do produto ao processo esterilizante. O valor F é uma medida da efetividade esterilizante. Os indicadores biológicos, microrganismos com alta resistência ao processo esterilizante (p.e. *Bacillus stearothermophilus* para calor úmido) e carga microbiana conhecida (10^6 UFC/unidade), são usualmente utilizados para o cálculo do valor F mínimo necessário.

O planejamento de um processo esterilizante com uma baixa probabilidade de ocorrência de sobreviventes (SAL – Sterility Assurance Level) depende do conhecimento da carga microbiana inicial e da cinética de morte microbiana (valor D e valor Z).

Por exemplo, para obtenção de ciclo de esterilização por calor úmido (121°C) que forneça um SAL de 10^{-6} , considerando-se o emprego de um indicador biológico com carga microbiana inicial de 10^6 UFC/unidade e valor D de 1 minuto, conduz a valor F_{\min} de 12 minutos. Esta configura uma situação de pior caso, que considera microrganismo altamente resistente (indicador biológico / $>$ valor D), além de elevada carga microbiana.

Embora a situação de pior caso confira segurança quanto a eficiência da esterilização, tem-se que se considerar a estabilidade do produto. O emprego de ciclos longos pode comprometer a integridade do produto e, conseqüentemente, sua segurança e eficácia. Desta forma, uma alternativa é considerar a carga microbiana real do produto, assim a determinação experimental de seu valor D, com a finalidade de reduzir o tempo de esterilização. Por exemplo, para obtenção de ciclo de esterilização por calor úmido (121°C) que forneça um SAL de 10^{-6} , considerando-se que o produto apresenta carga microbiana de 10^2 e valor D de 0,5 minuto, conduz a valor F_{\min} de 4 minutos. Ou seja, o mesmo nível de garantia de esterilidade (SAL) é obtido, porém com tempo de esterilização significativamente menor.

Esterilização por calor seco

Processos a calor seco são amplamente utilizados na indústria farmacêutica para a esterilização/despirogenização de frascos-ampola. Usualmente, demandam

temperaturas da ordem de 170-190°C para esterilização e superiores a 250°C para despirogenização. O processo de esterilização a calor seco apresenta desvantagem em relação ao calor úmido, por apresenta menor transferência de calor à carga.

A avaliação da distribuição de temperatura, assim como da distribuição da carga na câmara de esterilização/despirogenização constitui aspecto a ser considerado durante a validação. Esporos de *Bacillus atrophaeus* são utilizados como indicadores biológicos.

Esterilização a calor úmido

O método de esterilização a calor úmido é o mais amplamente utilizado, tanto para a esterilização de produto intermediários quanto para a esterilização terminal. Usualmente, é realizado a temperatura de 121°C ou, alternativamente, a 135°C.

O calor úmido apresenta melhor penetração e transmissão de calor à carga, e por este motivo é importante garantir que a câmara de esterilização esteja saturada de vapor. O emprego de pulsos de vácuo para a retirada de ar seco e subsequente injeção de vapor pode auxiliar no processo de saturação da câmara. Após o término do ciclo, o produto pode apresentar resíduo de água devido a condensação. Este problema pode ser minimizado empregando-se pulsos de vácuo para a retirar do ar úmido e subsequente injeção de ar seco estéril.

A distribuição de calor, assim como a distribuição da carga na câmara de esterilização também constitui aspecto a ser considerado na validação do ciclo. A validação do ciclo frequentemente é realizada com base no conceito de meio ciclo, que empregada indicadores biológicos com carga de 10^6 UFC/unidade. Uma vez que o tempo de exposição necessário para a inativação dos IBs é determinado, aplica-se o dobro deste tempo em ciclos de rotina. O IB empregado é o *Bacillus stearothermophilus*.

Esterilização por óxido de etileno

O óxido de etileno é um gás esterilizante, capaz de promover a alquilação das cadeias proteicas de microrganismos, impedindo a multiplicação celular. A principal vantagem da esterilização por ETO decorre do emprego de baixas temperaturas (cerca de 50°C), o que o torna interessante para produtos termolábeis (p.e. materiais poliméricos).

