

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (PIROGÊNIO) EM
RADIOFÁRMACOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DE GEL.
VALIDAÇÃO.**

NEUZA TAEKO OKASAKI FUKUMORI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora: Dra. Constancia Pagano
Gonçalves da Silva

SÃO PAULO
2008

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, por possibilitar a realização deste trabalho.

À Dra. Constanca Pagano Gonçalves da Silva, mulher valorosa, excelente profissional, pioneira no desenvolvimento da Radiofarmácia no Brasil e minha orientadora, pela convivência harmoniosa, pelos ensinamentos, pelo exemplo de vida, conselhos, apoio e confiança em mim depositados contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Nilda Petrona Sosa de Pereira, minha amiga, pelo apoio, pelo incentivo, pela paciência, por me conduzir nos primeiros passos da radiofarmácia, pelos ensinamentos, conselhos e maravilhosas experiências de vida transmitidos.

Ao MSc. Jair Mengatti, gerente do Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP, pelo inestimável apoio e colaboração.

À Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda, pelos conselhos, ensinamentos e colaboração durante a execução do trabalho.

À querida Adriana Vidal Fernandes pelo inestimável apoio, carinho e colaboração na parte experimental e análise estatística.

Aos funcionários do Centro de Radiofarmácia, especialmente Domingos Gomes de Campos e Natanael Gomes da Silva, que muito contribuíram na realização deste trabalho,

A todos os colegas e professores das disciplinas de pós-graduação do IPEN, pelo agradável convívio, incentivo, amizade e conhecimentos adquiridos.

À Luzia de Fatima Pereira, funcionária da Alko do Brasil, fornecedora da maior parte do material utilizado nos experimentos, pelo inestimável apoio e colaboração.

À minha querida família, pelo amor, compreensão e encorajamento em todos os momentos de minha vida.

"...se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares, então, entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus."

(Provérbios 2:4-5)

DETERMINAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (PIROGÊNIO) EM RADIOFÁRMACOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DE GEL. VALIDAÇÃO.

Neuza Taeko Okasaki Fukumori

RESUMO

Antes do Ensaio do Lisado de Amébócitos do *Limulus* (LAL), a única forma de se avaliar a pirogenicidade em drogas parenterais e dispositivos médicos era o ensaio de pirogênio em coelhos da Farmacopéia Americana (USP). Especialmente para radiofármacos, o ensaio LAL é a escolha para a determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio). O objetivo deste trabalho foi validar o método de formação de gel para alguns radiofármacos sem uma interferência mensurável. O guia do método LAL do *Food and Drug Administration* (FDA) define interferência como uma condição que causa uma diferença significativa entre os pontos finais de gelificação das séries de controle positivo da água e controle positivo do produto utilizando-se um endotoxina padrão. Os experimentos foram realizados de acordo com o teste de endotoxinas bacterianas da USP na m-iodobenzilguanidina-¹³¹I, nos radioisótopos Gálio-67 e Tálio-201, nos reagentes liofilizados DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal. A Máxima Diluição Válida (MDV) foi calculada para cada produto com base na sua dose clínica e diluições seriadas abaixo da MDV foram avaliadas em duplicata para a detecção de interferências. A sensibilidade declarada do reagente de LAL foi de 0,125 UE mL⁻¹ (Unidades de Endotoxina por mililitro). Para a validação, uma série de diluições foi feita utilizando-se padrão de endotoxina (PE) nas concentrações de 0,5 a 0,03 UE mL⁻¹ para a confirmação da sensibilidade do reagente de LAL, em quadruplicata. A mesma série de diluições foi feita com o PE e o produto diluído 100 vezes em três lotes consecutivos de cada radiofármaco. Os produtos m-iodobenzilguanidina-¹³¹I, Gálio-67, Tálio-201, DTPA, SAH e Sn Coloidal foram compatíveis com o método no fator de diluição 1:100. Fitato e GHA apresentaram interferência no ensaio de formação de gel. Outras técnicas para determinar endotoxinas como o ensaio cromogênico (desenvolvimento de cor) e o turbidimétrico (desenvolvimento de turbidez) foram avaliadas para obter informações qualitativas e quantitativas sobre as concentrações de endotoxinas nas amostras.

DETERMINATION OF BACTERIAL ENDOTOXIN (PYROGEN) IN RADIOPHARMACEUTICALS BY THE GEL CLOT METHOD. VALIDATION.

Neuza Taeko Okasaki Fukumori

ABSTRACT

Before the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test, the only available means of pyrogenicity testing for parenteral drugs and medical devices was the United States Pharmacopoeia (USP) rabbit pyrogen test. Especially for radiopharmaceuticals, the LAL assay is the elective way to determine bacterial endotoxin. The aim of this work was to validate the gel clot method for some radiopharmaceuticals without measurable interference. The FDA's LAL-Test guideline defines interference as a condition that causes a significant difference between the endpoints of a positive water control and positive product control series using a standard endotoxin. Experiments were performed in accordance to the USP bacterial endotoxins test in the ^{131}I -m-iodobenzylguanidine; the radioisotopes Gallium-67 and Thallium-201; the lyophilized reagents DTPA, Phytate, GHA, HSA and Colloidal Tin. The Maximum Valid Dilution (MVD) was calculated for each product based upon the clinical dose of the material and a twofold serial dilution below the MVD was performed in duplicate to detect interferences. The labeled sensitivity of the used LAL reagent was 0.125 EU mL^{-1} (Endotoxin Units per milliliter). For validation, a dilution series was performed, a twofold dilution of control standard endotoxin (CSE) from 0.5 to 0.03 EU mL^{-1} , to confirm the labeled sensitivity of the LAL reagent being tested in sterile and non pyrogenic water, in quadruplicate. The same dilution series was performed with the CSE and the product in the 1:100 dilution factor, in three consecutive batches of each radiopharmaceutical. The products ^{131}I -m-iodobenzylguanidine, Gallium-67, Thallium-201, DTPA, HSA and Colloidal Tin were found compatible with the LAL test at a 1:100 dilution factor. Phytate and GHA showed some interference in the gel clot test. Other techniques to determine endotoxins as the chromogenic (color development) and the turbidimetric test (turbidity development), were also assessed to get valuable quantitative and qualitative information about the endotoxin concentration in samples.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Radiofármacos	11
1.2 Pirogênio e Endotoxina	14
1.3 Estrutura, Função e Atividade da Endotoxina	16
1.4 Processos de Despirogenização	18
1.5 Ensaio de Pirogênio pelo Método <i>in vivo</i>	22
1.5.1 Histórico	23
1.6 Determinação de Endotoxinas Bacterianas pelo Método <i>in vitro</i>	24
1.6.1 Histórico	27
1.7 Validação do Ensaio do LAL	30
1.8 Interferências	32
1.9 Outros Métodos para Determinação de Endotoxina	34
1.9.1 Método Turbidimétrico Quantitativo	34
1.9.2 Método Colorimétrico de Proteína	35
1.9.3 Método Nefelométrico	35
1.9.4 Método Cromogênico Quantitativo	35
2 OBJETIVO	37
3 REVISÃO DA LITERATURA	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Materiais	42
4.1.1 Materiais Utilizados no Método <i>in vitro</i> de Determinação de Endotoxina por Formação de Gel	42
4.1.2 Materiais Utilizados no Método Cromogênico–PTS de Determinação de Endotoxina Bacteriana	42
4.1.3 Materiais Utilizados no Método Turbidimétrico de Determinação de Endotoxina Bacteriana	44
4.2 Métodos	44
4.2.1 Método de Formação de Gel	44
4.2.1.1 Preparação das Diluições Sucessivas de Padrão de Endotoxina.	46
4.2.1.2 Preparação das Diluições Sucessivas do Produto com Padrão de Endotoxina	46
4.2.1.3 Determinação da Sensibilidade do Reagente LAL	47

4.2.2 Método Cromogênico - PTS	48
4.2.3 Método Turbimétrico	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Validação dos Produtos pelo Método de Formação de Gel	50
5.1.1 Cálculo de MDV	50
5.1.2 Inibição ou Potencialização	51
5.1.3 Séries de Diluição do Padrão de Endotoxina	54
5.1.3.1 Determinação da Sensibilidade do Reagente LAL	54
5.2 Validação pelo Método Cromogênico – PTS	56
5.2.1 Cálculo de MDV	58
5.2.2 Inibição ou Potencialização	58
5.3 Validação pelo Método Turbimétrico	66
5.3.1 Cálculo de MDV	66
5.3.2 Inibição ou Potencialização	66
6 CONCLUSÕES	73
ANEXO 1 - Modelo de Ficha para Validação	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDRH	Center for Devices and Radiological Health
CEP	Concentração de Endotoxina no Produto
CPP	Controle Positivo do Produto
CV	Coeficiente de Variação
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
FDA	Food and Drug Administration
GHA	Glucoheptonato de Cálcio
HIMA	Health Industry Manufacturers Association
IgG	Imunoglobulina G
KTS	Sistema Cinético Turbidimétrico
LAL	Lisado do Amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MBq	Megabecquerel
MCV	Mínima Concentração Válida
MDV	Máxima Diluição Válida
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
nm	Nanômetro
PE	Padrão de Endotoxina
PET	Tomografia por Emissão de Póstron
pNA	<i>para</i> -nitroanilina
PRE	Padrão de Referência de Endotoxina
PTS	Sistema de Teste Portátil
RCCP	Recuperação do Controle Positivo do Produto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAH	Soro Albumina Humano
UE	Unidade de Endotoxina
USP	Farmacopéia Americana

1 INTRODUÇÃO

O conceito de controle total de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos consiste no esforço organizado dentro de uma empresa, no sentido de projetar, produzir, manter e assegurar as características especificadas em cada unidade do produto distribuído para comercialização. A atividade de prover, em toda a amplitude, a evidência necessária para estabelecer confiabilidade de que a função qualidade está sendo adequadamente efetuada e administrada faz parte do Sistema de Gestão da Qualidade.[1]

A preocupação relativa à qualidade, quando associada à atividade produtiva, foi sempre inerente ao ser humano, que busca aperfeiçoar, desenvolver, superar limites, independentemente da atividade que exerça, a fim de atender aos anseios da sociedade.[1]

Na fabricação de produtos estéreis devem ser tomadas medidas para se evitar a contaminação, tanto particulada como microbiana.[1,2] A área produtiva deve seguir rígidos conceitos de engenharia, deve apresentar paredes e teto lisos e impermeáveis; superfícies e equipamentos devem ser de fácil limpeza e construídos de material que resista à desinfecção química. Deve ser previsto sistema de circulação e de tratamento de ar que auxilie na manutenção da limpeza da área, promovendo renovações expressas em número de vezes que o volume total do ar da sala é trocado por hora.[1]

Para garantir que os produtos farmacêuticos tenham e mantenham as características de estrutura, identidade, pureza, concentração, potência e inocuidade requeridas para o seu uso existe um conjunto de normas e atividades relacionadas entre si denominado Boas Práticas de Fabricação (BPF). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária é o órgão normativo que regulamenta as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos por meio da RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 210, de 04 de agosto de 2003.[3]

A abrangência das Boas Práticas de Fabricação está direcionada às instituições da área de saúde e também à atividade industrial dos produtores de medicamentos, correlatos, cosméticos, domissanitários e alimentos.[1]

Para estabelecer evidência documentada, que proporcione com alto grau de segurança, de que determinado procedimento quando executado sob condições pré-estudadas e definidas seja capaz de reproduzir um serviço ou bem dentro das especificações e qualidade desejáveis, as BPF recomendam que seja realizada a validação dos processos e das metodologias analíticas. É parte integrante do Sistema de Qualidade e tem por escopo a confiabilidade dos processos e sistemas. [1,4]

1.1 Radiofármacos

Todo produto a ser administrado em humanos deve reunir requisitos de qualidade, segurança e eficácia. Os radiofármacos devem cumprir os requisitos exigidos aos produtos farmacêuticos convencionais, como as BPF e ainda outros específicos, por se tratarem de substâncias radioativas.[5]

Radiofármaco é um medicamento especial ou produto que, quando pronto para uso, contém um radioisótopo em sua constituição e é utilizado em seres humanos para o diagnóstico e tratamento de enfermidades.[6,7]

Com uma filosofia similar, as Boas Práticas de Fabricação em Radiofarmácia ou Boas Práticas Radiofarmacêuticas são recomendações ou conjunto de normas e atividades que conjugam os princípios das BPF e as normas de Proteção Radiológica. As Boas Práticas Radiofarmacêuticas destinam-se a garantir que os produtos terminados de uso radiofarmacêutico tenham e mantenham as características necessárias para a utilização segura e correta dos radiofármacos a serem administrados nos seres humanos no âmbito dos serviços de Medicina Nuclear.[6]

A maioria dos radiofármacos utilizados é administrada aos pacientes por via parenteral e, portanto, devem ser estéreis e livres de pirogênio.[6,7] Além disso, a

preparação do radiofármaco é feita com o uso de soluções radioativas, sendo mister que se tomem medidas necessárias para evitar contaminação direta do operador e do ambiente de trabalho.[6]

Embora o termo radiofármaco seja o mais usado, outras designações, a saber, radiotraçador, agente radiodiagnóstico ou simplesmente traçador também são encontradas.[7]

O radiofármaco deve ser seguro e não tóxico para administração em humanos, as radiações emitidas pelo radioisótopo devem ser facilmente detectadas por instrumentos adequados e a dose de radiação ao paciente deve ser mínima.[7]

Os radioisótopos utilizados em medicina nuclear são na sua maioria, artificiais e são produzidos principalmente em ciclotron ou reator.[7,8]

Os compostos marcados com radioisótopos emissores β^- têm sido utilizados em experimentos *in vitro* e em terapia, enquanto que os que são marcados com emissores γ e β^+ possuem aplicações mais amplas e são úteis na obtenção de imagens *in vivo* de diferentes órgãos.[7]

Mais de 80% dos radiofármacos usados em medicina nuclear são compostos marcados com tecnécio-99m (^{99m}Tc). O seu uso clínico decorre de suas características físicas favoráveis. A meia vida física de 6 horas e a baixa porcentagem de emissão de elétrons permitem a administração de miliCuries de ^{99m}Tc sem uma dose de radiação significativa ao paciente. Os fótons monocromáticos de 140 keV são colimados e fornecem imagens com boa resolução espacial. Além disso, o ^{99m}Tc está disponível facilmente em um estado livre de carregador, estéril e apirogênico a partir dos geradores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc . [7, 9]

O uso dos reagentes liofilizados para marcação com ^{99m}Tc facilitou a prática nas radiofarmácias hospitalares por causa do prazo de validade, podendo ser comercializados e armazenados antes de sua preparação.[7]

O pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), que é a forma química do ^{99m}Tc disponível no gerador, é empregado na cintilografia de glândulas salivares e de tireóide⁸. Os reagentes liofilizados Ácido Dietilenotriaminopentacético (DTPA),

