

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, a monografia “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...

XLIII SGT Nº 11 – Brasília, 10/IV/15.

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 peptídeo-cromógeno. Efetuar o ensaio com um dos três métodos. Em caso de dúvidas ou discrepâncias, a decisão final deve ser baseada 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

Todas as vidrarias e outros materiais termoestáveis devem ser despirogenizados em estufa usando um processo validado. No caso de utilização de materiais plásticos, como microplacas, ponteiras e pipetas, usar somente aqueles isentos de endotoxinas detectáveis e fatores que possam interferir no teste.

Reagentes e Soluções de ensaio

Lisado de Amebócitos—Um produto liofilizado obtido do lisado de amebócitos de crustáceo em forma de 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 endotoxinas. Existem preparados do lisado que não reagem com β -Glucanos, que são obtidos 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 o *Lisado de amebócitos* em água para EEB ou em uma solução tampão recomendada pelo fabricante do lisado. Armazenar o lisado reconstituído sob refrigeração 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 da Amostra — Preparar a *Solução da 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 da 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 recomendada pelo fabricante. 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:

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

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 limite humana de endotoxina por kg de peso corpóreo e M é igual à dose máxima recomendada do produto, em bolo, por kg de peso corpóreo. Quando o produto é administrado em intervalos frequentes ou por infusão contínua, M é a dose máxima total administrada durante um período de uma hora. O limite de endotoxina para os medicamentos é especificado nas monografias individuais das drogas parenterais em unidades, como UE/mL, UE/mg, UE/unidade de atividade biológica ou EU/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 da 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 *Cromogênico*.

MÉTODO DE COAGULAÇÃO

O método de coagulação é utilizado para detectar ou quantificar de endotoxinas baseado 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 a precisão e validade do ensaio, efetuar os ensaios para confirmar a sensibilidade declarada do lisado e determinar fatores de interferência segundo descrito em *Ensaio Preparatórios*.

Ensaio Preparatórios

Ensaio de Confirmação da Sensibilidade Declarada do Lisado — Confirmar em quadriplicata a sensibilidade declarada, λ , expressa em UE/mL, do lisado antes que seja utilizado no ensaio. O ensaio de confirmação da sensibilidade do lisado deve ser realizado quando for usado um novo lote de lisado ou em caso de 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 volumes iguais do reagente LAL e da *Solução Padrão de Endotoxina* (como por exemplo alíquotas de 0,1 mL) 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, invertendo a 180° e verificando a integridade do gel. Se o gel permanecer firme após a inversão dos tubos, considerar o resultado como positivo. Se não houver formação de gel ou o mesmo não se apresentar firme, o resultado é negativo. 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 posteriormente o antilogaritmo

da média, segundo a 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 (em UE/mL). Se o resultado estiver compreendido entre $0,5$ e 2λ se confirma a sensibilidade declarada.

Ensaio de Fatores de Interferência- O ensaio de inibição ou potencialização deve ser realizado a 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 na qual não há endotoxina detectável e em diluição que não exceda a máxima diluição válida (MDV). Executar o ensaio na amostra sem e com adição de endotoxina; neste caso, preparar as diluições da amostra de modo que se obtenha concentrações finais de endotoxina de $\frac{1}{4} \lambda$, $\frac{1}{2} \lambda$, 1λ e 2λ . Testar em paralelo as mesmas concentrações de endotoxina em *Água para EEB* e os controles negativos. Ensaia cada solução em quadruplicata e calcular a média geométrica da concentração do limite segundo o *Ensaio de confirmação da sensibilidade do lisado*.

O ensaio é válido se a sensibilidade do *Reagente LAL*, determinada na presença da preparação ensaiada, não difere em mais de um fator de 2 em relação àquela determinada em *Água EEB*, 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 2λ . Se a análise indicar inibição ou potencialização, repetir o ensaio empregando as amostras diluídas adequadamente por um fator que não exceda a MDV e seja suficiente para superar a inibição ou potencialização. Outras formas de eliminar interferências, além das diluições, podem ser filtração, neutralização, diálise 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 ensaiadas 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 pela separação da endotoxina presente por ultrafiltração, quando for possível a utilização desta metodologia.

Procedimiento - Transferir para tubos de ensaio de 10 mm × 75 mm, os volumes indicados (ex. 0,1 mL) de: controles negativos, as diluições selecionadas de *Endotoxina de referência*, a amostra sem diluir e/ou as diluições da amostra a ensaiar e os controles positivos desta/s (preparados pela adição de uma concentração de endotoxina igual a 2,0 λ), em duplicata. Adicionar em cada tubo volumes iguais de *Reagente LAL* reconstituído e agitar suavemente para misturar. Incubar a 37 ± 1 °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 após a inversão do tubo.

Ensaio limite

O ensaio é aplicado com o objetivo de se comprovar que o produto apresenta uma concentração de endotoxinas menor do que aquela especificada na monografia. 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 ensaiada em duplicata.

O ensaio somente é válido se os resultados dos controles negativos (-) e positivos (+) estiverem de acordo com o esperado. A amostra cumpre o teste se os resultados de ambas as réplicas forem negativos (-) e não cumpre o teste se as réplicas forem consideradas positivas (+). Repetir o ensaio se as duplicatas apresentarem discrepâncias de resultados.