Entretanto, a esterilização por ETO demanda alguns cuidados ocupacionais, devido sua toxicidade e inflamabilidade. Além disso, na presença de íons cloro, ocorre a formação de etineclorodrina, altamente tóxica. Por este motivo, são necessários períodos de quarentena para assegurar a completa eliminação dos resíduos. O período de

quarentena deve ser determinado a partir da monitorização dos resíduos presentes no produto ao longo do tempo, empregando-se cromatografia gasosa.

As etapas do ciclo abrangem pulso de vácuo para remoção de ar com subsequente injeção de gás ETO até que a concentração esterilizante seja atingida. Ao término do tempo de exposição, são realizados pulsos de vácuo para a remoção do ETO e subsequente injeção de ar. A validação do ciclo também pode ser realizada empregando-se o conceito de meio ciclo, utilizando *Bacillus atrophaeus* como IB. Fatores como temperatura e umidade relativa devem ser considerados, uma vez que impactam na efetividade da esterilização.

Esterilização por irradiação

A esterilização por irradiação é um método físico de esterilização que, usualmente, utiliza fontes radioativas de Cobalto ou Césio, empregado a baixas temperaturas. Diferentemente a esterilização por ETO, não se faz necessário período de quarentena após a exposição a fonte radioativa. Entretanto, a integridade da amostra deve ser verificada frente a dose mínima necessária (em kGy) para a esterilização (calculada em função da carga microbiana do produto).

Uma planta de esterilização por irradiação precisa atender a exigências relativas à segurança ambiental e ocupacional, por exemplo, deve dispor de barreiras de contenção (paredes de concreto) para a fonte radioativa, seu acionamento deve ser automatizado (fonte permanece imersa em água e sua exposição a acionada a distância), deve apresentar sistema de alarme sonoro e visual em caso de falha, dentre outras medidas.

Usualmente, o produto é exposto a fonte de irradiação por meio de esteiras automatizadas, sendo a dose de radiação controlada pelo tempo de exposição (velocidade da esteira). A carga deve ser exposta a fonte radiativa em ambos os lados para garantir que a mesma receba a dose mínima necessária para a esterilização. O IB utilizado é o *Bacillus pumilus*, com valor D de cerca de 3 kGy.

Processos de manipulação asséptica

Os produtos estéreis devem ser, preferencialmente, obtidos por processos de esterilização terminal, uma vez que conferem maior segurança quanto ao atendimento a condições de esterilidade do produto. Entretanto, a esterilização terminal pode não ser

aplicável a diversos produtos (p.e. devido sua natureza termosensível). Nestes casos, os processos de manipulação asséptica são utilizados.

O processo de manipulação asséptica consiste em executar etapas do processo produtivo (p.e. enchimento de pós) com os insumos (p.e. matérias-primas) ou produto intermediário (p.e. solução esterilizada por filtração) estéreis, em ambiente controlado, visando minimizar o risco de recontaminação do produto.

Para que o processo de manipulação asséptica ofereça baixo risco de recontaminação do produto, o mesmo deve ser realizado em ambiente com qualidade microbiológica adequada. Neste sentido, a tecnologia de salas limpas assegura ao ambiente condições para a manipulação asséptica. A área produtiva deve ser construída em material resistente a agentes de limpeza e desinfecção, com paredes lisas para impedir o acúmulo de sujeiras, cantos arredondados que possibilitem fácil acesso para limpeza, além de sistema de ar provido com filtro absoluto tipo HEPA, com pressão positiva. As áreas críticas devem apresentar classificadas quanto ao número de partículas não viáveis.

O treinamento do pessoal envolvido constitui aspecto importante para minimizar o risco de recontaminação do produto. O uso de barreiras físicas, como luvas, gorros, máscaras, vestimentas e calçados específicos são obrigatórios.

Adicionalmente, deve ser considerado um programa de monitoramento ambiental que permita a avaliação da qualidade microbiológica do ambiente (ar e superfície) e do pessoal. O monitoramento da qualidade microbiológica do ar pode ser realizado pelo método de sedimentação gravitacional ou amostragem ativa. A qualidade de superfícies usualmente é realizada por meio de coleta direta empregando swabs ou placas de contato (Rodac). O programa de monitoramento ainda deve considerar a avaliação da qualidade microbiológica do pessoal, com amostragens de luvas, capuz e vestimentas.

