

FARMACOPEIA MERCOSUL: ENSAIO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

TENDO EM VISTA: O Tratado de Assunção, o Protocolo de Ouro Preto e as Resoluções Nº 31/11 e 22/14 do Grupo Mercado Comum.

CONSIDERANDO:

Que a Farmacopeia MERCOSUL tem como objetivo estabelecer requisitos mínimos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e promovendo o desenvolvimento técnico, científico e tecnológico regional.

Que as especificações farmacopeicas estabelecem, por meio de monografias, requisitos mínimos para o controle de segurança e qualidade dos insumos, especialidades farmacêuticas, plantas medicinais e derivados produzidos ou utilizados nos Estados Partes.

Que as especificações farmacopeicas são utilizadas como parâmetro para as ações de vigilância sanitária, incluindo o registro de medicamentos, inspeções e análises laboratoriais.

Que a Farmacopeia MERCOSUL e a produção de padrões próprios de qualidade favorecem o desenvolvimento científico e tecnológico dos Estados Partes, contribuindo para a diminuição da dependência de fornecedores estrangeiros e promovendo a indústria regional.

Que a Farmacopeia MERCOSUL deve ser primordialmente sanitária, com foco na saúde pública, e apresentar uma metodologia analítica acessível aos Estados Partes, buscando seu reconhecimento e respeitabilidade internacional.

Que o diálogo regulatório e a integração entre os Estados Partes promovem o acesso da população a medicamentos com maior qualidade e segurança.

Que o Acordo Nº 08/11 da Reunião de Ministros de Saúde do MERCOSUL constitui um marco de referência para a Farmacopeia MERCOSUL.

**O GRUPO MERCADO COMUM
RESOLVE:**

Art. 1º - Aprovar, no marco do estabelecido na Resolução GMC Nº 22/14, o método geral "Farmacopeia MERCOSUL: Ensaio de Endotoxinas Bacterianas", que consta como Anexo e faz parte da presente Resolução.

Art. 2º - Os Estados Partes indicarão, no âmbito do SGT Nº 11, os organismos nacionais competentes para a implementação da presente Resolução.

Art. 3º - Esta Resolução deverá ser incorporada ao ordenamento jurídico dos Estados Partes antes de...

XLV SGT Nº 11 – Montevideo, 14/IV/16.

ANEXO

ENSAIO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

O ensaio de endotoxinas bacterianas (EEB) é um ensaio para detectar ou quantificar endotoxinas de bactérias gram negativas usando um lisado de amebócitos de caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*).

Há três métodos para esse ensaio: o método de coagulação (gel-clot), baseado na formação de gel na presença de cátions divalentes; o método turbidimétrico, baseado no desenvolvimento de turbidez após ruptura de uniões de um substrato endógeno; e o método cromogênico, que se baseia no desenvolvimento de cor após a ruptura de um complexo sintético peptídeo-cromógeno. Efetuar o ensaio com um dos três métodos. Em caso de dúvidas ou controvérsias, a decisão final é tomada baseando-se no ensaio limite de coagulação, exceto quando houver indicação específica na monografia do produto em teste. O ensaio é realizado de modo a evitar a contaminação por endotoxinas.

Materiais

Eliminar os pirogênios de todo o material de vidro e outros materiais termoestáveis em estufa, mediante um processo validado. No caso de utilização de materiais plásticos, como microplacas e ponteiras de pipetas automáticas, usar aqueles que tenham demonstrado serem isentos de endotoxinas detectáveis e que não interfiram no teste. Neste capítulo, o termo “tubo” inclui qualquer outro recipiente, como, por exemplo, os poços das placas de microtitulação.

Reagentes e Soluções de ensaio

Lisado de Amebócitos - Um produto liofilizado obtido a partir de um lisado de amebócitos (leucócitos) de caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*). Este reagente refere-se apenas ao produto manufaturado de acordo com as regulamentações de autoridade competente.

O Lisado de Amebócitos reage com alguns β -glucanos, além de reagir com as endotoxinas. Existem preparações que não reagem com os glucanos, que são preparadas por remoção ou por inibição do fator G, que reage com os glucanos.

Água para Ensaio de Endotoxinas Bacterianas (EEB) – Utilizar água para injeção ou água produzida por outros procedimentos, que demonstre não haver reação com o lisado empregado no limite de detecção do reagente.

Reagente LAL - Dissolver com agitação suave o *Lisado de Amebócitos* em água para EEB ou em uma solução tampão recomendada pelo fabricante do lisado. Armazenar o lisado reconstituído, refrigerado ou congelado, de acordo com as especificações do fabricante.