Ensaio Semi-quantitativo

Para a obtenção de um resultado semi-quantitativo, realizar diluições seriadas 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 $2,0 \lambda$. Diluir a amostra em teste pelo menos em duplicata, realizando em paralelo uma série duplicada de tubos com diluições de *Endotoxina de referência* nas concentrações de $2,0 \lambda$; $1,0 \lambda$; $0,5 \lambda$; $0,25 \lambda$ e os controles negativos de *Água para EEB*.

O ensaio somente é válido se os resultados dos controles negativos (-) e positivos (+) estiverem de acordo com o esperado e a média geométrica no limite da *Endotoxina de referência* for maior ou igual a $0,5 \lambda$, e menor ou igual a $2,0 \lambda$.

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

Se todas as diluições da *Solução de Amostra* apresentarem reações positivas, a concentração de endotoxina é expressa como igual ou maior que λ multiplicado pelo mais alto fator de diluição da *Solução de Amostra*.

A amostra encontra os requerimentos do teste se a concentração de endotoxina for menor do que o limite individual especificado na monografia individual.

MÉTODOS FOTOMÉTRICOS QUANTITATIVOS

Método Turbidimétrico

Consiste em uma determinação fotométrica que mede o aumento de turbidez e, dependendo do princípio empregado, pode ser classificado como determinação do limite turbidimétrico ou determinação turbidimétrica cinética. O ensaio turbidimétrico limite é baseado na relação entre a concentração de endotoxina e a turbidez (absorvância ou transmissão) da reação após um período de incubação. A determinação turbidimétrica cinética é um método para medir o tempo de reação necessário para a mistura de reação atingir uma absorvância ou transmitância pré-

determinada 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 e, dependendo do princípio empregado, pode ser classificado como ensaio cromogênico limite e teste cinético cromogênico. A determinação cromogênica limite se baseia na relação entre a concentração de endotoxina e a quantidade do cromóforo liberado no final de um período de incubação. A determinação cinética cromogênica é baseada na medida do tempo de reação necessário para a mistura de reação atingir uma absorvância ou transmitância pré-determinada ou na 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 de Amostra* não interfere no teste. A validação do método é requerida quando houver qualquer mudança nas condições que possam interferir no resultado do ensaio.

Garantia dos Critérios para a Curva Padrão — O ensaio deve ser realizado para cada lote de lisado empregado como reagente. Preparar uma curva padrão com pelo menos três concentrações de endotoxina, usando uma *Solução Padrão de Endotoxina*, e realizar o ensaio em triplicata de cada concentração, como recomendado pelo fabricante do lisado. Se for desejada uma faixa maior do que dois logaritmos, devem ser incluídas concentrações adicionais de padrão. O valor absoluto de correlação linear (r) deve ser maior ou igual a 0,980 para a faixa estabelecida de concentrações de endotoxina.

Prepare soluções de amostra diluída sem exceder a MDV (máxima diluição válida) sem endotoxina (*Solução A*) e com endotoxina adicionada (*Solução B*) na concentração igual ou próxima do ponto médio da curva padrão. Prepare também

uma série de controle positivo com soluções de endotoxina (*Solução C*) com três concentrações diferentes, e também o controle negativo com água apirogênica (*Solução D*) e realizar os testes adicionando reagente LAL, no mínimo em duplicata (seguir as orientações do reagente utilizado com relação ao volume de amostra e do reagente, tempo de incubação), o ponto mais baixo da curva é considerado λ .

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 de Amostra* sem endotoxina, que pode ser diluída sem que exceda a MDV; *Solução B*, *Solução de Amostra* com uma concentração de endotoxina correspondente ao ponto médio da curva; *Solução C*, pelo menos três concentrações de endotoxinas (diluídas em água 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 menor que o limite de detecção de endotoxina do lisado.

Calcular a média de recuperação da endotoxina adicionada à amostra subtraindo-se a média da concentração de endotoxina na solução (*Solução A*) (se houver) da média da solução cuja endotoxina foi adicionada (solução B). A solução é considerada livre de interferentes se a medida da concentração de endotoxina adicionada à *Solução de Amostra* estiver na faixa entre 50 e 200% de recuperação, após subtração de qualquer endotoxina detectada na solução sem adição de endotoxina. Quando a recuperação de endotoxina estiver na faixa de especificação, fatores interferentes devem ser removidos conforme descritos na seção da técnica de coagulação em gel. Se a análise indicar inibição ou potencialização, repetir o ensaio empregando as amostras diluídas adequadamente por um fator que não exceda a MDV e seja suficiente para superar a inibição ou potencialização. Outras formas de eliminar interferências, além das diluições, podem ser 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 preparação na qual foi adicionado padrão de endotoxina e aquela preparação 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 endotoxina encontrada na *Solução B* após subtração da concentração de endotoxina encontrada na *Solução A* estiver dentro da faixa de 50 a 200% e o resultado obtido da *Solução D* (controle negativo) não exceda o limite do valor do branco requerido na descrição do lisado empregado 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.