Fitato, Glucoheptonato de Cálcio (GHA), Soro Albumina Humano (SAH) e Estanho Coloidal (Sn Coloidal) marcados com ^{99m}Tc são usados, respectivamente, para cintilografia renal (estudo do fluxo renal e medida da velocidade de filtração glomerular); cintilografia hepática e localização de linfonodo sentinela; cintilografia renal e cerebral; estudos circulatórios e cintilografia hepato-esplênica.[7,8,9]

Gálio-67 (^{67}Ga) na forma de citrato é utilizado na detecção de doenças malignas, a saber: doença de Hodgkin, linfomas e carcinoma broncogênico. É também utilizado para localizar doenças inflamatórias agudas e infecções.[7,8]

Tálio-201 (^{201}Tl) na forma de cloreto é empregado na obtenção de imagem de perfusão miocárdica na diferenciação entre miocárdio isquêmico e infartado. É indicado para a detecção de hiperparatireoidismo e tumores cerebrais.[7,8]

O composto metaiodobenzilguanidina (MIBG) é marcado com Iodo-131 pelo método de troca isotópica e é usado para imagem da medula adrenal e tumores neuroendócrinos (detecção de feocromocitomas e tratamento de neuroblastomas).[7,8]

Entre os radiofármacos descritos para uso em tomografia por emissão de pósitron (PET) encontra-se o Flúor-18 (^{18}F) como marcador do análogo da glicose, a flúor-18-deoxiglicose (FDG), com ampla aplicação em cintilografia cerebral, cardíaca e em detecção de uma variedade de tumores em todo o corpo.[7,9]

O controle de qualidade envolve vários ensaios específicos que asseguram a pureza, potência, identidade do produto, segurança biológica e eficácia dos radiofármacos. Todos os procedimentos de controle de qualidade que são aplicados aos fármacos não radioativos são igualmente aplicados aos radiofármacos, com o acréscimo dos ensaios de pureza radioquímica e radionuclídica.[7,10]

Os ensaios biológicos são realizados essencialmente para avaliar a esterilidade, apirogenicidade e toxicidade dos radiofármacos antes da sua administração parenteral em seres humanos. Enquanto os radiofármacos perdem a esterilidade devido ao crescimento de bactéria, fungo e levedura, a pirogenicidade advém de certos produtos metabólicos (endotoxina) destes microorganismos. A esterilidade de uma solução não garante a sua apirogenicidade e nem a

esterilização destrói o pirogênio num radiofármaco. Desde que o pirogênio se origina do metabolismo da bactéria, o melhor recurso para prevenir a contaminação é utilizar material estéril, soluções e equipamento sob condições assépticas em qualquer procedimento de preparação.[7]

1.2 Pirogênio e Endotoxina

Substâncias que induzem febre são chamadas pirogênios. A palavra pirogênio é relacionada à palavra grega *pyro*, que significa ardente ou fogo, uma descrição adequada para substâncias que produzem elevação da temperatura do corpo.[11]

Os pirogênios 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.[1,11]

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.[11]

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.[1]

Endotoxinas são complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas, sejam elas patogênicas ou não, e se constituem na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica. [1,2,12]

Apesar de a maior parte da endotoxina permanecer associada 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.[1]

Endotoxinas não purificadas podem conter lipídeos, carboidratos e proteínas. Como podem ser encontradas unidades não purificadas nas fases em processo ou nos produtos farmacêuticos terminados, prefere-se utilizar a terminologia endotoxina. A denominação de lipopolissacarídeo (LPS) é aplicada à endotoxina purificada, para enfatizar a sua natureza química.[1]

Na FIG. 1, está representada a estrutura da parede celular de uma bactéria Gram-negativa. A membrana externa é composta de lipopolissacarídeo (endotoxina).

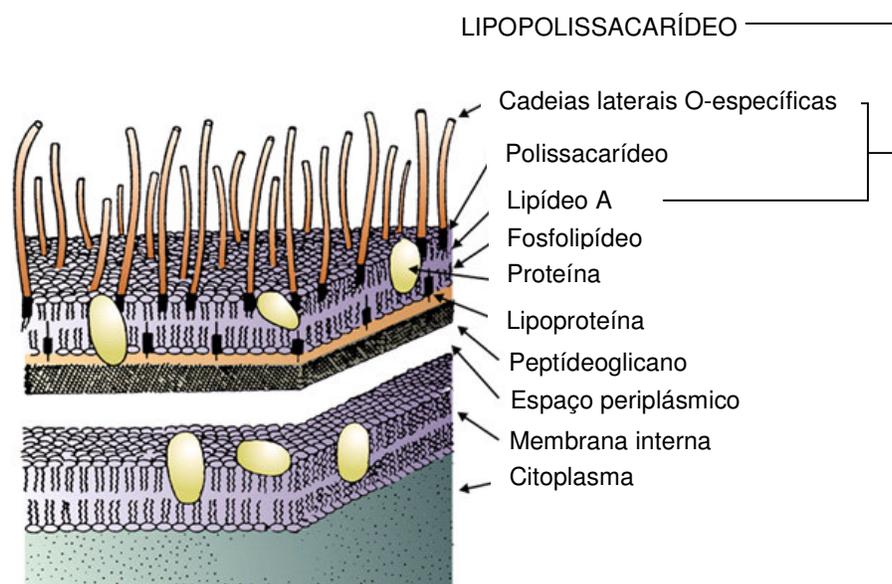


FIGURA 1 – Estrutura da parede celular de bactéria Gram-negativa. (Fonte: Charles River Laboratories)

1.3 Estrutura, Função e Atividade da Endotoxina

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.[1,10,13]

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.[11]

O lipídeo A, considerado a porção ativa da membrana da bactéria Gram negativa, é composto de um dissacarídeo de glicosamina, altamente substituído por ácidos graxos de cadeia longa com grupamentos amida e éster. Tipicamente, o lipídeo A é ligado ao núcleo de heteropolissacarídeo pelo ácido 2-ceto-3-deoioctônico, um açúcar ácido de 8 carbonos, exclusivo de lipopolissacarídeo bacteriano.[11]

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).[11]

A determinação da sensibilidade relativa de coelhos e humanos a várias endotoxinas foi considerada de grande importância, uma vez que o teste de pirogenicidade era feito objetivando segurança no uso de medicamento parenteral em humanos. Embora se admita equivalência para dose-limite na reação pirogênica de coelhos e do homem, quando sob doses consistentemente mais altas, a relação dose-resposta observada no homem é mais intensa, podendo ser até 10 vezes maior.[11,13] Esses estudos foram realizados utilizando-se preparações purificadas, enquanto que as endotoxinas que ocorrem naturalmente como contaminantes de produtos farmacêuticos apresentam comportamentos distintos; a pirogenicidade pode depender do tipo de endotoxina, assim como do nível de dose utilizado.[1]

A HIMA (*Health Industry Manufacturers Association*) nos Estados Unidos escolheu *E. coli 055:B5* como padrão de referência de endotoxina após conduzir um estudo colaborativo entre os laboratórios que realizavam teste de pirogênio em coelhos nos Estados Unidos. O estudo estabeleceu com 95% de confiança que uma média de 50% de resultados “passa ou não passa” ocorre em concentrações acima de 98 pg mL^{-1} (aproximadamente $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$). Assim, a HIMA recomendou estabelecer $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de endotoxina como um padrão de referência contra o qual o ensaio do LAL poderia ser comparado.[11,13,14]

O padrão de referência de endotoxina é mais comumente chamado EC-5 e pode ser obtido do *Office of Biologics, National Center for Drugs and Biologics*, por fabricantes licenciados de LAL.[11]

A escolha da preparação de *E. coli 055:B5* pelo *Bureau of Medical Devices* foi o resultado de um esforço cooperativo com o propósito de desenvolver guias para a utilização do ensaio do LAL em dispositivos médicos.[11]

Se um fabricante escolher utilizar uma preparação de endotoxina que não seja o Padrão de Referência de Endotoxina (PRE), este Padrão de Endotoxina (PE) deve ser padronizado contra o PRE.[11,12]

As relações entre PE e PRE devem ser determinadas antes da comercialização de um novo lote de LAL, ou um novo lote ou fabricante de PE.[11]

1.4 Processos 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.[4]

Duas 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. [1,4,11] 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.[1,11]

A hidrólise ácida ocorre na ligação do lipídeo A com o núcleo de polissacarídeos separando o lipídeo A do restante da molécula, que isolado e 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.[1,4,11]

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.[1,4,11]

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.[1,4,11]

O tratamento de endotoxinas com agentes alquilantes, como anidrido acético e succínico, promove redução de atividade pela acetilação e succinilação, respectivamente.[1,4,11]

O óxido de etileno é um forte agente alquilante com ação eficaz na destruição de endotoxinas. [1,4,11]

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.[1,4,11]

Para verificar a eficácia do processo de despirogenização por calor seco, devem ser realizados experimentos utilizando quantidades conhecidas de endotoxina de *Escherichia coli*. [1]

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. [1,4,11]

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. [1,4,11]

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 a 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. [1,4,11]

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. [1,4,11]

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. [1,4,11]

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.[1,4,11]

Membranas convencionais de osmose reversa (com porosidade nominal de cerca 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. [1,4,11]

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.[1,4,11]

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.[1,4,11]

Polipropileno, polietileno, fluoreto de polivinilideno e politetrafluoretileno apresentam afinidade para ligação à endotoxina. Estudos deste mecanismo de ação sugeriram que interações iônicas ou hidrófobas contribuem para a adsorção de endotoxina.[1,4,11]

1.5 Ensaio de Pirogênio pelo Método *in vivo*

O ensaio *in vivo* é aplicado aos produtos que podem ser tolerados pelo animal em uma dose máxima de 10 mL por kg e envolve a medida do aumento na temperatura em coelhos após a injeção intravenosa de uma solução. São utilizados coelhos adultos e saudáveis, acomodados individualmente em uma área com temperatura uniforme entre 20 e 23 °C e livre de distúrbios que possam excitá-los. [4,15]

Cada animal deve ser pesado e colocado em gaiola individual seguindo-se a introdução do par termoeletrico para medição da temperatura retal. Determina-se a temperatura corporal, de 40 a 90 minutos antes da injeção para selecionar os coelhos que serão utilizados no ensaio. A dispersão da temperatura de controle, entre os animais de cada grupo, não deve ser maior que 1 °C, embora sejam valores compreendidos entre 38,0 e 39,8 °C.[1,4]

As amostras são injetadas na veia marginal da orelha e a temperatura corporal é registrada durante pelo menos 3 horas. As determinações, em caso descontínuo, ao menos três, devem ser realizadas a intervalos de uma hora após a inoculação da amostra, ou em maior número, a intervalos de tempo menor. O registro gráfico contínuo oferece melhores condições para a decisão final pela análise do perfil da curva.[1]

Pelo critério de interpretação atualmente empregado em países europeus, cada amostra deve ser avaliada em um grupo de três animais e quando a soma das elevações térmicas individuais máximas for inferior a 1,15 °C a amostra será aprovada e caso seja superior a 2,65 °C será rejeitada. Quando o valor da somatória estiver entre estes valores, a amostra será injetada em outros três animais.[1]

Pelo critério adotado pela USP, se nenhum coelho apresentar um aumento individual de temperatura de 0,5 °C ou mais, acima da respectiva temperatura de controle, o produto atende aos requisitos para ausência de pirogênio. Se o aumento individual for $\geq 0,5$ °C, o ensaio deve ser repetido em outros cinco coelhos. Se no máximo três dos oito coelhos mostrarem aumentos individuais de temperatura de

0,5 °C ou mais, e se a soma dos oito aumentos máximos individuais não exceder 3,3 °C, o produto atende aos requisitos para ausência de pirogênio.[13,15]

O ensaio de pirogênio em coelhos, embora seja utilizado quando a metodologia do LAL não é aplicada, ainda é mantido porque tem a seu favor a situação do envolvimento de toda a reação fisiológica do animal, constituindo um teste de segurança para os produtos injetáveis, líquidos para infusão e perfusão, materiais cirúrgicos e descartáveis em geral. (FIG. 2)[9]



FIGURA 2 – Método *in vivo*. (Fonte: Charles River Laboratories)

1.5.1 Histórico

A maior parte da informação científica sobre pirogênio foi adquirida nos últimos 70 anos, mas o estudo da febre, suas causas, mecanismos e efeitos são tão antigos quanto a medicina, datando de mais de 2000 anos atrás com os primeiros médicos gregos.[1,11]

Em 1912, Hort e Penfold realizaram importantes investigações sobre a então denominada febre da injeção e foram os primeiros a planejar e padronizar um ensaio de pirogênio em coelhos.[1,11]

Em meados de 1920, Seibert completou uma série de estudos que comprovou que febres ocasionadas por injeções associadas à terapia intravenosa resultavam de substâncias de origem bacteriana, termoestáveis e filtráveis, comumente chamadas de pirogênios.[4]

A Segunda Guerra Mundial ocasionou uma grande demanda de parenterais de grande volume, levantando a necessidade de um ensaio oficial da Farmacopéia Americana (USP). Em 1941, o Comitê de Revisão da USP autorizou a realização do primeiro estudo colaborativo sobre pirogênio na Divisão de Bacteriologia do FDA (*Food and Drug Administration*), envolvendo órgãos do governo e 14 indústrias farmacêuticas. Os resultados desse estudo levaram à incorporação do primeiro ensaio oficial de pirogênio em coelhos na 12ª edição da USP em 1942.[4]

1.6 Determinação de Endotoxinas Bacterianas pelo Método *in vitro*

O procedimento mais simples e amplamente usado para detecção de endotoxinas baseia-se na gelificação. 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. (UE = Unidade de Endotoxina)[1,16]

O método se baseia na reação entre os amebócitos e a endotoxina, produzindo um gel opaco facilmente reconhecido.[1]

O reagente LAL é um extrato aquoso dos amebócitos, que são as células sanguíneas da hemolinfa azul da espécie de caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, composto de enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de endotoxina.[2,16]

O *Limulus* habita em alguns locais na costa do Oceano Atlântico dos Estados Unidos até o Golfo do México.[2]

Na preparação do lisado do amebócito de *Limulus* (LAL), os caranguejos são submetidos à sangria introduzindo-se uma agulha através do músculo entre as regiões cefalo-torácica e abdominal. A hemolinfa é então submetida aos processos de estabilização e purificação para a obtenção dos amebócitos.[11,17]

A FIG. 3 mostra a seqüência do processo de obtenção do sangue do *Limulus polyphemus*.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