Durante o processo de manipulação asséptica, o operador constitui-se uma das principais fontes de risco de recontaminação para o produto. O emprego de isoladores é interessante, uma vez que elimina o contato direto entre operador e produto, reduzindo consideravelmente o risco de recontaminação do produto.

Filtração esterilizante

Embora a filtração esterilizante seja um processo de esterilização propriamente dito, este difere dos demais por consistir em processo de remoção microbiana. Além disso, após a filtração esterilizante, as etapas subsequentes do processo produtivo (p.e. envase) oferecem risco de recontaminação do produto. Por este motivo, a filtração

esterilizante deve ser considerada como etapa pertencente ao processo de manipulação asséptica.

A escolha do filtro esterilizante deve considerar a compatibilidade do produto com o mesmo, assim como a sua capacidade em reter os microrganismos. O teste de desafio bacteriológico consiste em avaliar a retenção efetiva dos microrganismos pelo filtro esterilizante, empregando-se suspensão de *Brevindimonas diminuta* (tamanho reduzido) com carga de 10^7 células por cm^2 de área filtrante. O líquido filtrado é submetido ao teste de esterilidade, não devendo apresentar crescimento microbiano. Além disso, diferentes tipos de filtros podem ser combinados (utilizados em série) de forma a permitir a remoção de vírus e endotoxinas bacterianas.

Validação de processos assépticos (media fill)

A validação de processos de manipulação asséptica é realizada por meio da simulação do processo (*media fill*). O *media fill* constitui-se na execução de todas as etapas do processo de manipulação asséptica (inclusive a filtração esterilizante), empregando-se meio de cultura ao invés do produto. As unidades de frascos contendo o meio de cultura são incubados e verificados quanto a presença/ausência de crescimento.

Aspecto importante para a realização do teste de *media fill* diz respeito a seleção do meio de cultura (líquido ou sólido), as condições de incubação (tempo e temperatura), número de unidades a serem produzidas e aos limites de unidades que podem apresentar crescimento microbiano. Recomenda-se que toda a execução do *media fill* seja registrada para que possa auxiliar na investigação de possíveis unidades com crescimento microbiano.

Uma das principais limitações do *media fill* reside no fato de retratar apenas o momento de sua execução. Por este motivo, recomenda-se que o *media fill* seja realizado considerando-se a situação de pior caso, com alto número de operadores, troca de turno, manutenção de equipamentos e trocas de peças. Desta forma, espera-se que em condições usuais de operação, o processo de manipulação asséptica apresente baixo risco de recontaminação do produto.

Teste de esterilidade

Ambiente para realização do teste

Para que o teste de esterilidade seja válido, o mesmo deve ser realizado em ambiente com qualidade microbiológica adequada, de forma a evitar resultados falso-positivos. O teste de esterilidade deve ser realizado em fluxo laminar, mantido em sala limpa. A área deve dispor de antecâmara, ser construída em material resistente a agentes de limpeza e desinfecção, com paredes lisas para impedir acúmulo de sujeiras, com cantos arredondados para fácil limpeza, sistema de ar provido com filtros tipo HEPA, pressão positiva, e serem classificadas quanto ao número de partículas não-viáveis.

O treinamento do pessoal envolvido constitui aspecto importante para minimizar o risco de resultados falso-positivos. O uso de barreiras físicas (luvas, gorros, máscaras, vestimentas e calçados específicos) é obrigatório.

Adicionalmente, deve ser considerado um programa de monitoramento ambiental que permita a avaliação da qualidade microbiológica do ambiente (ar e superfície) e do pessoal envolvido na realização do teste de esterilidade. O monitoramento da qualidade microbiológica do ar pode ser realizado pelo método de sedimentação gravitacional ou amostragem ativa. A qualidade de superfícies usualmente é realizada por meio de coleta direta empregando swabs ou placas de contato. O programa de monitoramento ainda deve considerar a avaliação da qualidade microbiológica do pessoal, com amostragens de luvas, capuz e vestimentas.