Preparação das soluções

Solução Mãe do Padrão de Endotoxina - Preparar uma *Solução Mãe do Padrão de Endotoxina* a partir de um Padrão de Referência Internacional vigente ou de uma Endotoxina controle que tenha sido calibrada contra o mesmo. Seguir as especificações da bula e rótulo para a preparação e armazenamento da *Solução Mãe do Padrão de Endotoxina*. A concentração de endotoxina é expressa em Unidades de Endotoxina (UE). [NOTA - Uma Unidade de Endotoxina (UE) é igual a uma Unidade Internacional (UI) de endotoxina.]

Solução Padrão de Endotoxina - Depois de misturar vigorosamente a *Solução Mãe do Padrão de Endotoxina*, preparar as diluições seriadas apropriadas da *Solução Padrão de Endotoxina*, usando *Água para EEB*. Usar as diluições o mais rápido possível para evitar a perda de atividade por adsorção.

Soluções Amostra - Preparar a *Solução Amostra* dissolvendo ou diluindo os produtos em *Água para EEB*. Algumas substâncias ou preparações podem ser dissolvidas ou diluídas adequadamente em outras soluções aquosas. Se for necessário, ajustar o pH da solução (ou da diluição) em teste de modo que o pH da mistura do lisado e da *Solução Amostra* se encontre dentro do intervalo de pH especificado pelo fabricante do lisado, geralmente entre 6,0 e 8,0. O pH pode ser ajustado com um ácido, uma base ou uma solução tamponada adequada como especificado pelo fabricante do lisado. Os ácidos e as bases podem ser preparados a partir de concentrados ou sólidos com *Água para EEB* em recipientes isentos de endotoxinas detectáveis. Deve ser comprovado que as soluções tamponadas estão isentas de endotoxinas e outros fatores de interferência detectáveis.

Determinação da Máxima Diluição Válida (MDV)

A máxima diluição válida é a diluição máxima permitida de uma amostra em que se pode determinar o limite de endotoxina. Determinar a MDV a partir da seguinte equação:

$$\text{MDV} = (\text{limite de endotoxina} \times \text{concentração da } \textit{Solução Amostra}) / (\lambda)$$

Limite de Endotoxina - O limite de endotoxina para medicamentos de administração parenteral, definido segundo a dose, é igual a K/M , onde K é a dose pirogênica limite de endotoxina por kg de peso corpóreo e M é igual à dose máxima recomendada do produto, em bolo, por kg de peso corporal. Quando o produto for administrado em intervalos frequentes ou por infusão contínua, M é a dose máxima total administrada durante um período de uma hora. O limite de endotoxinas para os medicamentos de administração parenteral é especificado na monografia individual em unidades como UE/mL, UE/mg, UE/unidade de atividade biológica, UE/dose. K é 5 UE/kg para administração parenteral; 0,2 UE/kg para administração intratecal; 175 UE/V para produtos radiofarmacêuticos por via parenteral (V : é a dose máxima recomendada em mL); 14 UE/V para produtos radiofarmacêuticos por via intratecal e 100 UE/m² para preparações administradas por m² de superfície corporal, na qual M é a dose máxima por m².

Concentração da Solução Amostra

mg/mL: no caso do limite de endotoxina especificado por peso (UE/mg);

Unidades/mL: no caso do limite de endotoxina especificado por unidade de atividade biológica (UE/Unidade);
mL/mL: quando o limite de endotoxina é especificado por volume (UE/mL).

λ : a sensibilidade declarada no método de *Coagulação* (UE/mL) ou a menor concentração usada na curva padrão para o método *Turbidimétrico* ou o método *Cromogénico*.

MÉTODO DE COAGULAÇÃO

O método de coagulação é utilizado para detectar ou quantificar endotoxinas baseado-se na coagulação do lisado empregado como reagente na presença de endotoxina. A concentração mínima de endotoxina requerida para promover a coagulação nas condições padronizadas é a sensibilidade declarada do lisado empregado como reagente.

Para garantir tanto a precisão quanto a validade do ensaio, efetuar os ensaios para confirmar a sensibilidade declarada do lisado e para determinar fatores de interferência segundo descrito em *Ensaio Preparatórios*.