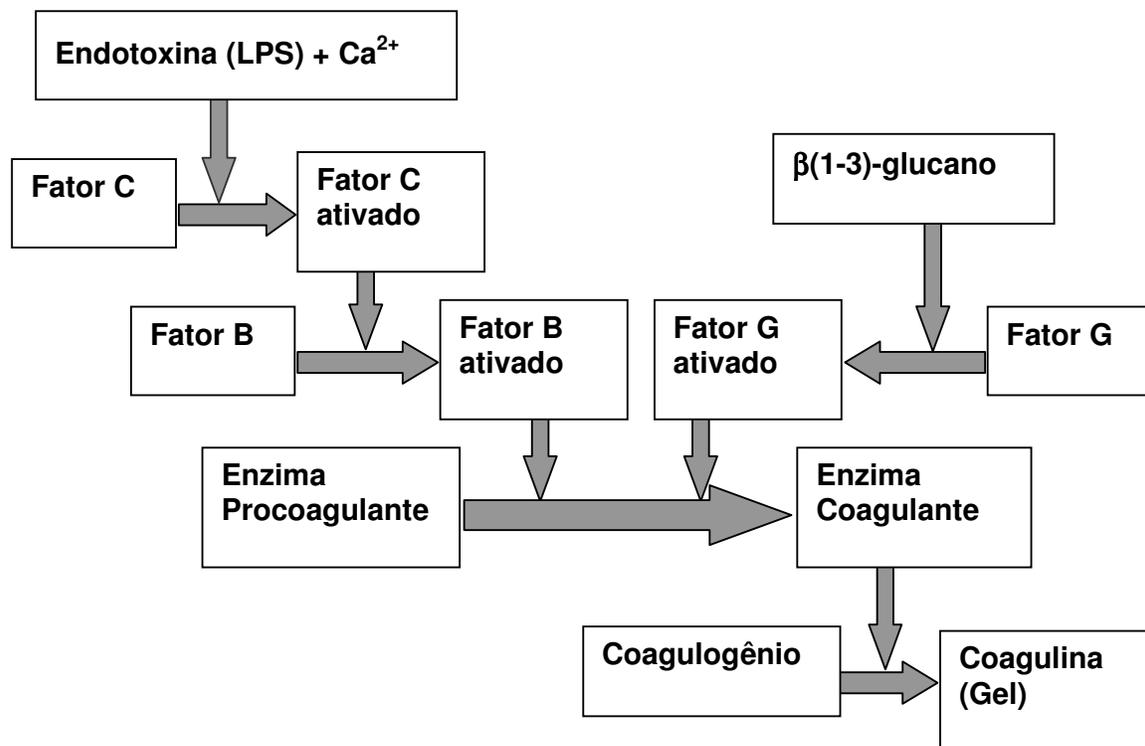


(h)

FIGURA 3 – (a) *Limulus* em praia da costa leste dos Estados Unidos, (b) e (c) lavagem dos animais, (d) preparação para extração do sangue, (e) *Limulus polyphemus*, (f) extração da hemolinfa, (g) recolhimento da hemolinfa e (h) tratamento do extrato. (Fonte: Charles River Laboratories)

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) (Esquema 1).[2,18]

A reação entre o lisado de amebócito e a endotoxina é dependente da concentração de endotoxina, temperatura e pH.[13,18]



Esquema 1 – Representação da reação em cascata entre LAL e endotoxina.[2]

1.6.1 Histórico

Em 1885, Howell observou que o sangue do *Limulus polyphemus*, o caranguejo ferradura, formava um gel sólido quando retirado do animal. Um ano mais tarde, Loeb relatou que quando as células sanguíneas do *Limulus* eram coletadas e expostas a uma substância estranha, elas se liquefaziam e em seguida coagulavam. Este foi o primeiro de uma série de artigos que Loeb publicou detalhando vários aspectos da coagulação com referência particular aos amebócitos, a única célula circulante encontrada no sangue do *Limulus*. [4,11]

Posteriormente, Shirodkar e col. informaram que uma bactéria marinha gram-negativa não identificada causava uma doença fulminante no caranguejo ferradura caracterizada por uma coagulação intravascular considerável e morte. [4,11]

Em 1964, Levin e Bang verificaram que preparações de endotoxina termoestáveis isoladas de *Escherichia coli* e um *Vibrio* marinho induziam a coagulação extracelular da hemolinfa (sangue) do *Limulus*. Embora a endotoxina não causasse coagulação do soro livre, a atividade coagulante podia ser restaurada pela adição de amebócitos ao soro. As seguintes conclusões puderam ser tiradas do estudo: amebócitos são necessários para coagulação, o rompimento dos amebócitos potencializava a reação e quantidades de endotoxinas eram provavelmente inativadas pela reação de coagulação.[4,11]

A habilidade dos amebócitos de coagular na presença de bactérias Gram-negativas ou suas endotoxinas não é restrita somente ao *Limulus* e foi demonstrado na lagosta, caranguejo e ostra.[4,11]

Num estudo subsequente, Levin e col. desenvolveram um ensaio sensível para endotoxina em plasma humano usando material lisado dos amebócitos de *Limulus*. Neste trabalho, conseguiu-se detectar 0,0005 µg de endotoxina por mililitro e verificou-se que a velocidade de reação era dependente da concentração de endotoxina. Yin e col. refinaram o ensaio de endotoxina original de Levin para determinar picogramas de endotoxina e demonstraram que a porção do lipídeo A do lipopolissacarídeo era responsável pela gelificação do lisado.[4,11]

A necessidade de um teste de pirogênio apropriado para os radiofármacos, de meia vida curta, levou Cooper e colaboradores a utilizar o método do LAL para estudar outras drogas. Um estudo comparativo feito em 1970 demonstrou que a intensidade de formação do gel estava diretamente relacionada à concentração da endotoxina, porém, alguns cuidados deveriam ser observados: a reação do LAL requer pH neutro e é dependente do tempo e da concentração, além de ser limitada às soluções aquosas ou aos extratos aquosos de produtos descartáveis.[1,2]

Em 1980, o *Bureau of Drugs* publicou um ensaio cujo título era *Guidelines for Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End Product Test for Human and Veterinary Injectable Drugs and Medical Devices*. [5,19]

O manual do *Food and Drug Administration (FDA)*, dos Estados Unidos, de 1987 e o Teste para Endotoxinas Bacterianas da USP descrevem recomendações sobre critérios necessários no uso do LAL para a validação de produtos para o uso humano, ou em animais, e equipamentos médicos, em substituição ao ensaio de pirogênio realizado nos coelhos.[1]

Devido à natureza crítica da detecção de endotoxinas pelo LAL em produtos farmacêuticos, o *FDA Office of Biologics* estabeleceu condições padronizadas para a produção e ajuste da potência de LAL. Desde setembro de 1997, obteve-se a globalização do padrão internacional da endotoxina, e do padrão de referência de endotoxina (PRE), contendo 10.000 unidades internacionais de endotoxina por ampola. Conforme estudos colaborativos envolvendo teste animal e LAL, um nanograma de endotoxina de *E.coli* 055:B5 é similar em potência a 5 Unidades de Endotoxina (UE) do PRE da USP. Além disso, quando um LPS é padronizado em UE com um lote específico de LAL e PRE, torna-se um PE (do inglês *Control Standard Endotoxin (CSE)*), o que permite correlações entre PRE (UE mL⁻¹) e PE (mg mL⁻¹).[1]

Como método de detecção de endotoxinas bacterianas, o ensaio de LAL foi pela primeira vez introduzido na USP XX (1980).[1,15] No Brasil, foi incluso na 4ª. Edição da Farmacopéia em 1996.[1]

A adoção do ensaio de LAL passou a permitir limites quantitativos de endotoxina. O limite de endotoxina para liberação de produtos parenterais, com base na dose, corresponde a K/M, onde K é igual a 5 UE por Kg de peso corpóreo, e M é igual à dose máxima humana recomendada por Kg, que pode ser administrada no período de uma hora. Conforme definido pelo *Center for Devices and Radiological Health (CDRH)* do FDA, os limites atuais para dispositivos médicos são de 0,5 UE mL⁻¹ e 0,06 UE mL⁻¹ para aqueles em contato com o fluido cerebrospinal. Os cálculos de dose são baseados em peso corpóreo humano de 70 kg.[1,14,19]

A Farmacopéia Americana (USP) adotou limites específicos para diversos produtos como, por exemplo, o de 175 UE por dose para os radiofármacos. [10,15,17]

A metodologia apresentada na Farmacopéia Brasileira [20] admite o método de gelificação, turbidimétrico ou colorimétrico do tipo cinético ou leitura final para determinação de pirogênio/endotoxina. Para a técnica de gelificação, é exigida a validação, incluindo o teste de sensibilidade do reagente LAL, utilizando série de diluição do Padrão de Referência de Endotoxina (PRE) ou Padrão de Endotoxina (PE), padronizado em relação ao PRE, com razão geométrica igual a 2, para obter as concentrações de $0,25\lambda$, $0,5\lambda$, λ e 2λ , em que λ é a sensibilidade declarada do reagente LAL em UE mL⁻¹ (Unidade de Endotoxina por mililitro), e o ensaio de inibição ou potencialização de resposta, executado para avaliar a compatibilidade do produto. A validação deverá ser repetida em caso de mudança de fornecedor do LAL [1,20,21], ou de mudança significativa na formulação da amostra.[1,20]

1.7 Validação do Ensaio 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.[4]

Alguns tipos comuns de compostos que apresentam problemas nos ensaios de endotoxina para parenterais de pequeno volume incluem drogas insolúveis em água, drogas com atividade que simula a de endotoxina, drogas que contêm endotoxina (que deve ser removida antes da validação), drogas com potências variadas, drogas múltiplas num mesmo recipiente, e drogas com grande potencial de interferência como os quimioterápicos.[4]

O grande desafio de um laboratório de análise de parenterais é o desenvolvimento de um ensaio de LAL que seja robusto, reprodutível e automatizado para uso rotineiro.[4,22]

Sob o ponto de vista legal, o ensaio de LAL deve atender aos requisitos dos compêndios oficiais e não necessita ser quantitativo exceto na sua capacidade de demonstrar a detecção da concentração limite de endotoxina (método de formação de gel).[4]

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.[4]

Ao se estabelecer um método para o ensaio de LAL para um fármaco deve-se identificar uma concentração de amostra compatível para a análise de rotina. A compatibilidade do LAL é uma condição onde um padrão de endotoxina é detectado com a mesma eficiência numa amostra de produto ou em água para injeção.[23]

É necessário realizar a validação do Ensaio de Gelificação ou Formação de Gel em radiofármacos para administração parenteral. Métodos oficiais de vários países e o Guia para o Ensaio de LAL do FDA (*Food and Drug Administration*) requerem um mínimo de 3 lotes de cada produto para a validação com um fornecedor específico de reagente LAL.[19,24]

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.[12]

A validação do ensaio de LAL garante que independentemente do método ou lote, em determinadas diluições do produto não há interferências e, portanto a quantificação de endotoxinas em uma dada amostra é confiável. [2,15,20] O que se valida é a amostra e a sua diluição, e não se trata, por exemplo, de realizar ensaios de linearidade, exatidão ou precisão como se descreve para a maioria dos métodos analíticos.[2]

1.8 Interferências

Dentre as fontes comuns de interferência no ensaio de determinação de endotoxina incluem-se condições em que se realiza a reação enzimática de gelificação, ou que alteram a dispersão da endotoxina . Entretanto, alguns produtos podem provocar a inibição ou a potencialização da reação. Muitas destas substâncias que causam interferências são compostos de peso molecular relativamente alto formados de unidades repetidas, com elevada incidência de polissacarídeos. Por isso, a inibição ou a potencialização devem ser determinadas para cada formulação.[25]

Podemos incluir também como fontes de interferência: condições não ótimas de pH, agregação ou adsorção da endotoxina, concentrações não adequadas de cátions divalentes, modificação da enzima ou proteína, ativação não específica do reagente LAL.[4,25]

A reação LAL-endotoxina é otimizada na faixa de pH 6,4 a 8,0. Abaixo ou acima da neutralidade, a reatividade do LAL diminui. A utilização de tampões e diluições minimiza esse problema.[4,25]

A endotoxina é uma molécula grande com regiões lipofílicas e hidrofílicas permitindo interações com outras moléculas de endotoxina e certas substâncias formando micelas. Com o aumento da agregação molecular, diminui a reatividade do LAL. São utilizados agentes catiônicos dispersantes em solução a 2%, mas geralmente, diluições minimizam os efeitos iônicos a uma faixa permissível.[25]

Os tubos de diluição da endotoxina devem ser de vidro borossilicato de alta qualidade para evitar adsorção da endotoxina nas paredes e, em caso de lavagem e reutilização, deve-se tomar cuidado para remover todos os traços de detergente para evitar formação de micela. O uso de tubos de plástico, principalmente de polipropileno, não é recomendado.[4,25,26,27]

Os cátions divalentes desempenham um importante papel na reatividade do LAL e na dispersão da endotoxina. A reatividade do LAL será diminuída ou aumentada se as concentrações de cálcio e magnésio não estiverem otimizadas. [25,28,29] Quelantes orgânicos estão em fórmulas de medicamentos com o propósito de complexar cátions de metais pesados que contribuem para a instabilidade. Anticoagulantes também, como a heparina sódica e o citrato ligam-se ao cálcio por quelação e inibem o teste de LAL, havendo necessidade de reposição de cátions divalentes. A melhor forma de corrigir a depleção de cálcio é calcular a quantidade de cálcio necessária e acrescentar cloreto de cálcio livre de pirogênio. Cátions divalentes são adicionados aos lisados para aumentar a sensibilidade do LAL.[25] Porém os níveis de cálcio devem ser ajustados cuidadosamente para evitar um cálculo exagerado dos níveis de endotoxina quando analisar drogas que contenham sais de Ca ou Mg.[25,30]

O fenômeno da gelificação é baseado numa cascata de coagulação enzimática que envolve serina proteases (Esquema 1). A inativação da enzima devido a oxidantes, antioxidantes, agentes proteolíticos ou inativantes específicos causará inibição. A propriedade desnaturante de álcoois e fenóis limita seus níveis no produto analisado. O caminho prático para resolver esses problemas, mais do que diluição é aplicar técnicas específicas, por exemplo, inativação química ou por calor.[25]

Eluições ou extratos de certos materiais celulósicos podem conter traços de um agente conhecido como material reativo do LAL ou β (1-3) D-glucano. Esta substância aparentemente inicia a reação de gelificação do LAL por um caminho enzimático alternativo. Foi verificada a presença de glucanos em filtrados provenientes de filtros de acetato de celulose. Esta interferência pode ser evitada, substituindo-se a fonte de glucano por outro tipo de filtro.[25,31]

1.9 Outros Métodos para Determinação de Endotoxinas

Embora o ponto final de gelificação seja o mais amplamente usado dentre os métodos de LAL, apresenta a desvantagem de impedir a quantificação da endotoxina em níveis abaixo daqueles em que se forma o gel consistente.[1,11]

Assim, existem outros métodos, entre eles, turbimétrico quantitativo, colorimétrico de proteína, nefelométrico e cromogênico quantitativo que proporcionam informações quantitativas e qualitativas acerca da concentração de endotoxina nas amostras.[1,11]

1.9.1 Método Turbidimétrico Quantitativo

Este ensaio é baseado no fato de que qualquer aumento na concentração de endotoxinas causa um aumento proporcional na turbidez devido à precipitação de proteína coagulável (coagulogênio) no lisado. Procede-se à leitura da densidade óptica de várias diluições da substância a ser analisada contra curva-padrão e são obtidas medidas quantitativas de endotoxinas, em grande faixa de concentrações. [1,11] Nesta técnica cinética, mede-se o tempo necessário para se atingir uma absorbância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento da turbidez.[4,12]