Amostragem

A condição de esterilidade de um lote pode ser assegurada apenas se todas as unidades foram testadas. Entretanto, a análise de todo o lote é impossível, uma vez que o teste é destrutivo, além de inviável do ponto de vista operacional. Portanto, os critérios de amostragem devem ser seguidos rigorosamente a fim de aumentar a segurança no resultado final.

A segurança do resultado do teste de esterilidade será tanto maior quanto maior for a quantidade de unidades ensaiadas. As principais farmacopeias apresentam tabelas de amostragem para o número de unidades a serem testadas, assim como do volume de cada unidade a ser utilizada no teste. É importante considerar que, no contexto do teste de esterilidade, o conceito de lote refere-se ao total de unidades com igual risco de contaminação.

Anteriormente a execução do teste de esterilidade, as amostras devem ser preparadas levando-se em conta alguns cuidados necessários para evitar resultados falso-positivo. A preparação das amostras inclui a desinfecção da superfície externa de frascos, ampolas ou outros materiais de acondicionamento.

Inoculação direta

O método de inoculação direta consiste na transferência de quantidades ou volumes preestabelecidos das amostras para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido. Amostras que apresentem atividade antimicrobiana (p.e. contendo antibióticos ou conservantes) devem ser inativadas, pois esta atividade pode ocasionar resultado falso-negativo. Amostras insolúveis no meio de cultura podem ocasionar dificuldades em diferenciar a turvação original da amostra daquela decorrente de crescimento microbiano. Neste caso, recomenda-se que sejam transferidas alíquotas do meio original para um novo tubo, com subsequente incubação dos mesmos (subcultura).

Dentre as vantagens do método de inoculação direta destacam-se sua simplicidade, pouca manipulação da amostra e baixo nível de contaminação acidental. Sua limitação reside na probabilidade de se aprovar lote contaminado, em razão da amostragem restrita e do risco de atividade inibitória exercida pela presença da amostra no meio de cultura.

Inoculação indireta

O método de inoculação indireta baseia-se no tratamento prévio da amostra com solubilização ou lavagem em líquidos fisiológicos, seguida de filtração esterilizante e inoculação da membrana filtrante no meio de cultura. Com isso, o produto a ser testado não entra em contato com o meio de cultura. Considerando-se as múltiplas manipulações da amostra durante o método de inoculação indireta, as condições do ambiente devem ser muito bem controladas para reduzir o risco de contaminação acidental. Visando minimizar este problema, atualmente, existem sistemas fechados para a realização do teste de esterilidade, que apresentam vantagens consideráveis em relação aos métodos convencionais. Estes sistemas consistem num conjunto de mangueiras estéreis acopladas a bombas peristálticas que permitem a transferência e filtração da amostra sem contato com o ambiente externo.

As vantagens do método de inoculação indireta constituem em maior representatividade da amostra testada, redução de falso-negativos e possibilidade de

análise de produtos com diferentes volumes (por exemplo, desde ampolas com 1 mL ou menos até parenterais de grande contendo 5 L). Dentre as desvantagens, destacam-se o maior nível de manipulação e preparações prévias, o que demanda maior treinamento e aumenta o risco de resultados falso-positivos. O emprego dos sistemas fechados minimiza alguns destes aspectos, principalmente relacionado ao risco de resultados falso-positivos.

Meios de cultura, temperatura e tempo de incubação

O teste de esterilidade tem por finalidade detectar microrganismos contaminantes em produtos submetidos a processo de esterilização (processo de morte microbiana ou remoção microbiana) ou enchimento asséptico. No entanto, não se sabe qual o tipo microrganismo estará presente na amostra. Além disso, quanto submetido a condições extremas usualmente empregadas nos processos esterilizantes, um eventual contaminante residual viável apresentará alterações morfológicas significativas. Diante do exposto, os meios de cultura utilizados no teste de esterilidade devem promover o crescimento de diversos tipos de microrganismos.

O meio caldo de tioglicolato, incubado a 30-35°C, contém pequena quantidade de agar que gera condição propícia para o crescimento de bactérias mesofílicas anaeróbicas (fundo do tubo) e mesofílicas anaeróbicas (topo do tubo). O meio caldo caseína-soja, incubado a 20-25°C, apresenta composição rica que permite o crescimento de bactérias psicrófilas aeróbicas, bolores e leveduras.

