

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fernando Faria Fingola

**PROPOSTA DE SUBSTITUIÇÃO DO ENSAIO DE PIROGÊNIO (*IN VIVO*) PELO
ENSAIO DO LAL (MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO - *IN VITRO*) NO
CONTROLE DE QUALIDADE DOS SOROS ANTICROTÁLICO,
ANTIESCORPIÔNICO, ANTIRRÁBICO E ANTITETÂNICO**

Rio de Janeiro

2018

Fernando Faria Fingola

**PROPOSTA DE SUBSTITUIÇÃO DO ENSAIO DE PIROGÊNIO (*IN VIVO*) PELO
ENSAIO DO LAL (MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO - *IN VITRO*) NO
CONTROLE DE QUALIDADE DOS SOROS ANTICROTÁLICO,
ANTIESCORPIÔNICO, ANTIRRÁBICO E ANTITETÂNICO**

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Saniária.
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Doutorado
em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Profa. Helena Pereira da Silva
Zamith.

Rio de Janeiro

2018

Fingola, Fernando Faria

Proposta de substituição do ensaio de pirogênio (*in vivo*) pelo ensaio do lal (método cromogênico cinético - *in vitro*) no controle de qualidade dos soros anticrotálico, antiescorpiônico, antirrábico e antitetânico. / Fernando Faria Fingola. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

117 f., il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Dra. Helena Pereira da Silva Zamith.

1. Endotoxinas. 2. LAL. 3. Endotoxinas. 4. Estudos de Validação. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Proposed replacement of the pyrogen (*in vivo*) test by lal test (kinetic chromogenic method - *in vitro*) in the quality control of anti-crotalic, anti-rabies , anti-tetanus and anti-scorpion serums.

Fernando Faria Fingola

Proposta de substituição do ensaio de pirogênio (*in vivo*) pelo ensaio do LAL
(método cromogênico cinético - *in vitro*) no controle de qualidade dos soros
anticrotálico, antiescorpiônico, antirrábico e antitetânico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde da Fundação
Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do grau
de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: / / .

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes (FIOCRUZ)

Dr. Marco Antônio Mota da Silva (UEZO)

Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida (FIOCRUZ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Deus.

Aos meus pais, Florival e Isaura (*in memoriam*).

Aos meus filhos Caio e Yasmin.

À minha esposa Sheila.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Deus!

Agradeço por me mostrar que sou protegido, guiado e iluminado pela sua presença divina no mais íntimo do meu ser.

Agradeço pelos tropeços, quedas, mas principalmente pela Sua força que sempre me fez levantar e seguir.

Agradeço por ter me dado pais, filhos, esposa e uma família divina em minha vida.

Agradeço por todas as pessoas maravilhosas que o Senhor colocou em meu caminho.

Agradeço, Senhor, por não me deixar esquecer que Você me habita e é a força que dá vida à minha alma.

Agradeço por permitir mais uma vitória em minha vida

Agradeço, Senhor, pelo ser humano que sou.

AGRADECIMENTOS

- Ao INCQS pela realização deste estudo.
- Aos meus pais Florival Fingola (*in memoriam*) e Isaura Faria Fingola (*in memoriam*), por fazerem de mim um ser “humano” do bem.
- Aos meus filhos Caio Paiva Faria Fingola e Yasmin Paiva Faria Fingola, presentes de Deus em minha vida.
- À minha esposa Sheila Regina Gomes Albertino, pela cumplicidade, ajuda e incentivo em todos os momentos deste trabalho e da minha vida.
- Aos meus irmãos Paulo Antônio da Silva Valle e Flávia Fingola da Silva Valle, por preciosos incentivos em minha vida pessoal e profissional.
- À minha querida tia Yolanda Faria Brum e meu tio Ari Andrade Brum (*in memoriam*), pelo incansável apoio em todos os momentos da minha vida.
- À minha querida sobrinha Marina Fingola Valle Brevilato Novaes por sua colaboração neste trabalho.
- Aos meus inesquecíveis amigos Dirceu Valiengo Filho (*in memoriam*) e Mário Antônio da Silva Valle (*in memoriam*), pelo grande incentivo em minha profissão.
- À Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, pela sua amizade, paciência, dedicação ao trabalho e pelo seu grande profissionalismo na orientação deste trabalho.
- À Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, pela amizade e por ter me dado orientações preciosas na realização deste trabalho.
- Ao Prof.Dr. Alexandre Pinto Corrado, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), um grande Mestre, incentivador e amigo.
- Aos amigos Nelson Luiz da Silva Pedreira e Alberto Rafael Rego por inúmeras contribuições neste trabalho.
- À DEUS, pela realização deste sonho.