Levin e Bang em 1968 foram os primeiros a propor um método cinético turbidimétrico para a determinação de endotoxinas com o reagente LAL.[18] Inicialmente este método era pouco empregado devido provavelmente à carência de equipamentos capazes de manipular várias amostras ao mesmo tempo. Algumas modificações foram feitas para simplificar e facilitar a aplicação desta metodologia, a saber, o emprego de um leitor de microplacas de alta resolução dotado de um incubador a 37 °C, o uso de um programa de computador para a aquisição e processamento dos dados e uma formulação de reagente LAL mais sensível.[2]

1.9.2 Método Colorimétrico de Proteína

Conforme o método de formação do gel, quantidades da amostra e lisado são misturadas em tubos, incubadas por 1 hora a 37 °C e então centrifugadas. No sobrenadante, a proteína do coagulogênio é determinada pelo método de Lowry, com a utilização de um espectrofotômetro, com leituras em 660 nm.[1,11]

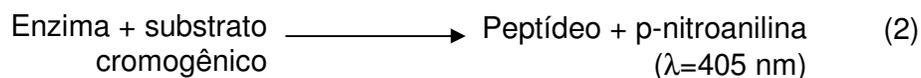
1.9.3 Método Nefelométrico

Tem sido utilizado principalmente na determinação de endotoxinas em soluções parenterais de grande volume. É baseado na dispersão relativa de luz, utilizando-se um nefelômetro a laser Hyland. Assim como o método colorimétrico, o método nefelométrico não tem se mostrado promissor.[1,11]

1.9.4 Método Cromogênico Quantitativo

Baseia-se na ação da endotoxina bacteriana para ativação da enzima de coagulação, que reage com um substrato cromogênico sintético incolor. Este substrato é composto por um pequeno peptídeo ligado pela arginina C-terminal a uma molécula do cromóforo p-nitroanilina (pNA). Uma vez ativada a reação enzimática em cascata, a enzima de coagulação provoca a liberação da molécula de pNA de cor amarela. O desenvolvimento da cor é proporcional à concentração de endotoxina na amostra.[2] A liberação do cromóforo pode ser monitorada espectrofotometricamente, em 405 nm.[1] Nesta técnica cinética, mede-se o tempo necessário para se atingir uma absorbância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento da cor.[4,12]

O esquema que descreve o princípio do método pode ser representado pelas equações 1 e 2:



Esquema 2 – Fases envolvidas na determinação de endotoxina bacteriana, pelo método cromogênico. (Fonte: Charles River Laboratories)

Embora pelo método cromogênico a faixa de concentração de endotoxina seja ampla, a velocidade da reação é lenta e proibitiva quando é necessário realizar grande número de amostras, o que pode ser superado com um sistema semi-automático cinético, por exemplo, leitor de ELISA e programa específico de computador.[1]

Para assegurar a validação das técnicas cinéticas turbidimétricas e cromogênicas, são necessários ensaios para verificar se os critérios para a curva padrão são válidos e que a amostra não inibe ou potencializa a reação. Uma revalidação do método de ensaio é necessário quando as condições que influenciam o ensaio são alteradas.[4]

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi validar o método de determinação de endotoxina bacteriana para os radiofármacos m-iodobenzilguanidina-¹³¹I (MIBG-¹³¹I), citrato de Gálio-67 (⁶⁷Ga), cloreto de Tálcio-201 (²⁰¹Tl) e reagentes liofilizados Ácido Dietilenotriaminopentacético (DTPA), Fitato, Glucoheptonato de Cálcio (GHA), Soro Albumina Humano (SAH) e Estanho Coloidal (Sn Coloidal).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Zijlstra e col. (1997) [10] realizaram a validação em amostras de radiofármacos de meia vida curta, como o Fluorodeoxiglicose-¹⁸F, Acetato-¹¹C e Amônia-¹³N, pelo método cinético turbidimétrico do LAL. A sensibilidade do reagente LAL utilizado foi de 0,03 UE mL⁻¹ e o limiar da densidade óptica foi definido em 0,02 unidades de absorvância. O tempo de reação foi calculado por análise de regressão e foi estabelecido em 1800 s. Os resultados demonstraram que o ensaio é inibido pelo pH e potencializado por ânions para Amônia-¹³N.

McCullough e Weidner-Loeven (1992) [32] estudaram a variabilidade no Ensaio do LAL comparando três métodos cinéticos para avaliação de treze produtos farmacêuticos injetáveis. Para todos os ensaios foi construída uma curva padrão na faixa de 0,05 a 5,0 UE mL⁻¹. A sensibilidade lambda (λ) ou o menor ponto da curva padrão foi 0,05 UE mL⁻¹. Foram utilizados dois métodos para o ensaio turbidimétrico que diferiam somente na proporção de amostra e reagente LAL, com leitura espectrofotométrica em 340 nm, e o método cinético cromogênico com leitura em 405 nm. Cada produto foi analisado em três concentrações: diluição da MDV (Máxima Diluição Válida), metade da MDV e 0,10 da MDV. Foi verificado que a maioria das amostras foi inibitória e que a diluição simples com água apirogênica mostrou-se maneira fácil e efetiva de minimizar as interferências. Recuperações satisfatórias dos controles positivos dos produtos (RCPP) foram observadas para cada um dos 13 produtos avaliados em no mínimo um dos três métodos cinéticos utilizados, sugerindo que problemas causados pela variabilidade da %RCPP podem ser facilmente controlados no laboratório pela flexibilidade na escolha do método.

McCullough (1990) [33] observou que há diferenças na formulação de lisados de diferentes fabricantes na capacidade tamponante, presença e concentração de agentes tensoativos e concentração de cátions divalentes. Cada uma dessas diferenças pode afetar os perfis de inibição/potencialização (interferências) observados durante a validação do produto. Foi também reconhecido que a compatibilidade do lisado com o produto pode mudar de acordo com o método

escolhido: formação de gel, turbidimétrico ou cromogênico, e o Guia do FDA recomenda que os produtos sejam revalidados sempre que o método for alterado. Podem ocorrer ainda, variações de lote a lote no pH das soluções parenterais, concentração do sal, concentração de cátion divalente, tampões, conservantes, fonte da matéria prima e mesmo outras possíveis endotoxinas. Foram feitas várias considerações para se evitar tais problemas.

Murata e col. (1976) [34] avaliaram a sensibilidade do ensaio do *Limulus* e os fatores inibitórios em 21 radiofármacos comumente utilizados no Japão. A sensibilidade verificada foi de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a endotoxina de *E. coli*, sendo cerca de dez vezes a sensibilidade do ensaio em coelhos adotado pelas Farmacopéias Americana e Japonesa. O ensaio de LAL foi aplicável sem reação inibitória na avaliação de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, albumina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, MAA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Sn Coloidal- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Hippuran- ^{131}I , Na ^{131}I , Na $_2^{51}\text{CrO}_4$, Citrato de ^{67}Ga e Bleomicina- ^{57}Co . Por outro lado, DTPA- ^{111}In , Fitato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Pirofosfato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, PVP- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{59}\text{FeCl}_3$, Na $_3^{32}\text{PO}_4$, ^{198}Au Coloidal e Selenometionina- ^{75}Se necessitaram de ajuste de pH com tampão Tris-HCl para evitar inibição na reação de gelificação. A faixa ótima de pH encontrada para a reação foi 6,0-7,5. Para análise de rotina, o ensaio do *Limulus* mostrou-se mais simples, rápido e sensível do que o ensaio em coelhos e 19 dos 21 radiofármacos estudados apresentaram condições para a sua utilização.

Cooper e col. (1971) [13] estudaram os métodos *in vitro* (LAL) e *in vivo* (coelhos) para a detecção de endotoxina em radiofármacos de meia vida curta, comparando quantitativamente a sensibilidade à endotoxina do ensaio de *Limulus* com a resposta pirogênica em coelhos usando lipopolissacarídeos purificados de *E. coli* e *Klebsiella*. A sensibilidade dos coelhos aos efeitos pirogênicos de endotoxinas purificadas foi avaliada com 4 diferentes doses. No ensaio LAL, foi observado que foram necessárias quantidades menores da endotoxina de *Klebsiella* do que da endotoxina de *E. coli* para provocar a formação do gel. A velocidade de gelificação e/ou aumento da viscosidade foi proporcional à concentração de endotoxina. O ensaio LAL detectou concentrações menores de endotoxina do que o uso dos coelhos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos de validação foram estabelecidos para os radiofármacos m-iodobenzilguanidina-¹³¹I (MIBG-¹³¹I), citrato de Gálio-67 (⁶⁷Ga), cloreto de Tálcio-201 (²⁰¹Tl) e para os reagentes liofilizados Ácido Dietilenotriaminopentacético (DTPA), Fitato, Glucoheptonato de Cálcio (GHA), Soro Albumina Humano (SAH) e Estanho Coloidal (Sn Coloidal).

As fórmulas dos produtos radioativos expressam a concentração radioativa da solução (MBq mL⁻¹) por lote. A composição dos reagentes liofilizados para marcação com ^{99m}Tc é apresentada por lote e por frasco analisado. (TAB. 1)

TABELA 1 – Fórmulas dos produtos

Produtos Radioativos

Produto	Reagente	Quantidade/lote	Concentração radioativa/lote
MIBG-¹³¹I pH final: 4,0-6,0	MIBG	2,0 – 14,0 mg	51,8 – 1110 MBq mL ⁻¹
	Na ¹³¹ I	1295 - 16650 MBq	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 – 14,0 mg	
	Etanol:Água Purificada (1:1)	0,2 - 0,25 mL	
	CuSO ₄ 1%	20,0 – 40,0 µL	
	NaCl 0,9%-Álcool benzílico 1%	40,0 – 50,0 mL	
⁶⁷Ga pH final: 4,5-8,0	Cloreto de ⁶⁷ Ga	55500 MBq	407 MBq mL ⁻¹
	Citrato de sódio 3,8%	47,0 mL	
	HCl 3,5 mol L ⁻¹	2,0 mL	
	H ₂ O ₂ 30 %	1,0 mL	
	Água purificada	67,0 mL	
²⁰¹Tl pH final: 5,5-7,0	Cloreto de ²⁰¹ Tl	11100 - 12950 MBq	≅ 111 MBq mL ⁻¹
	NaCl 0,9%	120,0 mL	
	Volume final da solução	40,0 mL	

Reagentes Liofilizados para Marcação com ^{99m}Tc

Produto	Reagente	Quantidade/lote	Quantidade/frasco
DTPA pH final: 4,0	Ácido dietilenotriaminopentacético	7,0 g	10,0 mg
	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,700 g	1,0 mg
	Ácido para-aminobenzoico (PABA)	1,4 g	2,0 mg
	NaOH 1 mol L^{-1}	q.s.	---
	Água Purificada	663,0 mL	---
	Volume final da solução	700,0 mL (para 700 frascos de 1 mL)	1 mL
Fitato pH final: 6,0	Ácido Fítico	14,0 g	20,0 mg
	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,700 g	1,0 mg
	HCl 0,1 mol L^{-1}	10,0 mL	---
	HCl 2 mol L^{-1}	28,0 mL	---
	Água Purificada	662,0 mL	---
	Volume final da solução	700,0 mL (para 700 frascos de 1 mL)	1 mL
GHA pH final: 5,0–6,0	Glucoheptonato de cálcio	8,0 g	100,0 mg
	TINAST (ascorbato de estanho)	0,180 g	2,0 mg
	NaCl 0,9%	80,0 mL	---
	NaOH 1 mol L^{-1}	q.s.	---
	Volume final da solução	80,0 mL (para 80 frascos de 1 mL)	1 mL
SAH pH final: 5,0	Soro Albumina Humano 20%	10,0 mL	10,0 mg
	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,133 g	0,04 mg
	NaCl 0,9%	187,0 mL	---
	HCl 1 mol L^{-1}	q.s.	---
	HCl 0,1 mol L^{-1}	2,0 mL	---
	Volume final da solução	200,0 mL (para 200 frascos de 1 mL)	1 mL
Sn Coloidal pH final: 4,0–6,0	Fluoreto de sódio (NaF)	0,700 g	1,0 mg
	Fluoreto de Sn (SnF_2)	0,0875 g	0,125 mg
	Polivinilpirrolidona-40 (PVP-40)	0,318 g	0,5 mg
	Água Purificada	700,0 mL	---
	Volume final da solução	700,0 mL (para 700 frascos de 1 mL)	1 mL

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais utilizados no Método *in vitro* de Determinação de Endotoxina Bacteriana por Formação de Gel

No método de formação de gel, foi utilizado Reagente do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL) com licença de registro no Ministério da Saúde, combinado com o Padrão de Endotoxina (PE) com Certificado de Análise do fabricante (LAL e PE da Endosafe, Charleston, EUA). A sensibilidade lambda (λ) do LAL declarada pelo fabricante foi de $0,125 \text{ UE mL}^{-1}$. Todas as diluições foram feitas em frascos de vidro despirogenizados no IPEN (tratados termicamente a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos) com ponteiras estéreis livres de pirogênio (MLA) e água livre de pirogênio (Sterile Water for Injection - Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC). Tubos plásticos despirogenizados com tampa (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC) contendo $0,1 \text{ mL}$ de amostra e $0,1 \text{ mL}$ de LAL foram incubados em banho-maria Eletrolab[®] a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, por 60 ± 2 minutos.[4,15] Os dados dos materiais utilizados foram registrados em ficha conforme modelo no Anexo 1.

4.1.2 Materiais utilizados no Método Cromogênico – PTS de Determinação de Endotoxina Bacteriana

Para os ensaios quantitativos cromogênicos foram utilizados cartuchos (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC) com 4 canais contendo o reagente LAL e um substrato cromogênico. Dois canais são os controles negativos do produto e dois com endotoxina na concentração de $0,3 \text{ UE mL}^{-1}$ são os controles positivos do produto (FIG. 4). As leituras das amostras foram feitas utilizando Sistema de Teste Portátil (PTS) (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC) a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (FIG. 5).