Considerando que o baixo nível de uma eventual contaminação, além do fato do microrganismo apresentar-se debilitado em função de sua exposição às condições extremas de esterilização, faz-se necessário período de incubação de 14 dias, tanto para o meio caldo tioglicolato quanto para o meio caldo caseína-soja.

Interpretação do resultado

Os tubos devem ser observados durante todo o período de incubação quanto a presença de crescimento, evidenciadas pela turbidez do meio de cultura. Se não houver evidência de crescimento microbiano, o produto atende ao teste de esterilidade. Se houver evidência de crescimento microbiano, o produto não atende ao teste de esterilidade.

O teste deve ser considerado inválido se houver falhas nos controles negativo ou positivo, ou quando for constatado que o crescimento presença na amostra pode ser atribuído inequivocamente ao ambiente, pessoal ou materiais contaminados. Neste caso, o teste deve ser desconsiderado e um novo teste deve ser realizado.

É importante descartar que as condições de esterilidade de um produto deve ser considerada com base no resultado do teste de esterilidade, assim como em seu processamento sob condições ótimas, seja este obtido por esterilização terminal ou enchimento asséptico.

Validação (adequação) do teste de esterilidade

Os meios de cultura, assim como os dispositivos e materiais auxiliares devem ter sua esterilidade confirmada, com a finalidade de conferir segurança quanto a ocorrência de resultados falso-positivos. A confirmação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura constitui-se etapa fundamental para a validade do resultado do teste de esterilidade. Eventuais falhas quanto a capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura pode ocasionar em resultados falso-negativos.

Alguns produtos (p.e. contendo antibióticos ou conservantes) apresentam atividade antimicrobiana, que, se não neutralizada ou inativada, pode levar a ocorrência de resultados falso-negativos. A neutralização da atividade antimicrobiana usualmente é realizada por diluição, inativação química, filtração, ou pela combinação destes procedimentos. O procedimento envolve a inoculação das amostras (diretamente no meio de cultura, no caso de inoculação direta; ou na última porção de lavagem da membrana filtrante, no caso de inoculação indireta) com cerca de 100 UFC dos microrganismos recomendados. O crescimento microbiano obtido deve ser semelhante àquele obtido na ausência de produto. Se o crescimento microbiano obtido for menor àquele observado na ausência de produto, o procedimento de neutralização deve ser ajustado (por exemplo, aumentando-se o número de lavagens ou utilizando-se outro tipo de neutralizante químico ou enzimático) e a avaliação da atividade bacteriostática /fungistática da amostra deve ser repetida.

Recomenda-se o emprego de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas para a confirmação da capacidade promotora de crescimento de meio caldo tioglicolato. Para o meio caldo caseína-soja, recomenda-se que a capacidade promotora de crescimento seja avaliada com o emprego de bactérias, bolores e leveduras.

Pirogênio e endotoxinas bacterianas

Os medicamentos injetáveis devem, além de apresentar a característica de esterilidade, atender aos limites quanto a presença de substâncias pirogênicas, principalmente as endotoxinas bacterianas.

Pirogênios são substâncias capazes de induzir elevações térmicas, em resposta a injeção, em animais e humanos, e são classificados em endógeno ou exógeno. O pirogênio endógeno é produzido pelo próprio organismo em resposta ao pirogênio exógeno. Os pirogênios exógenos são provenientes de bactérias, fungos e vírus, sendo as endotoxinas bacterianas a principal fonte de preocupação para a indústria farmacêutica.

As endotoxinas bacterianas são complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas. Quimicamente, as endotoxinas bacterianas são lipopolissacarídeos (LPS), constituídas por lipídeo A, cadeia fundamental e cadeia O-específica. O lipídeo A é responsável pela atividade pirogênica das endotoxinas bacterianas. O mecanismo de indução da febre envolve a fagocitose do lipídeo A, o que induz a produção de pirogênio endógeno. Por sua vez, o pirogênio endógeno atua no centro termorregulador do hipotálamo, promovendo febre.