Ensaio Preparatórios

Ensaio de Confirmação da Sensibilidade Declarada do Lisado - Confirmar em quadruplicata a sensibilidade declarada, λ , expressa em UE/mL, do lisado antes de utilizá-lo no ensaio. O ensaio de confirmação da sensibilidade do lisado deve ser realizado quando for usado um novo lote de lisado ou quando há alguma alteração nas condições do ensaio que possam interferir no resultado. Preparar soluções padrão com pelo menos quatro concentrações equivalentes a $2,0 \lambda$, λ , $0,5 \lambda$ e $0,25 \lambda$, diluindo o padrão de referência de Endotoxina com *Água para EEB*.

Misturar um volume do reagente LAL com um volume igual (como por exemplo alíquotas de 0,1 mL) da *Solução Padrão de Endotoxina* em cada tubo de ensaio. Incubar a mistura de reação por um período constante, segundo as instruções do fabricante do lisado (habitualmente a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 ± 2 minutos), evitando vibrações. Para analisar a integridade do gel, retirar os tubos um a um diretamente da incubadora e com um único movimento suave, invertendo aproximadamente a 180° . Se houver formado um gel firme que permanece em seu lugar após a inversão dos tubos, considerar o resultado como positivo. O resultado é negativo se não for formado um gel intacto. O ensaio é considerado válido quando a menor concentração da solução padrão apresentar um resultado negativo em todas as réplicas. O limite é a menor concentração da série de concentrações decrescentes de endotoxina padrão que coagula o lisado. Determinar a média geométrica do limite, calculando a média dos logaritmos das concentrações no limite da série de quatro réplicas e calculando posteriormente o antilogaritmo da média, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{média geométrica da concentração no limite} = \text{antilogaritmo } (\sum e/f)$$

onde $\sum e$ é a soma dos logaritmos das concentrações no limite da série de diluições

utilizadas, e f é o número de réplicas. A média geométrica da concentração no limite é a sensibilidade medida do lisado (em UE/mL). Se a mesma estiver compreendida entre $0,5-2 \lambda$, se confirma a sensibilidade declarada.

Ensaio de Fatores de Interferência- O ensaio de inibição ou potencialização deve ser repetido cada vez que se utilizar um novo lote de *Reagente LAL* ou se houver alteração da formulação do produto.

Realizar o ensaio em alíquotas da amostra ou em uma diluição que não exceda a máxima diluição válida (MDV), nas quais não há endotoxina detectável. O ensaio é realizado na amostra sem e com adição de endotoxina; neste caso, preparar as diluições da amostra de modo a obter concentrações finais de endotoxina de $2,0 \lambda$; $1,0 \lambda$; $0,5 \lambda$; $0,25 \lambda$. Testar em paralelo as mesmas concentrações de endotoxina em *Água para EEB* e os controles negativos destes. Testar cada solução pelo menos em quadruplicata. Calcular a média geométrica da concentração do limite segundo o *Ensaio de confirmação da sensibilidade do lisado*.

O ensaio somente é válido se a sensibilidade do *Reagente LAL*, determinada na presença da preparação testada, não difere em mais de um fator de 2 em relação àquela determinada em *Água para EEB*, isto é, se a média geométrica da concentração do limite na amostra com endotoxina for maior ou igual a $0,5 \lambda$, e menor ou igual a $2,0 \lambda$. Se a análise indicar inibição ou potencialização, repetir o ensaio empregando as amostras diluídas adequadamente por um fator que não exceda a MDV. Deste modo, para subseqüentes determinações de endotoxina nas amostras deve ser empregada a diluição que não exceda a MDV e seja suficiente para superar a inibição ou potencialização. Outras formas de eliminar interferências, além das diluições, podem ser filtrações, neutralizações, diálises ou adição de substâncias que retirem a endotoxina adsorvida. O emprego de um *Reagente LAL* de maior sensibilidade permite realizar diluições maiores das preparações a serem testadas e contribuem para a eliminação de interferências. Se nas condições do ensaio de inibição ou potencialização são detectadas endotoxinas endógenas nas amostras não tratadas, as mesmas podem ser adequadas separando a endotoxina presente por ultrafiltração, sempre e quando esta metodologia permitir a separação da endotoxina do produto.

Procedimento - Transferir a cada um dos tubos de ensaio de $10 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$, os volumes indicados ($0,1 \text{ mL}$) de: controles negativos, as diluições selecionadas de *Endotoxina de referência*, a amostra sem diluir e/ou as diluições da amostra a ser testada e os controles positivos desta/s (preparados pela adição de uma concentração de endotoxina igual a $2,0 \lambda$), em duplicata. Adicionar em cada tubo volumes iguais de *Reagente LAL* reconstituído e agitar suavemente para misturar. Incubar a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 ± 2 minutos, evitando vibrações. Após a incubação, retirar cada tubo cuidadosamente para sua observação. Um resultado positivo (+) se caracteriza pela formação de um gel firme que se mantém quando se inverte o tubo a 180° . Um resultado negativo (-) se caracteriza pela ausência do gel ou pela formação de um gel viscoso que não mantém sua integridade ao inverter o tubo a 180° .