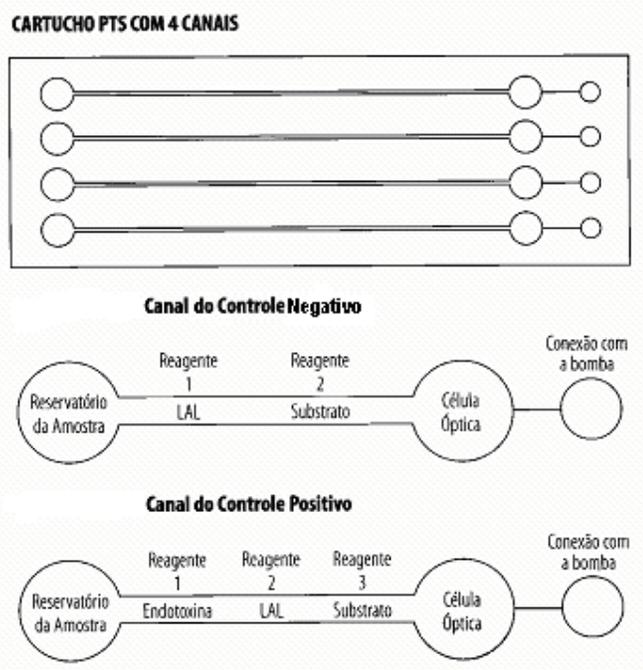


FIGURA 4 - Representação do Cartucho PTS para Determinação de Endotoxina. (Fonte: Alko do Brasil)



FIGURA 5 - Sistema de Teste Portátil (PTS). (Fonte: Alko do Brasil)

4.1.3 Materiais utilizados no Método Turbidimétrico de Determinação de Endotoxina Bacteriana

Para o ensaio quantitativo turbidimétrico, foram utilizados: reagente LAL KTS (*Kinetic Turbidimetric System*) com sensibilidade de $0,05 \text{ UE mL}^{-1}$ (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC), Padrão de Endotoxina utilizado no método de formação de gel em concentrações de curva padrão de 5,0, 0,5 e $0,05 \text{ UE mL}^{-1}$, placas apirogênicas descartáveis de poliestireno com 96 poços para leitura dos padrões e das amostras, espectrofotômetro TECAN SUNRISE (FIG. 6) com programa Endoscan-V (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC) para leitura em 340 nm.



FIGURA 6 - Espectrofotômetro TECAN SUNRISE. (Fonte: Charles River Laboratories)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Método de Formação de Gel

As amostras foram preparadas conforme o Teste de Endotoxinas Bacterianas (TEB) descrito na Farmacopéia Americana.[15]

O controle negativo do produto foi preparado adicionando-se água em uma proporção definida e conhecida, o controle positivo do produto foi preparado com o dobro da concentração do controle negativo mais a mesma quantidade de Padrão de Endotoxina (PE) em concentração de $0,50 \text{ UE mL}^{-1}$.

Nos ensaios de verificação de interferências, o controle negativo do produto, o controle positivo do produto e o controle negativo da água foram realizados em duplicata.

Em cada frasco dos reagentes liofilizados DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal, adicionou-se água livre de pirogênio para a reconstituição, diluição e preparação dos controles negativo e positivo dos ensaios de inibição ou potencialização. As séries de diluições sucessivas de cada produto com a endotoxina também foram preparadas a partir de um único frasco e a quantidade de água adicionada variou com o fator de diluição. Para uma diluição de 16 vezes, acrescentou-se 4 mL de água no frasco, retirou-se 1 mL para outro frasco e adicionou-se 3 mL de água.

O volume das amostras dos radiofármacos MIBG- ^{131}I , ^{67}Ga e ^{201}Tl foi de 0,1 mL. Adicionaram-se 0,9 mL de água em cada frasco, resultando um fator de diluição de 1:10. A partir daí, foram feitas diluições para o controle negativo e positivo do produto para os ensaios de inibição ou potencialização. Para as séries de diluições sucessivas do produto e endotoxina, o volume de água acrescentado à amostra inicial foi 4,9 mL (Diluição 1:50).

Procedeu-se aos ensaios de inibição ou de potencialização e aos ensaios para a determinação da sensibilidade do reagente LAL, em que os produtos foram submetidos a ensaios em diluições seriadas, com a preparação das diluições sucessivas de padrão de endotoxina em água e diluições sucessivas de padrão de endotoxina com o produto.[19]

O resultado é interpretado como positivo ou negativo. Um resultado positivo apresenta a formação de um gel firme capaz de manter a sua integridade após

retirar cuidadosamente cada tubo do banho-maria e invertê-lo 180° (FIG. 7). O resultado é negativo para endotoxina quando não há formação de gel ou formação de um gel que não adere ao fundo quando o tubo é invertido.[1,4,15]

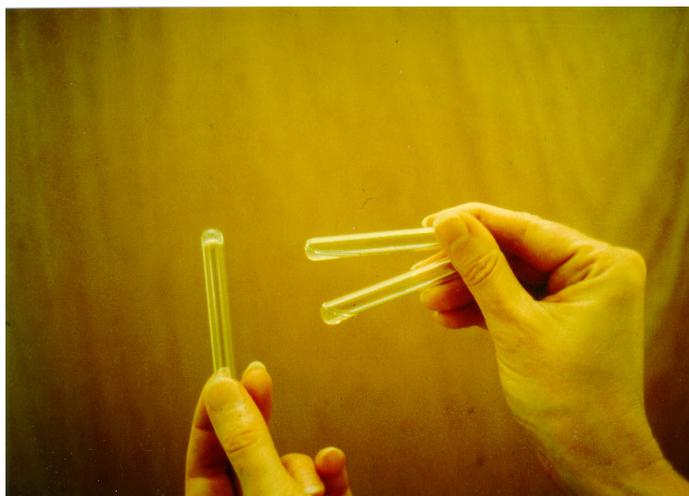


FIGURA 7 - Inversão a 180° do tubo de reação.

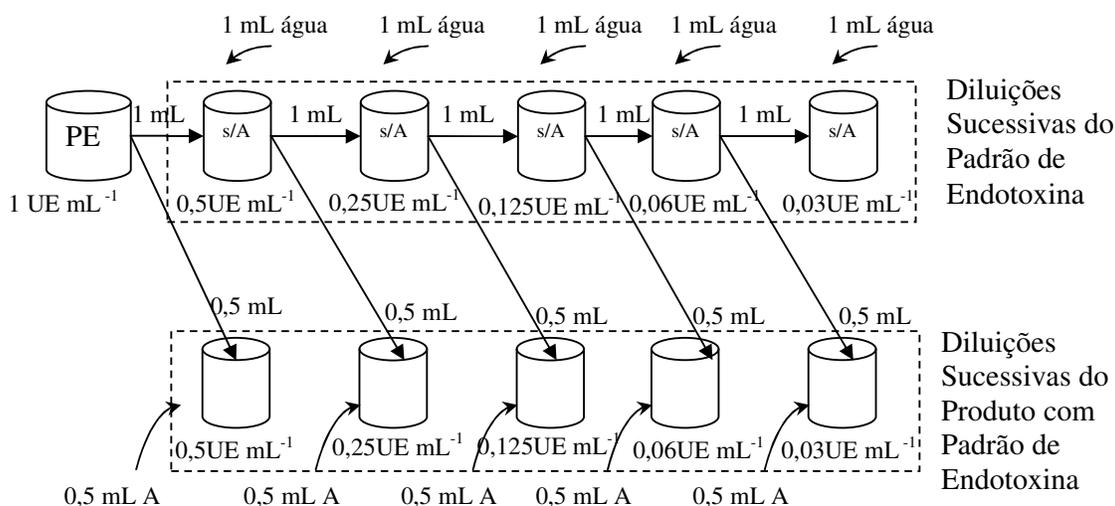
4.2.1.1 Preparação das Diluições Sucessivas de Padrão de Endotoxina

Diluições do PE de 0,5 UE mL⁻¹ em água foram preparadas diluindo-se 1 mL de PE de 1 UE mL⁻¹ com 1 mL de água. Para se obter a diluição de 0,25 UE mL⁻¹, 1 mL do PE de 0,5 UE mL⁻¹ foram posteriormente diluídos com 1 mL de água. Em seguida, diluições dobradas sucessivas (0,125, 0,06 e 0,03 UE mL⁻¹ de PE em água) foram feitas conforme Esquema 3 e as amostras foram incubadas em quadruplicata.

4.2.1.2 Preparação das Diluições Sucessivas do Produto com Padrão de Endotoxina

De modo semelhante ao item anterior, diluições sucessivas do produto com endotoxina foram preparadas com quantidades iguais de amostra do produto em uma diluição definida e concentração em dobro do PE (Esquema 3). 0,1 mL de cada uma das diluições foi incubado em quadruplicata com 0,1 mL de LAL.

Foram observadas as menores concentrações de endotoxina em que ocorreu a formação de gel firme em duas séries paralelas de diluições sucessivas de Padrão de Endotoxina em água e de Padrão de Endotoxina no produto na diluição definida. Os resultados em 3 lotes consecutivos de cada produto foram registrados.[15]



A – dobro da concentração da amostra do controle negativo

Esquema 3 – Representação das Diluições da Curva Padrão em Água e no Produto

4.2.1.3 Determinação da Sensibilidade do Reagente LAL

Os reagentes LAL foram padronizados quanto à sensibilidade para endotoxina de *E. coli* (concentração de endotoxina detectada pelo reagente).[1]

A sensibilidade do reagente LAL (em UE mL⁻¹) foi calculada pela média geométrica da menor concentração de endotoxina em que ocorreu a gelificação, conforme a equação 3:

$$\text{Média Geométrica da Concentração do Ponto Final} = \text{antilog} \frac{\sum e}{f} \quad (3)$$

onde e é o log das concentrações do ponto final de gelificação das séries de diluições e f é o número de replicatas.

A sensibilidade do lisado foi obtida a cada novo lote de Reagente LAL ou quando ocorreu alteração nas condições experimentais.[15]

4.2.2 Método Cromogênico - PTS

Introduziu-se volume de 25 microlitros (μL) de amostra na diluição do ensaio nos quatro reservatórios de cada cartucho que foi inserido no PTS. As amostras foram aspiradas e misturadas com os reagentes, sendo então incubadas.

Cada lote de cartucho possui um código de calibração que está relacionado com uma curva padrão do log do tempo de reação pelo log da concentração de endotoxina, construída na faixa de 2 log. Depois que a reação ocorre, a intensidade da cor é medida e a densidade óptica é comparada com a curva padrão arquivada internamente específica para cada lote de cartucho. O tempo de cada análise foi de 15 a 20 minutos, com leitura da intensidade de cor em 405 nm.

Pela interpolação do tempo de reação necessário para alcançar determinada densidade óptica foram calculados a Concentração de Endotoxina no Produto (CEP) e o Controle Positivo do Produto (CPP).[1] Os critérios para a validação em uma determinada diluição são: Coeficiente de Variação (CV) e Recuperação do Controle Positivo do Produto (RCP). O coeficiente de variação (CV) é a diferença percentual de leitura entre as amostras. A porcentagem de recuperação do controle positivo do produto (RCP) representa a relação entre a concentração de endotoxina do controle positivo do produto e uma concentração específica de endotoxina ($0,3 \text{ UE mL}^{-1}$).[15]

4.2.3 Método Turbidimétrico

Foram introduzidos em duplicata, nos poços de uma placa de poliestireno, 0,1 mL de cada concentração do Padrão de Endotoxina, 0,1 mL de amostra diluída para o controle negativo do produto, 0,1 mL de amostra contaminada com endotoxina na concentração de $0,5 \text{ UE mL}^{-1}$ para o controle positivo do produto, e 0,1 mL de água para o controle negativo da água. A seguir, pipetou-se rapidamente 0,1 mL de LAL KTS reconstituído com água, iniciando pelo controle negativo em direção à concentração mais alta de endotoxina. A placa foi colocada na câmara do espectrofotômetro para dar início à reação.

Os parâmetros de ensaio foram definidos em: tempo de coleta 3600 segundos, intervalo de tempo para obtenção de leitura 30 segundos, temperatura da placa $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram obtidos os valores de: Tempo Médio de Reação (s), %CV e Valor Calculado (UE mL^{-1}) para cada uma das concentrações de endotoxina (5,0; 0,5 e $0,05 \text{ UE mL}^{-1}$). Foi construída a curva padrão do log do tempo de reação pelo log da concentração de endotoxina, na faixa de 2 log e foram calculados os parâmetros de coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação (R) da curva padrão.

Pela interpolação do tempo de reação necessário para alcançar determinada densidade óptica foram calculados a Concentração de Endotoxina no Produto (CEP) e o Controle Positivo do Produto (CPP).[1] Os critérios para a validação do produto em uma determinada diluição são: Coeficiente de Variação (CV) e Recuperação do Controle Positivo do Produto (RCP).[15]

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para evitar interferências devido às condições do teste e reduzir a probabilidade de se detectar níveis de endotoxina clinicamente insignificantes, podem ser feitas diluições do produto. São utilizados limites para se determinar a extensão da diluição (Máxima Diluição Válida – MDV) que pode ser aplicada para evitar um problema de interferência, e cujo resultado de concentração de endotoxina no produto não exceda a concentração limite de endotoxina.[15,19]

O limite de endotoxina estabelecido para radiofármacos é 175 UE por dose, onde a dose (volume máximo recomendado) é 7,0 mL.[10,15,17]

5.1 Validação dos Produtos pelo Método de Formação de Gel

5.1.1 Cálculo de MDV

A MDV é a máxima diluição válida permitida de um produto, na qual o limite de endotoxina pode ser determinado. A equação geral para determinar a MDV é [19]

$$\text{MDV} = \frac{\text{Limite de Endotoxina} \times \text{Potência do Produto}}{\text{sensibilidade declarada (UE por mL) do Reagente LAL}} \quad (4)$$

Para MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal, a concentração limite de endotoxina (L.E.) é 175 UE por dose, resultando em limite de endotoxina de 25 UE mL⁻¹. Aplicando na Equação 4 onde a potência é 1,00 mL por mL para drogas administradas em volume por quilograma e a sensibilidade declarada do Reagente LAL utilizado ($\lambda = 0,125 \text{ UE mL}^{-1}$) obtém-se o fator de MDV. [19] O fator é o limite de diluição do produto para o ensaio ser válido.

O resultado do cálculo de MDV para os radiofármacos MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal pelo método de formação de gel, utilizando a sensibilidade declarada do LAL de 0,125 UE mL⁻¹, foi **200**, isto é, os produtos

podem ser diluídos até 200 vezes de modo que a endotoxina ainda pode ser detectada.

Para produtos que não têm uma concentração limite de endotoxina oficial publicada (USP ou FDA), a equação de MDV considera a Mínima Concentração Válida (MCV). A MCV é a menor concentração da amostra que pode ser analisada e ainda possuir a sensibilidade adequada.

$$MCV = \frac{\lambda \times M}{K} \quad (5)$$

$$MDV = \frac{\text{Potência do produto}}{MCV} \quad (6)$$

onde M é a dose humana máxima por kg no período de uma hora (dose de 7 mL para radiofármacos e considerando 70 kg o peso médio de um homem adulto) e K é 5,0 UE kg⁻¹ para drogas parenterais.[19]

Considerando K = 2,5 EU kg⁻¹ para radiofármacos conforme a Farmacopéia Européia [12], utilizando as equações 5 e 6, o resultado de Máxima Diluição Válida para os radiofármacos é 200, confirmando o valor obtido através da Equação 4.

5.1.2 Inibição ou Potencialização

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. Vários lotes de MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal foram submetidos ao teste USP realizando-se diluições seriadas para verificação de interferências de inibição ou potencialização.

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. [35]

A TAB. 2 apresenta os resultados dos ensaios de interferência nas diluições seriadas dos produtos DTPA, GHA, Fitato, SAH e Sn Coloidal.