A despirogenização pode ser obtida por inativação (hidrólise ácida/alcalina, oxidação/alquilação ou calor seco) ou remoção das endotoxinas bacterianas (destilação, ultrafiltração, osmose reversa, atração eletrostática e atração por membrana hidrófoba). A inativação consiste em tratamento químico que proporcione a quebra de ligações da molécula de LPS ou bloqueie os sítios necessários para a atividade pirogênica. A remoção de endotoxinas ocorre por diferentes métodos, baseados nas características do LPS, como tamanho, peso molecular, carga eletrostática ou afinidade do LPS com diferentes superfícies.

A detecção/quantificação de endotoxinas bacterianas em produtos farmacêuticos e biológicos pode ser realizada empregando-se métodos *in vivo* ou *in vitro*.

Teste de pirogênio pelo método *in vivo*

O teste de pirogênio foi delineado para limitar a um nível aceitável os riscos de reação febril no paciente após a administração intravenosa (ou intratecal) do produto farmacêutico. O teste envolve a medição do aumento da temperatura de coelhos após a injeção intravenosa de uma solução de teste.

Dentre os diferentes mamíferos experimentados como reagente biológico para a detecção de substâncias pirogênicas, o coelho foi o modelo animal escolhido por apresentarem sistema termorregulador com características semelhantes ao do ser humano, além de permitir melhor constatação de elevação de temperatura diante da presença de substâncias pirogênicas.

É importante que os animais sejam submetidos a uma triagem quanto à resposta febril, mediante inoculação de substâncias pirogênicas. A triagem dos animais é etapa fundamental para minimizar o risco de respostas falso-negativas.

Por outro lado, existe preocupação quanto às respostas falso-positivas. Usualmente, a endotoxina bacteriana promove pico máximo de elevação de temperatura entre 60 e 90 minutos após a injeção, enquanto que o perfil de elevação de temperatura em casos de resultados falso-positivos ocorre após 3 horas ou mais. Esta diferença no perfil de elevação de temperatura é importante para diferenciar uma resposta devido a presença de endotoxina bacteriana de um resultado falso-positivo.

Todo material empregado durante a realização do teste, tais como vidrarias empregadas na preparação das amostras, seringas e agulhas utilizadas para a injeção das amostras, devem ser previamente despirogenizados. Usualmente, recomenda-se o uso de processos térmicos de despirogenização.

No teste de pirogênio em coelhos, cada grupo de animais recebe injeção intravenosa da amostra e é observado durante um período de 3 horas. Durante este período, os animais usualmente permanecem em contenção cervical, em posição confortável. A monitoração da temperatura durante o teste é realizada pela inserção retal de termômetro ou termopar, a uma profundidade de 6 a 7,5 cm.

Recomenda-se que, anteriormente a realização do teste, seja realizado condicionamento dos animais e avaliação do controle da temperatura fisiológica, com a finalidade de reduzir o risco de resultados falso-positivos. Evidentemente, teste de pirogênio em coelhos não é aplicável a produtos que contêm fármacos antitérmicos, pois podem fornecer resultado falso-negativo.

A amostra será aprovada se nenhum coelho apresentar elevação de temperatura corporal superior ou igual a 0,5°C. Se esta condição não for atendida, a amostra deve ser retestada empregando-se mais cinco coelhos. Neste caso, não mais que três coelhos podem apresentar elevação da temperatura corporal maior ou igual a 0,5°C e a somatória da elevação térmica para os oito coelhos não deve exceder 3,3°C para que a amostra seja aprovada.

Determinação de endotoxinas bacterianas por método *in vitro*

No fim do século XIX, observou-se a ocorrência de coagulação em gel sólido do sangue do caranguejo em forma de ferradura *Limulus polyphemus*. Estudos revelaram que os amebócitos estavam envolvidos com este fenômeno de coagulação, ocasionada por bactérias marinhas Gram-negativas. A partir destes estudos, demonstrou-se que o nível de gelificação dos lisados de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus* (LAL) está diretamente relacionado a concentração de endotoxinas de bactérias Gram-negativas.

O processo de coagulação é comparável a uma cascata de coagulação sanguínea em mamíferos, sendo que a formação do gel mediada pela ativação sequencial de três proteases: fator B, fator C e proenzima de coagulação. A reação enzimática é dependente da ativação de enzima de alto peso molecular pela endotoxina, que por sua vez gelifica proteínas coaguláveis de baixo peso molecular. Esta reação é crítica na definição do ponto final no teste LAL.