Ensaio limite

É aplicado quando o objetivo do ensaio é comprovar que o produto a ser testado apresenta uma concentração de endotoxinas menor do que aquela especificada na monografia correspondente. Preparar a amostra ou a diluição da mesma como determinado no *Ensaio de inibição ou potencialização*, que não exceda a MDV. O controle positivo da amostra é preparado mediante a adição de uma concentração de endotoxina igual a 2,0 λ . Como controle negativo, utilizar *Água para EEB*. Preparar a diluição de *Endotoxina de referência* a uma concentração de endotoxina igual a 2,0 λ . Cada solução deve ser testada em duplicata.

O ensaio somente é válido quando os controles negativos (-) e positivos (+) derem o resultado esperado. A amostra cumpre o teste se os resultados de ambas as duplicatas da amostra ou diluição desta forem negativos (-). Não cumpre o teste se as duplicatas forem positivas (+). Repetir o ensaio se as duplicatas não forem coincidentes. O ensaio pode ser repetido até a MDV.

Ensaio Semi-quantitativo

Caso deseje obter um resultado semi-quantitativo, realizar diluições seriadas com concentrações decrescentes com um fator de diluição constante. Preparar os controles positivos da amostra com uma diluição que não exceda a MDV e com adição de uma concentração de endotoxina igual a 2,0 λ . Cada diluição da amostra a ser testada deve ser feita pelo menos em duplicata, realizando em paralelo uma série duplicada de tubos de reação de diluições de *Endotoxina de referência* com concentrações de 2,0 λ ; 1,0 λ ; 0,5 λ ; 0 25 λ e os controles negativos de *Água para EEB*.

O ensaio somente é válido quando os controles negativos (-) e positivos (+) derem o resultado esperado e a média geométrica no limite da *Endotoxina de referência* for maior ou igual a 0,5 λ , e menor ou igual a 2,0 λ .

Para determinar a concentração de endotoxinas da *Solução Amostra*, calcular a concentração no limite para cada repetição multiplicando cada fator de diluição do limite por λ . A concentração de endotoxinas na *Solução Amostra* é a concentração do limite das réplicas. Se o ensaio for realizado com uma *Solução Amostra* diluída, calcular a concentração de endotoxinas na *Solução Amostra* original multiplicando pelo fator de diluição. Se nenhuma das diluições da *Solução Amostra* for positiva em um ensaio válido, expressar a concentração de endotoxina como menor que λ (se for analisada a amostra diluída, expressar como menor que λ multiplicado pelo menor fator de diluição da amostra).

Se todas as diluições forem positivas, a concentração de endotoxina é expressa como igual ou maior que o fator de diluição mais alto por λ .

A preparação cumpre os requisitos do teste se a concentração de endotoxinas em ambas as determinações repetidas for menor do que a especificada na monografia individual.

MÉTODOS FOTOMÉTRICOS QUANTITATIVOS

Método Turbidimétrico

Consiste em uma determinação fotométrica que mede os aumentos de turbidez do reagente. Dependendo do princípio empregado, este método pode ser classificado como determinação turbidimétrica limite ou determinação turbidimétrica cinética. A determinação turbidimétrica limite é baseada na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a turbidez (absorvância ou transmitância) da mistura de reação após um período de incubação. A determinação turbidimétrica cinética é um método para medir o tempo necessário para atingir uma absorvância ou transmitância pré-determinada da mistura de reação (tempo de iniciação) ou a velocidade de desenvolvimento de turbidez. O teste é realizado a uma temperatura de incubação recomendada pelo fabricante do lisado (geralmente 37 ± 1 °C).

Método Cromogênico

Consiste em medir o cromóforo liberado por um peptídeo cromogênico adequado pela reação da endotoxina com o lisado. Dependendo do princípio empregado, este método pode ser classificado como determinação cromogênica limite ou teste cinético cromogênico. A determinação cromogênica limite se baseia na relação entre a concentração de endotoxinas e a quantidade do cromóforo liberado no final de um período de incubação. A determinação cinética cromogênica é um método para medir o tempo (tempo de iniciação) necessário para atingir uma absorvância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento de cor. O ensaio é realizado a uma temperatura de incubação recomendada pelo fabricante do lisado (geralmente 37 ± 1 °C).