TABELA 2 - Resultados dos Ensaio de Interferência nas Diluições Seriadadas de DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal

Produto	Diluição do Produto	Controle Negativo		Controle Positivo		pH
DTPA	1:4	--	--	--	--	7,0
	1:8	--	--	--	--	7,0
	1:16	--	--	++	++	7,0
	1:32	--	--	++	++	7,0
	1:64	--	--	++	++	7,0
Fitato	1:100	++	++	++	++	7,0
	1:120	++	++	++	++	7,0
	1:150	++	++	++	++	7,0
	1:200	--	--	++	++	7,0
	1:240	--	--	++	++	7,0
GHA	1:2	++	++	++	++	7,0
	1:4	--	--	++	++	7,0
	1:6	--	--	++	++	7,0
	1:8	--	--	++	++	7,0
	1:16	--	--	++	++	7,0
	1:32	--	--	++	++	7,0
SAH	1:4	--	--	++	++	7,0
	1:8	--	--	++	++	7,0
	1:16	--	--	++	++	7,0
	1:32	--	--	++	++	7,0
	1:64	--	--	++	++	7,0
Sn Coloidal	1:4	--	--	--	--	7,0
	1:8	--	--	++	++	7,0
	1:16	--	--	++	++	7,0
	1:32	--	--	++	++	7,0
	1:64	--	--	++	++	7,0

+ = Gel firme

-- = Nenhum gel ou gel não firme

As diluições que não apresentaram interferência para DTPA, Fitato, GHA, SAH e Sn Coloidal foram a partir de, respectivamente, 1:16, 1:200, 1:4, 1:4 e 1:8.

McCullough [33] recomendou que a concentração de escolha para o teste seja abaixo da MDV, mas acima da concentração não interferente definida porque permite uma maior flexibilidade.

A TAB. 3 apresenta os resultados dos ensaios de interferência nas diluições seriadas de MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga e ²⁰¹Tl.

TABELA 3 - Resultados dos Ensaios de Interferência nas Diluições Seriadas de MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga e ²⁰¹Tl

Produto	Diluição do Produto	Controle Negativo		Controle Positivo		pH
MIBG- ¹³¹ I	1:10	--	--	++	++	7,0
	1:50	--	--	++	++	7,0
	1:100	--	--	++	++	7,0
⁶⁷ Ga	1:10	++	--	++	++	7,0
	1:50	++	--	++	++	7,0
	1:100	--	--	++	++	7,0
²⁰¹ Tl	1:10	--	--	++	++	7,0
	1:50	--	--	++	++	7,0
	1:100	--	--	++	++	7,0

+ = Gel firme

-- = Nenhum gel ou gel não firme

MIBG-¹³¹I e ²⁰¹Tl atenderam individualmente os requisitos para o teste sem ajuste de pH a partir da diluição 1:10. ⁶⁷Ga atendeu os requisitos para o teste na diluição 1:100.

Como as preparações de amostras nessas diluições não são de fácil aplicação na rotina de controle de qualidade, foi definido o fator de diluição 1:100 para a validação dos produtos (com exceção do Fitato) pela praticidade.

Recomenda-se que os procedimentos de operação padrão (POP) sejam padronizados o máximo possível considerando os esquemas de diluições e etapas do teste para evitar variações excessivas.[33]

Twohy e col. [36] avaliaram os radiofármacos citrato de Gálio-67, ^{99m}Tc -DTPA, Gerador de ^{99m}Tc e cloreto de Tálcio-201 e as diluições não interferentes encontradas foram 2, 8, sem diluição e 2 vezes, respectivamente.

5.1.3 Séries de Diluição do Padrão de Endotoxina

A Série de Diluição do Padrão de Endotoxina com o produto foi feita em 3 lotes consecutivos no fator de diluição 1:100 para MIBG- ^{131}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl , DTPA, GHA, SAH e Sn Coloidal, em paralelo com a Série de Diluição do Padrão de Endotoxina em água, conforme mostrado na TAB. 4.

5.1.3.1 Determinação da Sensibilidade do Reagente LAL

A USP estabelece que a sensibilidade declarada do lisado é válida quando o resultado da Média Geométrica do Ponto Final de Gelificação (equação 3) estiver entre $0,5\lambda$ ($0,06 \text{ UE mL}^{-1}$) e 2λ ($0,25 \text{ UE mL}^{-1}$). [15] Utilizando os resultados (TAB. 4) das séries do Padrão de Endotoxina em água, foi calculada a sensibilidade do LAL e o valor obtido foi $\lambda=0,06 \text{ UE mL}^{-1}$, dentro da faixa aceitável.

A proposta inicial do trabalho era realizar a validação de SAH- ^{131}I , porém devido à pequena demanda comercial, não houve produto suficiente para o ensaio como havia sido programado, sendo assim, foi substituído pelo reagente liofilizado SAH.

A validação para o produto em uma determinada diluição é considerada válida quando:

- O resultado para a menor concentração das soluções padrões ($0,03 \text{ UE mL}^{-1}$) for negativo em todas as replicatas. [12,15]
- A diferença entre o ponto final de gelificação das séries de diluições em água e no produto for de, no máximo, um fator de diluição. [4,19]
- O pH da mistura amostra-lisado estiver na faixa de 6,0 a 8,0. [4]

Considerando que a sensibilidade calculada do reagente LAL foi $0,06 \text{ UE mL}^{-1}$, e substituindo-se esse valor na Equação 4, obtém-se MDV igual a 400. No caso do Fitato, diluições maiores que 200 até 400 vezes apresentaram interferência na Série de Diluição do Padrão de Endotoxina (dados não apresentados).

O GHA não apresentou resultados satisfatórios porque o valor calculado foi menor que $0,5\lambda$ (TAB. 4).

Os produtos MIBG- ^{131}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl , DTPA, SAH e Sn Coloidal foram validados no método de formação de gel, na diluição 1:100, porque atenderam aos requisitos descritos.

O controle negativo e o controle positivo do produto devem ser realizados diariamente. Qualquer alteração na formulação, reagente ou método de produção necessita ser avaliada quanto aos níveis de endotoxina.[17,20]

Para o método de formação de gel com critério de aceitação passa ou não passa, estudos de estimativa da incerteza de medição são importantes para a verificação das probabilidades de respostas falsas, particularmente falsos-positivos e falsos-negativos.[35]

Todos os lotes com resultados válidos para o método de formação de gel foram analisados pelo método cromogênico e alguns também foram submetidos ao ensaio turbidimétrico. Entre os reagentes liofilizados, o Fitato e o GHA apresentaram interferência com resultados não válidos no método de formação de gel e foram avaliados nos métodos cinéticos cromogênico e turbidimétrico para verificar a influência das diluições nos resultados.

5.2 Validação pelo Método Cromogênico – PTS

O método cromogênico é usado para medir a liberação do cromóforo de um peptídeo cromogênico adequado pela reação da endotoxina com o lisado e baseia-

se na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a quantidade de cromóforo liberado no final de um período de incubação (Esquema 2).

Como existe uma relação linear entre o log da concentração de endotoxina e o log do tempo de reação, é medido o tempo necessário para a mistura de reação atingir uma absorvância pré-determinada ou a velocidade do desenvolvimento da cor.[12] Desta forma, as concentrações de endotoxina no produto (CEP) e no controle positivo do produto (CPP) na diluição analisada são obtidas pela interpolação da curva padrão arquivada. A curva arquivada é válida apenas para a mesma combinação de endotoxina e LAL.

Os critérios de aceitação para o método cromogênico estão expressos na TAB. 5.[12]

TABELA 5 - Critérios de Aceitação para o Método Cromogênico [12]

Parâmetro	Critério de Aceitação
Coeficiente de Correlação da Curva Padrão Arquivada (R)	$\leq -0,980$
Recuperação do Controle Positivo do Produto (RCP)	50 a 200%
Coeficiente de Variação (CV)	< 25%

A porcentagem de recuperação do controle positivo do produto (RCP) representa a relação entre a concentração de endotoxina do controle positivo do produto e uma concentração específica de endotoxina ($0,3 \text{ UE mL}^{-1}$). Se o valor de % de recuperação estiver fora da faixa de 50 a 200, significa que, na diluição estudada, está ocorrendo interferência do produto. Para ser considerada livre de fatores interferentes sob as condições do ensaio, a concentração medida da endotoxina adicionada à solução da amostra deve estar entre 50 e 200% da concentração conhecida de endotoxina adicionada.[4] O coeficiente de variação (CV) é a diferença percentual de leitura entre as amostras. A duração do ensaio é o tempo necessário para que se atinja um valor de densidade óptica pré-estabelecido. [4,15]

5.2.1 Cálculo de MDV

Os cálculos de MDV para o método cromogênico são feitos conforme a equação 4, considerando a sensibilidade do LAL como o menor ponto da curva padrão arquivada ($\lambda = 0,05 \text{ UE mL}^{-1}$).[33] Como a sensibilidade do LAL é menor, pode-se utilizar uma diluição 2,5 vezes maior que no método de formação do gel, ou seja, 500 vezes.

5.2.2 Inibição ou Potencialização

Foram feitos ensaios nas diluições 1:5, 1:100, 1:150, 1:200, 1:300 e 1:400 em 4 lotes de Fitato, para verificar em qual diluição não ocorre interferência. Os resultados estão relacionados na TAB. 6 e representados no Gráfico 1.

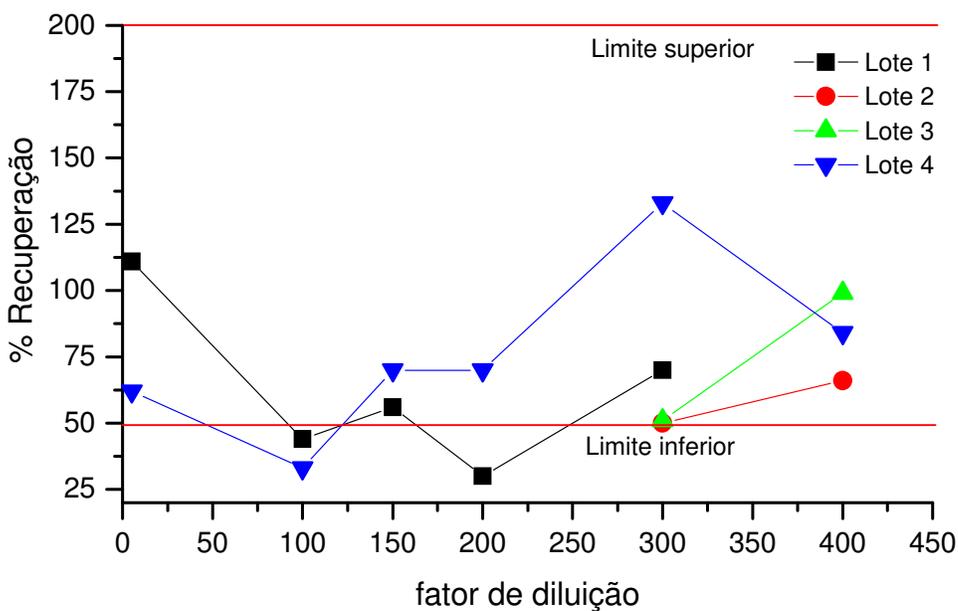


Gráfico 1 - Efeito da Diluição de Fitato na % de RCPP no Método Cromogênico.

TABELA 6 - Resultados dos Testes de Interferência em Fitato pelo Método Cromogênico-PTS.

Fitato Lote	Diluição	CEP (UE mL ⁻¹)	%CV Produto	CPP (UE mL ⁻¹)	%CV do CPP	% RCPP
1	1:5	0,595	2,9	0,344	14,0	111
	1:100	<5,00	0,0	0,137	9,9	44
	1:150	<7,50	2,9	0,174	3,1	56
	1:200	<10,0	0,0	0,092	4,9	30
	1:300	<15,0	0,0	0,216	11,7	70
2	1:300	<15,0	0,0	0,155	1,3	50
	1:400	<20,0	26,8	0,407	1,0	66
3	1:300	<15,0	2,9	0,158	3,0	51
	1:400	<20,0	0,0	0,614	1,7	99
4	1:5	0,321	6,1	0,194	28,4	62
	1:100	<5,00	35,0	0,104	7,2	33
	1:150	<7,50	0,0	0,218	3,3	70
	1:200	<10,0	0,0	0,216	6,6	70
	1:300	<15,0	0,0	0,351	0,4	133
	1:400	<20,0	0,0	0,520	7,3	84

Observa-se no Gráfico 1 e na TAB. 6 que nos lotes estudados não ocorreu interferência, isto é, % RCPP maior ou igual a 50 na diluição de 1:300.

A concentração de endotoxina (CEP) encontrada em todos os produtos nas diluições estudadas (exceção na diluição 1:5) foi menor que a menor concentração da curva padrão multiplicada pelo fator de diluição (TAB. 6).

A TAB. 7 mostra os resultados obtidos no método cromogênico dos produtos MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, DTPA, GHA, SAH e Sn Coloidal na diluição 1:100, que foi estabelecida no método de formação de gel.

TABELA 7 - Resultados de MIBG-¹³¹I, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, DTPA, GHA, SAH e Sn Coloidal na Diluição 1:100 no Método Cromogênico-PTS.

Produto	Lote	CEP (UE mL ⁻¹)	CPP (UE mL ⁻¹)	% CV do CPP	% RCPP
MIBG-¹³¹I	3	<5,0	0,658	2,3	106
	4	<5,0	1,070	9,7	173
	5	<5,0	0,813	1,2	131
⁶⁷Ga	4	<5,0	0,391	1,3	126
	5	<5,0	0,374	7,9	83
	6	<5,0	0,257	0,4	120
²⁰¹Tl	4	<5,0	0,260	3,1	84
	5	<5,0	0,327	7,1	105
	6	<5,0	0,333	6,3	107
DTPA	1	<5,0	0,192	6,0	62
	2	<5,0	0,243	3,8	78
	3	<5,0	0,255	5,4	82
GHA	4	<5,0	0,369	1,8	60
	2	<5,0	0,339	7,2	109
	3	<5,0	0,546	7,9	88
SAH	1	<5,0	0,271	0,4	87
	2	<5,0	0,218	10,6	70
	3	<5,0	0,285	1,2	92
Sn Coloidal	1	<5,0	0,480	1,4	155
	2	<5,0	0,339	4,6	109
	3	<5,0	0,417	5,4	134

Os resultados de % RCPP dos três lotes de cada produto estão entre 50 e 200%, e % CV do CPP < 25, e por isso foram validados no método cromogênico.

A % CV do CEP foi menor que 0,1 em todas as amostras analisadas.

O método cromogênico é bastante interessante pela rapidez dos ensaios com tempo total de análise de cerca de 20 minutos, por isso foi também desenvolvida a metodologia para determinação de endotoxina em radiofármaco de meia-vida física curta utilizado em Tomografia por Emissão de Póstron (PET), como o FDG-¹⁸F.

Na TAB. 8 estão descritos os resultados de interferência em FDG-¹⁸F. Foram analisados três lotes de FDG-¹⁸F utilizando fatores de diluição: sem diluição, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50.

TABELA 8 - Resultados dos Testes de Interferência em FDG-¹⁸F no Método Cromogênico-PTS.

