

FBF0351 – Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos

Tema: Pirogênio e Endotoxina

Introdução

A qualidade microbiológica de medicamentos deve ser avaliada de forma a garantir sua eficácia e segurança, de acordo com sua via de administração. Do ponto de vista da qualidade microbiológica, os medicamentos podem ser classificados como estéreis e não estéreis. 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 à 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 a pirogênica. 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 falso 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).

Outros métodos para análise de endotoxinas bacterianas

A análise de endotoxinas bacterianas em águas para fins de saúde (por exemplo, água para hemodiálise) constitui aspecto importante, as unidades de saúde usualmente não possuem estrutura que permita a adoção do teste LAL convencional. Por outro lado, o transporte de água para os laboratórios analíticos demanda o controle de temperatura para que as características da amostra são mantidas de forma a não comprometer a confiabilidade dos resultados do teste LAL. Considerando-se este contexto, foi desenvolvido equipamento portátil para quantificação de endotoxina, o Portable Test System (PTS). O PTS constitui-se de um equipamento ao qual é afixado um cartucho acrílico contendo reagente LAL liofilizado. Em contato com a amostra líquida ocorre reação cromogênica proporcional a quantidade de endotoxina bacteriana. O resultado da reação cromogênica é comparado com curva de calibração arquivada na memória do equipamento. O resultado do teste é obtido em cerca de 15 minutos. A principal vantagem do PTS está na possibilidade de analisar as amostras de água no ponto da coleta. Estudos recentes demonstraram a aplicabilidade do PTS para detecção de endotoxinas bacterianas em radiofármacos.