Ensaio Preparatórios

Para assegurar a precisão e validade dos testes turbidimétricos e cromogênicos, testes preparatórios são realizados para assegurar que os critérios para a curva padrão são válidos e a *Solução Amostra* não interfere no teste. Quando houver mudanças nas condições que possam interferir no resultado do ensaio, é necessária a validação do método.

Garantia dos Critérios para a Curva Padrão - O ensaio deve ser realizado para cada lote de lisado empregado como reagente. Utilizando uma *Solução Padrão de Endotoxina*, preparar pelo menos três concentrações de endotoxina em triplicata dentro do intervalo indicado pelo fabricante do lisado para gerar a curva padrão. Se o intervalo desejado nos métodos cinéticos for maior do que dois logaritmos, devem ser incluídas concentrações adicionais de padrão para que cada aumento logarítmico esteja compreendido no intervalo da curva padrão. O valor absoluto do coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,980 para a faixa estabelecida de concentrações de endotoxina.

Ensaio para Fatores de Interferência - Selecionar uma concentração de endotoxina próxima do centro da curva padrão de endotoxina. Preparar as seguintes soluções: Solução A, *Solução Amostra* sem endotoxina, que pode ser diluída sem que exceda a MDV; Solução B, *Solução Amostra* com uma concentração de

endotoxina correspondente ao ponto médio da curva; Solução C, pelo menos três concentrações de endotoxinas (diluídas em *Água para EEB*), sendo o ponto mais baixo da curva considerado λ ; Solução D, *Água para EEB* sem endotoxinas. Realizar os ensaios das *Soluções A, B, C y D* pelo menos em duplicada, de acordo com as instruções do lisado utilizado.

O ensaio somente é válido se cumprir os seguintes requisitos: o valor absoluto do coeficiente de correlação da curva padrão gerada pela *Solução C* for maior ou igual a 0,980 e o resultado da *Solução D* não exceder o limite do valor do branco requerido na descrição do lisado empregado como reagente ou for menor que o limite de detecção de endotoxina do lisado utilizado como reagente.

Calcular a média de recuperação da endotoxina adicionada à amostra subtraindo a média da concentração de endotoxina na solução, se for o caso (*Solução A*) da média da solução cuja endotoxina foi adicionada (solução B). Para considerar que não há fatores que interfiram com a avaliação das condições do ensaio, a concentração medida de endotoxina adicionada à *Solução Amostra* deve estar entre 50 e 200% da concentração conhecida de endotoxina adicionada depois de subtrair a endotoxina detectada na solução sem endotoxina adicionada.

Quando a recuperação de endotoxina estiver fora da faixa de especificação, se considera que a *Solução Amostra* em análise contém fatores de interferência. Então, repetir o ensaio utilizando uma diluição maior que não exceda a MDV. A interferência da *Solução Amostra* ou da *Solução Amostra* diluída que não exceda a MDV pode ser eliminada mediante um tratamento apropriado validado, como filtração, neutralização, diálise ou aquecimento. Para estabelecer que o tratamento usado foi eficaz na eliminação da interferência, sem perda de endotoxinas, realizar a determinação descrita anteriormente, utilizando a preparação a ser examinada, a qual foi adicionada padrão de endotoxina e que foi posteriormente submetida ao tratamento selecionado.

Seguir o procedimento descrito anteriormente para *Ensaio de Fatores de Interferência em Ensaio Preparatórios*.

Calcular a concentração de endotoxina para cada replicata da *Solução A*, usando a curva padrão gerada pela *Solução C* de controle positivo. O teste somente é válido quando cumpre com as seguintes condições: os resultados da *Solução C* de controle atendem aos requisitos de validação definidos em *Garantia de Critérios para a Curva Padrão*, em *Ensaio Preparatórios*; a recuperação de endotoxina, calculada a partir da concentração de endotoxina encontrada na *Solução B* após subtrair a concentração de endotoxina encontrada na *Solução A*, está dentro da faixa de 50- 200% e o resultado obtido da *Solução D* de controle negativo não excede o limite do valor do branco requerido na descrição do lisado empregado ou é menor que o limite de detecção de endotoxina do lisado utilizado como reagente.

Nas determinações fotométricas, a amostra cumpre com o ensaio se a média da concentração de endotoxina encontrada nas replicatas da *Solução A*, após correção para diluição e concentração, for menor que o limite de endotoxina especificado para o produto.