FDG- ¹⁸ F Lote	Diluição	CEP (UE mL ⁻¹)	CPP (UE mL ⁻¹)	%CV do CPP	% RCPP
1	1:1	<2,50	0,082	10,5	26
	1:5	<2,50	0,374	16,6	120
	1:10	<2,50	0,241	0,4	78
	1:20	<2,50	0,229	6,3	74
	1:50	<2,50	0,302	6,5	98
2	1:1	<2,50	0,0	0,0	0,0
	1:5	<2,50	0,264	2,3	85
	1:10	<2,50	0,374	2,6	120
	1:20	<2,50	0,262	3,5	84
	1:50	<2,50	0,292	8,0	94
3	1:1	<2,50	0,074	4,9	24
	1:5	<2,50	0,229	2,6	74
	1:10	<2,50	0,572	13,7	185
	1:20	<2,50	0,205	3,9	66
	1:50	<2,50	0,387	8,0	125

O gráfico 2 mostra a variação da % de RCPP nas diluições: sem diluição, 5, 10, 20 e 50 vezes em 3 lotes de FDG-¹⁸F.

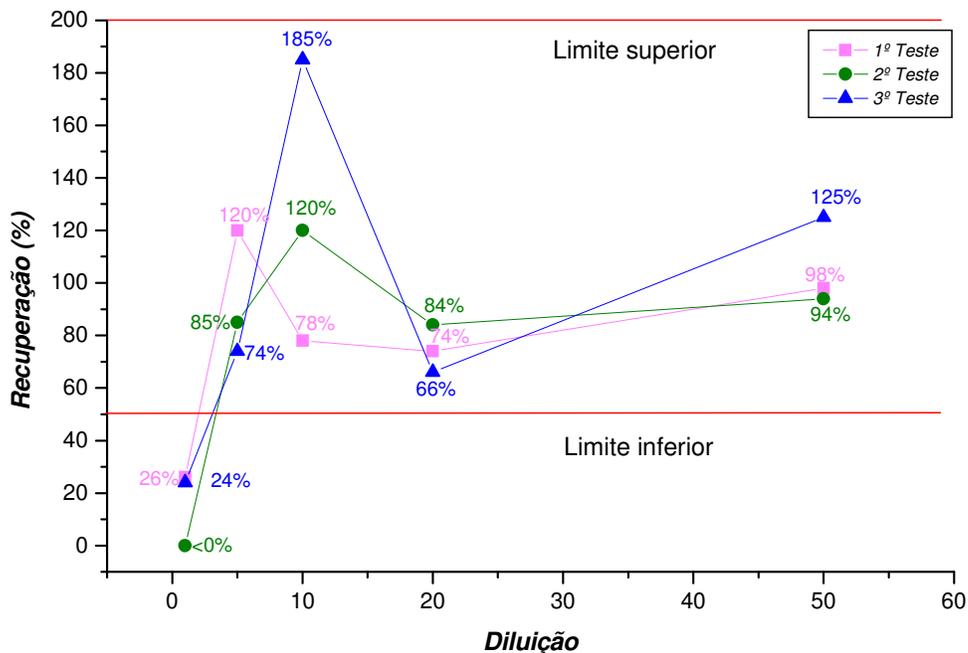


Gráfico 2 - Efeito da Diluição de FDG-¹⁸F na % de RCPP no Método Cromogênico-PTS.

Os melhores resultados foram obtidos a partir da diluição 1:5, mas foi escolhida a diluição de 1:50 para analisar mais nove lotes de FDG-¹⁸F (TAB. 9).

A concentração de endotoxina (CEP) encontrada foi menor que a menor concentração da curva padrão multiplicada pelo fator de diluição.

TABELA 9 - Resultados dos ensaios para determinação de endotoxina em 9 lotes de FDG-¹⁸F pelo método cromogênico-PTS, utilizando diluição 1:50.

FDG- ¹⁸ F Lote	CEP (UE mL ⁻¹)	CPP (UE mL ⁻¹)	%CV do CPP	% RCPP
A	<2,50	0,178	8,2	58
B	<2,50	0,243	4,5	78
C	<2,50	0,330	2,5	106
D	<2,50	0,534	5,9	172
E	<2,50	0,098	7,0	32
F	<2,50	0,436	8,8	141
G	<2,50	0,198	6,0	64
H	<2,50	0,377	6,6	122
I	<2,50	0,336	5,1	108

Observou-se que, com exceção do lote E de FDG-¹⁸F, todos os demais apresentaram % RCPP dentro da faixa especificada e % CV menor que 25.

Como os reagentes liofilizados para radiodiagnóstico marcados com ^{99m}Tc são amplamente utilizados para obtenção de imagens cintilográficas em Medicina Nuclear, foram feitos ensaios em eluídos de três lotes de geradores de ^{99m}Tc para verificação de interferências pelo método cinético cromogênico-PTS.

Na TAB. 10 estão relacionados os resultados dos ensaios em três lotes do produto nos fatores de diluição: sem diluição, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 e 1:200.

Tabela 10 - Resultados dos Testes de Interferência em Geradores de ^{99m}Tc pelo Método Cromogênico.

Gerador Lote	Diluição	CEP (UE mL ⁻¹)	CPP (UE mL ⁻¹)	%CV do CPP	% RCPP
1	1:1	<0,050	0,020	5,1	3
	1:5	<0,250	0,382	4,4	55
	1:10	<0,500	0,476	1,9	69
	1:20	<1,00	0,692	1,1	100
	1:50	<2,50	0,560	4,6	81
	1:100	<5,00	0,678	3,3	98
	1:200	<10,00	0,565	0	82
2	1:1	<0,050	0,026	2,9	4
	1:5	<0,250	0,414	3,2	60
	1:10	<0,500	0,624	3,2	90
	1:20	<1,00	0,795	4,1	115
	1:50	<2,50	0,849	3,0	123
	1:100	<5,00	0,560	2,6	81
	1:200	<10,00	0,576	1,0	84
3	1:1	<0,060	0,082	0,9	12
	1:5	<0,250	0,533	0	77
	1:10	<0,500	0,560	1,5	81
	1:20	<1,00	0,582	3,6	84
	1:50	<2,50	0,940	5,0	136
	1:100	<6,46	0,807	1,2	117
	1:200	<10,00	0,729	0,6	106

Nos três lotes analisados, o produto não diluído apresentou % de RCPP abaixo do limite estabelecido, mas a partir do fator de diluição 1:5 até 1:200, a % RCPP mostrou resultados satisfatórios. Em todas as amostras a % CV foi menor que 25.

O gráfico 3 mostra a variação da % de RCPP no método cromogênico nas diluições: sem diluição, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 vezes em três lotes consecutivos de geradores de ^{99m}Tc .

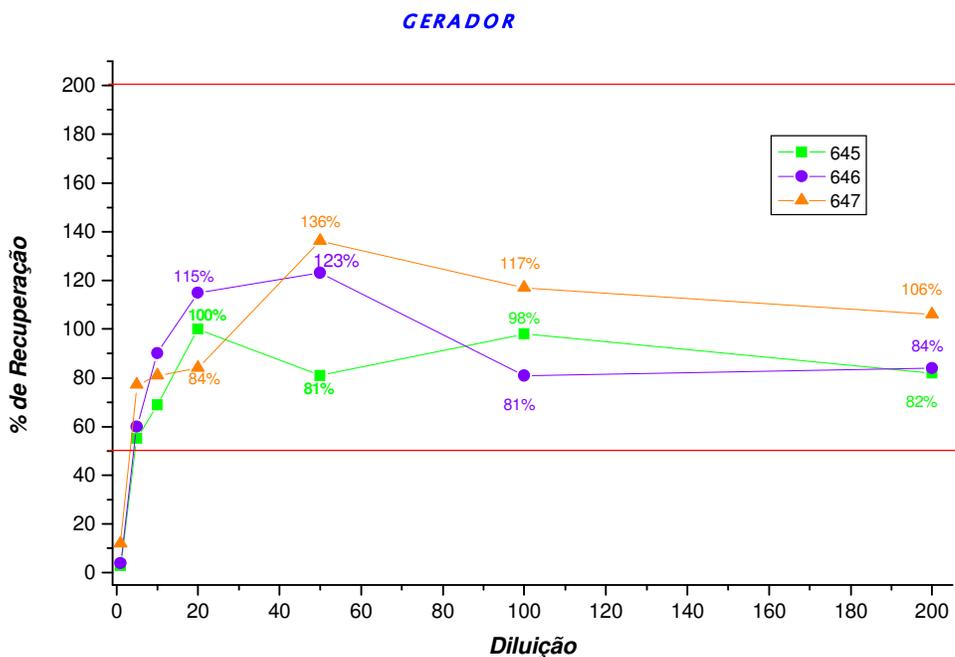


Gráfico 3 - Efeito da Diluição em Eluídos de Geradores de ^{99m}Tc na % de RCPP no Método Cromogênico-PTS.

Observa-se pelo gráfico 3 que os três lotes de geradores de ^{99m}Tc apresentaram perfil de % de RCPP semelhante nas séries de diluições estudadas.

5.3 Validação pelo Método Turbidimétrico

A técnica turbidimétrica baseia-se na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a turbidez (absorbância ou transmitância) da mistura de reação no final do período de incubação.[12]

Como existe uma relação linear entre o log da concentração de endotoxina e o log do tempo de reação, é medido o tempo necessário para a mistura de reação atingir uma absorbância pré-determinada ou a velocidade do desenvolvimento da turbidez.[12] Desta forma, utilizando concentrações conhecidas de endotoxina obtém-se a curva padrão em que as concentrações de endotoxina no produto (CEP) e no controle positivo do produto (CPP) na diluição analisada são determinadas pela interpolação da curva padrão.

Os critérios de aceitação para o método turbidimétrico são: $R \leq -0,980$, RCPP de 50 a 200% e $CV < 10\%$.

5.3.1 Cálculo de MDV

Os cálculos de MDV para o método turbidimétrico são feitos conforme a equação 4, considerando a sensibilidade do LAL como o menor ponto da curva padrão ($\lambda = 0,05 \text{ UE mL}^{-1}$), similar ao método cromogênico. Como a sensibilidade do LAL é menor, pode-se utilizar uma diluição 2,5 vezes maior que no método de formação do gel, ou seja, 500 vezes.

5.3.2 Inibição ou Potencialização

Para cálculo da CEP e do % RCPP em diluições do produto, foi necessária a obtenção da curva padrão com 3 concentrações conhecidas de endotoxina (5; 0,5 e $0,05 \text{ UE mL}^{-1}$). A TAB. 11 apresenta os dados da curva padrão no ensaio turbidimétrico, com os quais foi construído o gráfico log da concentração do padrão de endotoxina *versus* log do tempo (Gráfico 4).

O Tempo Médio de Reação é o tempo necessário para o produto atingir uma absorbância pré-determinada.

Tabela 11 - Dados da Curva Padrão no Método Turbidimétrico.

Concentração do Padrão (UE mL ⁻¹)	Tempo Médio de Reação (s)	% CV	Valor Calculado (UE mL ⁻¹)
5	445,3	2,72	>5,2730
0,5	1030,1	2,44	0,4496
0,05	2137,8	4,85	<0,0527

A quantidade de endotoxina presente na amostra é inversamente proporcional ao tempo de reação.

A partir do gráfico 4, foram obtidos os parâmetros R igual a -0,9992, coeficiente angular -0,03407 e coeficiente linear 2,8946. Como o coeficiente de variação para cada uma das concentrações foi < 10% e R < -0,980, a curva padrão foi considerada válida.

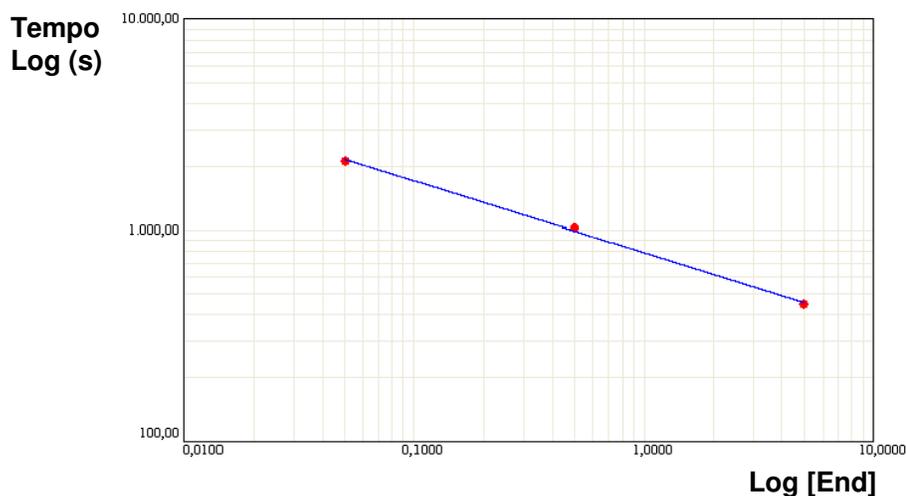


Gráfico 4 - Curva Padrão (log-log) de Endotoxina nas Concentrações de 5; 0,5 e 0,05 UE mL⁻¹ pelo Tempo de Reação.

Na TAB. 12 estão relacionados os resultados dos ensaios realizados em várias diluições de ^{67}Ga , Fitato, GHA e SAH pelo método turbidimétrico.

TABELA 12 - Resultados dos Testes de Interferência de ^{67}Ga , Fitato, GHA e SAH no Método Turbidimétrico.

Produto	Diluição	CEP (UE mL ⁻¹)	Tempo Médio de Reação ¹ (s)	CPP (UE mL ⁻¹)	Tempo Médio de Reação ² (s)	% CV do CPP	% RCP	Resultado
^{67}Ga	1:100	<5,00	>2249,0	0,1953	1368,5	1,15	58	Válido
Lote 7	1:150	<7,50	>2249,0	0,2216	1310,9	0,52	69	Válido
^{67}Ga	1:100	<5,00	>2249,0	0,2095	1336,1	2,96	64	Válido
Lote 8	1:150	<7,50	>2249,0	0,1654	1448,2	0,56	46	<i>Não Válido</i>
	1:200	<10,00	>2249,0	0,2093	1256,5	3,02	64	Válido
^{67}Ga	1:100	<5,00	>2249,0	0,1929	1374,3	1,84	57	Válido
Lote 9	1:150	<7,50	>2249,0	0,2149	1324,6	1,09	66	Válido
Fitato	1:150	<7,50	>2249,0	0,2431	1270,1	0,14	77	Válido
	1:200	<10,00	>2249,0	0,2569	1246,4	0,88	83	Válido
	1:300	<15,00	>2249,0	0,2406	1274,7	0,05	76	Válido
GHA	1:100	<5,00	>2249,0	0,1781	1412,1	0,91	51	Válido
Lote 5	1:150	<7,50	>2249,0	0,1767	1416,1	0,10	51	Válido
SAH	1:100	<5,00	>2249,0	0,2342	1286,4	0,78	74	Válido
Lote 4	1:200	<10,00	>2249,0	0,2170	1320,3	1,46	67	Válido
Água	----	<0,0500	>2249,0	<0,0500	----	0,00	----	Válido

¹ Tempo Médio de Reação do Produto ² Tempo Médio de Reação do Controle Positivo do Produto

Pelo método turbidimétrico, foi verificado que para ^{67}Ga , GHA e SAH, o ensaio na diluição 1: 100 foi válido. O Fitato, diferentemente do método de formação de gel, não apresentou problemas de interferência nas diluições estudadas.