O lisado dos amebócitos do *Limulus polyphemus* (LAL) é preparado a partir da sangria dos caranguejos. Usualmente é empregado N-etilmaleimida 0,125% em solução de 3% de cloreto de sódio como anticoagulante. A mistura é centrifugada e o sobrenadante contendo hemocianina é desprezado. Os amebócitos são lavados com cloreto de sódio 3% para remoção do anticoagulante e submetidos a choque osmótico pela adição de água destilada apirogênica. O produto obtido é liofilizado e padronizado quanto a sua sensibilidade (λ) frente a endotoxinas bacterianas provenientes de *Escherichia coli*.

A endotoxina ativa uma cascata enzimática presente no LAL que promove a formação de gel. O método mais simples e amplamente usado baseia-se na gelificação de ponto final. O teste LAL de gelificação de ponto final usualmente é empregado como um ensaio limite, que indica se a quantidade de endotoxina presente está acima ou abaixo da sensibilidade do LAL.

Volumes iguais de reagente LAL e solução teste (0,1 mL de cada) são transferidos para tubos (10 x 75 mm) de ensaios apirogênicos. A mistura é suavemente homogeneizada e incubada por 60 minutos a 37°C em banho de água. A leitura do resultado é realizada invertendo-se cuidadosamente cada tubo a 180° para verificação ou não de formação de gel. A formação de gel que se mantém firme durante a inversão do tubo indica presença de endotoxina acima do limite de sensibilidade do LAL. Por outro lado, a não formação de gel indica que a quantidade de endotoxina está abaixo do limite

de sensibilidade do LAL. Recomenda-se o empregado de controle positivos e negativos para confirmar a validade dos resultados obtido com o teste LAL.

Substâncias presentes na amostra podem inibir ou exacerbar a reação de formação de gel, o que pode levar a um resultado false negativo ou falso positivo, respectivamente. Por este motivo, o potencial de interferência da amostra no teste LAL deve ser avaliado como parte da validação do teste. Caso a amostra interfira no teste LAL, é possível diluir a amostra para reduzir a interferência, desde que seja respeitada a máxima diluição válida. A máxima diluição válida (MDV) é calculada em função da concentração do princípio ativo na amostra (mg/mL), do limite de endotoxina para o princípio ativo (EU/mg) e da sensibilidade (λ) do LAL (EU/mL). Quando o produto é diluído além da MDV, é possível que o reagente LAL não detecte a presença de endotoxinas bacterianas por estar em concentração abaixo de sua sensibilidade. Neste caso, não é possível garantir que a amostra atenda ao limite de endotoxina, o que invalida o teste LAL.

A interferência da amostra também pode ser eliminada com aquecimento (degradação da substância interferente, sem que haja degradação de endotoxina bacteriana), ajuste de pH (amostras com pH muito ácido ou alcalino podem inativar as enzimas que constituem o reagente LAL) ou adição de substância que neutralize a interferência da amostra (por exemplo a adição de EDTA pode quelar metais bivalentes que potencializam a formação do gel).

Quantificação de endotoxinas bacterianas por métodos *in vitro*

Embora o teste de LAL de gelificação de ponto final seja o mais comumente utilizado, outros métodos para a quantificação de endotoxina baseados na ativação da cascata enzimática do LAL podem ser empregados.

O ensaio turbidimétrico é um método de quantificação de endotoxina baseado no aumento da turbidez em razão da precipitação de coagulogênio no lisado. O ensaio cromogênico baseia-se na clivagem de substrato cromogênico em função da ação amidase da enzima de coagulação ativada. A clivagem do substrato cromogênico leva a formação de p-nitroanilina, substância de coloração amarela, proporcionalmente a concentração de endotoxina bacteriana.

Ambos os ensaios turbidimétricos e cronogênicos podem ser realizados com leitura de ponto final (a turbidez ou coloração da mistura é determinada por espectrofotometria após período de incubação) ou cinética (a turbidez ou coloração da

mistura é determinada ao longo de todo período de incubação, em intervalos de tempo preestabelecidos).