Os resultados de validação dos produtos nos métodos de formação de gel, cromogênico-PTS e turbidimétrico estão apresentados na TAB. 13.

TABELA 13 - Resultados de Validação dos Produtos nos Métodos de Formação de Gel, Cromogênico-PTS e Turbidimétrico.

Método			
Produto	Formação de Gel	Cromogênico-PTS	Turbidimétrico
MIBG-^{131}I	Válido*	Válido*	-----
^{67}Ga	Válido*	Válido*	Válido*
^{201}Tl	Válido*	Válido*	-----
DTPA	Válido*	Válido*	-----
Fitato	-----	Válido**	Válido**
GHA	-----	Válido*	Válido*
SAH	Válido*	Válido*	Válido*
Sn Coloidal	Válido*	Válido*	-----
FDG-^{18}F	-----	Válido***	-----
Gerador de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	-----	Válido****	-----

* Diluição 1:100 ** Diluição 1:300 *** Diluição 1:50 **** Diluição 1:5

Os resultados da TAB. 13 mostram que os produtos com resultados válidos no método de formação de gel confirmaram a validação quando foram submetidos ao cromogênico-PTS, enquanto que Fitato e GHA apresentaram no método turbidimétrico a confirmação dos resultados válidos obtidos no método cromogênico-PTS.

A concentração de endotoxina em todos os lotes de produtos estudados estava abaixo do limite de endotoxina especificado nos compêndios oficiais.

A TAB. 14 apresenta um estudo comparativo entre os métodos de formação de gel, cromogênico-PTS e turbidimétrico.

TABELA 14 - Estudo Comparativo dos Métodos de Formação de Gel, Cromogênico-PTS e Turbidimétrico para Determinação de Endotoxina.[1,4]

Formação de Gel	Cromogênico-PTS	Turbidimétrico
semi-quantitativo	quantitativo (densidade óptica a 405 nm)	quantitativo (densidade óptica a 340 nm)
simples, rápido (60 minutos)	simples, mais rápido (15 a 20 minutos), portátil	Rápido (60 minutos)
100 µL amostra	25 µL amostra	100 µL amostra
não necessita de equipamento especializado (banho-maria)	fotométrico (PTS)	fotométrico (TECAN SUNRISE)
para radiofármacos de meia-vida física curta, análise de água, produto em processo e acabado	para radiofármacos de meia-vida física curta, análise de água, produto em processo e acabado	no caso de radiofármacos, impossibilidade de acúmulo de amostras (96 poços por placa)
sensibilidade do LAL 0,25 a 0,015 UE mL ⁻¹	sensibilidade do LAL 0,05 UE mL ⁻¹	sensibilidade do LAL 0,05 UE mL ⁻¹
requer preparação de 5 concentrações de padrão de endotoxina	não requer preparação de padrão de endotoxina	requer preparação de 3 concentrações de padrão de endotoxina
curva padrão 0,50; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03 UE mL ⁻¹	curva padrão arquivada 5,0; 0,5; 0,05 UE mL ⁻¹	curva padrão 5,0; 0,5; 0,05 UE mL ⁻¹
critério de aceitação: passa/não passa	critério de aceitação: coeficiente de correlação $\leq -0,980$, recuperação do controle positivo do produto (RCPP) de 50 a 200% e Coeficiente de Variação (CV) < 25%	critério de aceitação: coeficiente de correlação $\leq -0,980$, recuperação do controle positivo do produto (RCPP) de 50 a 200% e Coeficiente de Variação (CV) < 10%
ponto final de gelificação	desenvolvimento de cor	desenvolvimento de turbidez
leitura e registro manual	automatizado, armazena os dados eletronicamente	automatizado, armazena os dados eletronicamente
fatores interferentes	limitação de amostras opacas ou coloridas	limitação de amostras opacas ou coloridas

Em vista da necessidade de realização de muitos ensaios de rotina no controle de qualidade, foi feito um levantamento de custos dos materiais utilizados nos três métodos estudados para comparar o custo por lote de produto em cada método.

Na TAB. 15 estão discriminados os materiais, os custos individuais e o custo por lote de produto.

TABELA 15 - Comparação dos Custos dos Materiais utilizados nos Ensaios de Formação de Gel, Turbidimétrico e Cromogênico-PTS (Base outubro de 2007).

Reagente/Material	R\$		
	Formação de gel	Turbidimétrico	Cromogênico-PTS
LAL 50 testes	410,00	430,00 x 2	---
Endotoxina	310,00	310,00	---
Água apirogênica	205,00	205,00	---
50 tubos de reação	280,00	---	---
Placa 96 testes	---	65,00	---
Cartucho	---	---	157,00
Custo Total	1.205,00	1.440,00	---
Custo/teste	24,10	14,40	---
Nº testes/lote	08	12	01
Custo/lote	192,80	172,80	157,00

O cálculo do número total de testes realizados para cada lote de produto em procedimento de rotina é:

- ✓ método de formação de gel – duplicatas de controle positivo do produto, controle negativo, controle positivo da água e controle negativo da água, totalizando 8 testes;

- ✓ método turbidimétrico - duplicatas de 3 concentrações da curva padrão, controle positivo do produto, controle negativo do produto e controle negativo da água totalizando 12 testes;
- ✓ método cromogênico-PTS - um cartucho para cada lote de produto.

Analisando os custos apresentados na TAB. 15, embora o método de formação de gel apresente o maior custo por lote analisado, deve-se levar em consideração que somente a cada novo lote de Padrão de Endotoxina e Reagente LAL a sensibilidade do reagente deve ser confirmada com quadruplicatas de 5 concentrações de padrão de endotoxina. No método turbidimétrico, a placa de incubação pode ser utilizada a cada 96 testes e a curva padrão obtida a cada novo lote de Padrão de Endotoxina e Reagente LAL. As considerações feitas tornam os custos dos ensaios de formação de gel e turbidimétrico menores do que os descritos na TAB. 15 quando se analisa concomitantemente vários lotes utilizando parte dos mesmos materiais.

6 CONCLUSÕES

O Ensaio do LAL mostrou-se sensível, prático e de fácil utilização em Medicina Nuclear devido aos pequenos volumes de análise, menor tempo e simplicidade quando comparado com o Ensaio USP de Pirogênio *in vivo*. Para radiofármacos de meia vida física curta os quais devem ser produzidos próximo ao local de uso e preparados em pequenos volumes com alta atividade específica, é particularmente adequado.[13,17]

O fato de que alguns produtos propostos neste trabalho, como o Fitato e GHA, não apresentaram bons resultados no método de formação de gel, requer uma investigação para a determinação das causas da interferência. O reagente LAL utilizado em todos os ensaios era tamponado e as medidas de pH estavam dentro da faixa especificada, descartando a possibilidade da interferência do pH. Cátions divalentes, como o cálcio, também podem influenciar no teste, mas alguns estudos realizados não comprovaram, de forma definitiva, essa interferência.

Algumas questões de interferência foram evitadas de maneira simples, como diluição da amostra, utilização de LAL tamponado e recipientes adequados, amostragem, calibração e qualificação de equipamentos, calibração de micropipeta e treinamento em pipetagem.

A flexibilidade na escolha de um método adequado para determinação de endotoxina bacteriana é uma alternativa para solucionar ou reduzir problemas de interferência.[32] Em vista dos resultados obtidos neste estudo, o método cromogênico-PTS pode ser aplicado para o Fitato e o GHA em substituição ao método de formação de gel.

A simplicidade dos métodos de determinação de endotoxinas bacterianas *in vitro* encoraja seu uso em soluções utilizadas em processo, matérias-primas, assim como em produtos finais de drogas e materiais descartáveis. A aplicação se estende também à avaliação de procedimentos de limpeza, objetivando minimizar concentrações de endotoxina nos produtos acabados.[1,11]

ANEXO 1 – Modelo de Ficha para Validação do Teste de Endotoxina Bacteriana pelo Método de Formação de Gel para Produto Acabado

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL) – VALIDAÇÃO DO TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA PARA PRODUTO ACABADO

Produto:	Lote:	Potência endotoxina:
Limite endotoxina:	MDV:	Concentração teste:

Reagente	Lote		Data Reidratação	Data Validade
	Fabricante	IPEN		
LAL 0,125 UE/mL				
Padrão de Endotoxina				
Água apirogênica				
Tubos apirogênicos				
Ponteiras 1mL				

Condições do teste			
Hora início:	Hora final:	pH	Temperatura Início: °C Fim : °C
Preparação da amostra			

RESULTADOS

Concentração de endotoxina UE/mL	0,50 4 λ	0,25 2 λ	0,125 λ	0,06 ½ λ	0,03 ¼ λ	Controle negativo da água	Ponto final gelificação	Média Geométrica
Padrão de Endotoxina em água								Log 10
								Antilog 10
Controle positivo do produto								

+ = GEL FIRME

- = NENHUM GEL OU GEL NÃO FIRME

- VÁLIDO
 NÃO VÁLIDO
 Obs.:

Técnico Operador:.....

Data:...../...../.....

Gerência do Controle de Qualidade: _____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. 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.
2. MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebócitos del *Limulus* (LAL). **Rev. Cub. Farm.** v. 38, n.1, p. 1-1 , 2004.
3. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA (RDC) Nº 210. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003.
4. WILLIAMS, K. L. **Endotoxins Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation**. 2. ed., New York, NY: Marcel Dekker Inc., p.113, 165-173, 180-183, 193-222, 311-312, 328-335, 2001.
5. MANUAL DE PROTOCOLOS DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS. São Paulo: ARCAL XV, p.10, 1999.
6. MANUAL DE BUENAS PRACTICAS RADIOFARMACEUTICAS. Montevideo: ARCAL XV, p.12, 1998.
7. SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5. ed., New York: Springer, p. 46-171, 2004.
8. OWUNWANNE, A., PATEL, M., SADEK, S. **The Handbook of Radiopharmaceuticals**. 1. ed., London: Chapman & Hall Medical, p. 16-19, 92-130, 1995.
9. THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 57-59, 2003.
10. ZIJLSTRA, S; GERHEN, P; RECHIN, C; WORTMANN, R.; NOLOTRAMIPRODJO, G. Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) Test for Routine PET Radiopharmaceuticals. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 48, p. 51-54, 1997.
11. PEARSON, F. C. **Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 3-7, 11-14, 23-44, 89-214, 1985.
12. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, p. 161-168, 2004.
13. COOPER, J. F.; LEVIN, J.; WAGNER JR, H.N. Quantitative Comparison of *in vitro* and *in vivo* Methods for the Detection of Endotoxin. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 78, p. 138-145, 1971;

¹Norma ABNT NBR 6023

14. WEARY, M. Understanding and Setting Endotoxin Limits. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 44, n.1, p. 16-17, 1990.
15. UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 30. ed., Rockville, United States Pharmacopeial Convention, v. 1, 2007.
16. 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.
17. WILLIAMS, C. C.; BORCHERT, R. D.; CLANTON, J. A. The Bacterial Endotoxin Test in the PET Facility. **J. Nucl. Med.**, v. 34, p. 469-473, 1993.
18. LEVIN, J.; BANG, F. B. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. **Thromb. Diath. Haemorr.**, v. 19, p.186, 1968.
19. GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END-PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, 1987.
20. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed., São Paulo, Atheneu , parte II, 1. fascículo, 1996.
21. TWOHY, C. W.; NIERMAN, M. L.; DURAN, A. P. Comparison of *Limulus* Amebocyte Lysates from Different Manufacturers. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 37, n. 3, p. 93-96, 1983.
22. JORGENSEN, J. H.; REICHLER, A. S. Automation of *Limulus* Amoebocyte Lysate Pyrogen Testing. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 36, n. 3, p. 96-98, 1982.
23. COOPER, J. F. LAL Interference Screening of In-process Materials and Finished Products. **LAL Times**, v. 5, n. 1, 1998.
24. COOPER, J. F. Documenting Validation of a BET Application. **LAL Times**, v. 6, n. 3, 1999.
25. COOPER, J.F. Resolving LAL Test Interferences. **J. Pharm. Sci. Tech.**, v. 44, n. 1, p. 13-15, 1990.
26. ROSLANSKY, P. F.; DAWSON, M. E.; NOVITSKY, T. J. Plastics, Endotoxins, and the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 45, n. 2, p. 83-87, 1991.

27. NOVITSKY, T. J.; SCHMIDT-GENGENBACH, J.; REMILLARD, J. F. Factors Affecting Recovery of Endotoxin Adsorbed to Container Surfaces. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 40, n. 6, p. 284-286, 1986.
28. SULLIVAN JR, J. D.; WATSON, S. W. Factors Affecting the Sensitivity of *Limulus* Lysate. **Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 6, p. 1023-1026, 1974.
29. TSUJI, K.; STEINDLER, K. A. Use of Magnesium to Increase Sensitivity of *Limulus* Amoebocyte Lysate for Detection of Endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 1342-1350, 1983.
30. STEINDLER, K. A.; TSUJI, K.; ENZINGER, R. M. Potentiating Effect of Calcium Gluconate on the *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) Gelation-Endpoint Assay for Endotoxin. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 35, n. 5, p. 242-247, 1981.
31. COOPER, J. F.; WEARY, M. E.; JORDAN, F. T. The Impact of Non-endotoxin LAL-Reactive Materials on *Limulus* Amebocyte Lysate Analyses. **J. Pharm. Sci. Tech.**, v. 51, p. 2-6, 1997.
32. McCULLOUGH, K. Z.; WEIDNER-LOEVEN, C. Variability in the LAL Test: Comparison of Three Kinetic Methods for the Testing of Pharmaceutical Products. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 46, n.3, p. 69-72, 1992.
33. McCULLOUGH, K. Z. Variability in the LAL Test. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 44, n.1, p. 19-21, 1990.
34. MURATA, H.; KOBAYASHI, M.; IIO, M.; YAMADA, H.; CHIBA, K.; MATSUI, K.; KAWAGUCHI, S. Sensitivity of the *Limulus* Test and Inhibitory Factors in the Radiopharmaceuticals. **J. Nucl. Med.**, v. 17, p. 1088-1092, 1976.
35. LOURENÇO, F. R.; KANEKO, T. M.; PINTO, T. J. A. Estimativa da Incerteza em Ensaio de Detecção de Endotoxina Bacteriana pelo Método de Gelificação. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 4, p. 437-442, 2005.
36. TWOHY, C. W.; DURAN, A. P.; MUNSON, T. E. Endotoxin Contamination of Parenteral Drugs and Radiopharmaceuticals as determined by the *Limulus* Amebocyte Lysate Method. **J. Parent. Sci. Tech.**, v. 38, n. 5, p. 190-201, 1984.