RESUMO

A validação do ensaio do LAL (método cromogênico cinético) para os soros anticrotálico (SAC), antirrábico (SAR), antitetânico (SAT) e antiescorpiônico (SAE) envolveu a determinação de parâmetros requeridos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA), o FDA (Food and Drug Administration), USP (*United States Pharmacopeia*, 39) e o ICH (*International Conference on Harmonization*). Em todos os experimentos, o coeficiente de correlação da curva obtida com o controle padrão de endotoxina (CSE; *Escherichia coli* 055:B5) ficou entre -0,980 a -1,000. No teste de Inibição/Potencialização, a recuperação da endotoxina adicionada às amostras de SAC, SAR, SAT e SAE, nas diluições de trabalho (1:10; 1:10; 1:10 e 1:100 respectivamente) cumpriram com o critério de recuperação exigidos pelo FDA, USP e ANVISA. O método demonstrou ser seletivo para detecção de endotoxina. A repetibilidade apresentou um baixo coeficiente de variação (CV %). SAC (0,25; 1,22 e 0,29 %), SAR (0,38; 0,64 e 0,33 %), SAT (1,22; 1,15 e 0,56 %) e SAE (0,91; 0,30 e 0,93 %). Na avaliação da precisão intermediária foram realizadas, para o cálculo do CV%, 12 determinações para cada analista (1 e 2). Para a exatidão foram realizadas 9 determinações em 3 concentrações de endotoxina (0,05; 0,5 e 5 EU/mL) para avaliarmos a recuperação do analito nas amostras de soros. Para o SAC o CV% foi de 2,0% e 1,20% (analistas 1 e 2 respectivamente). A recuperação foi de 75,4%, 95% e 92% respectivamente para as concentrações de (0,05; 0,5 e 5 EU/mL). Para o SAR o CV% foi de 0,96% e 0,78% (analistas 1 e 2 respectivamente). A recuperação foi de 78%, 100,4% e 94% respectivamente para as concentrações de (0,05; 0,5 e 5 EU/mL). Para o SAT o CV% foi de 1,73% e 1,80% (analistas 1 e 2 respectivamente). A recuperação foi de 76%, 96,4% e 122,2% respectivamente para as concentrações de (0,05; 0,5 e 5 EU/mL). Para o SAE o CV% foi de 1,47% e 3,6% (analistas 1 e 2 respectivamente). A recuperação foi de 85,4%, 93,8% e 106,6% respectivamente para as concentrações (0,05; 0,5 e 5 EU/mL). A validação da metodologia, para os quatro soros analisados, cumpriu os critérios para todos os parâmetros de desempenho requeridos.

Palavras-chave: Endotoxina, LAL Cromogênico cinético, Concentração limite de endotoxina, Validação de métodos, CV%, Recuperação.

ABSTRACT

The validation of the LAL test (chromogenic kinetic method) for the anti-crotalic(SAC), anti-rabies (SAR), anti-tetanus (SAT) and anti-scorpion (SAE) serums met every criteria required by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), the FDA (Food and Drug Administration), USP (*United States Pharmacopeia*, 39) and the ICH (*International Conference on Harmonization*). In every experiment, the correlation between the obtained curve with the standard endotoxin control (CSE; *Escherichia coli* 055:B5, ranging of 0,0005-50EU/mL) goes from -0,980 to -1,0000. On the Inhibition/Potentialization test, the endotoxin recovery added to the SAC, SAR, SAT and SAE samples, midpoint of the curve (0,5 EU/mL), in the working dilutions (1:10; 1:10; 1:10 and 1:100 respectively) fulfilled its criteria (i.e., 50-200% demanded by the FDA and USP, and 100% +- 30% by ANVISA). The method proved to be selective for the endotoxin detection. The repeatability showed low coefficient of variation (CV%). SAC (0,25; 1,22 and 0,29%), SAR (0,38; 0,64 and 0,33%), SAT (1,22; 1,15 and 0,56%) e SAE (0,91; 0,30 and 0,93%). In the intermediate precision evaluation, for the CV% calculus, 12 determinations for each analyst (1 and 2) were performed. In order to obtain accuracy, 9 determinations in 3 endotoxin concentrations (0,05; 0,5; and 5EU/mL) were executed so as to evaluate the analyte recuperation in the serum samples. For SAC, the CV% was 2,0% and 1,20% (analysts 1 and 1, respectively). The recovery was 75,4%, 95% and 92% also respectively for the concentrations 0,05; 0,5 and 5 EU/mL. To SAR, the CV% was 0,96% and 0,78% (analysts 1 and 2, respectively). The recovery was 78%, 100,4% and 94% respectively for the concentrations 0,05; 0,5 and 5 EU/mL. To SAT, the CV% was 1,73% and 1,80% (analysts 1 and 2, respectively). The recovery was 76%, 96,4% and 122,2% respectively for the concentrations 0,05; 0,5 and 5 EU/mL. To SAE, the CV% was 1,47% and 3,6% (analysts 1 and 2, respectively). The recovery was 85,4%, 93,8% and 106,6% respectively for the concentrations 0,05; 0,5 and 5 EU/mL. The validation of this methodology, for all the four serums analyzed, fulfilled the criteria for every performance parameter required.

Key-words: endotoxin, LAL Chromogenic Kinetic, endotoxin limit Concentration, method validation, CV%, recovery.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira
CLE	Concentração Limite de Endotoxina
CSE	Controle Padrão de Endotoxina
CV%	Coefficiente de Variação
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ET	Endotoxinas
EU/mL	Endotoxina por mililitro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HARPYA	Sistema de Gerenciamento de Amostras Laboratoriais
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVB	Instituto Vital Brazil
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lisate</i>
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolissacarídeo
MDV	Máxima Diluição Válida
POP	Procedimento Operacional Padronizado
QCL	Quantitativo Cinético em <i>Limulus</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RSE	Padrão de Referência de Endotoxina

SAC	Soro Anticrotálico
SAE	Soro Antiescorpiônico
SAR	Soro Antirrábico
SAT	Soro Antitetânico
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Pirogênios endógenos e exógenos de origem microbiana e não microbiana	25
Figura 1 - Parede celular de bactéria Gram negativa	28
Figura 2 - Princípio do teste LAL cromogênico	30
Quadro 2 - Vantagens e Desvantagens do Ensaio do LAL X Ensaio de Pirogênio	32
Figura 3 - Etapas da produção de soro contra o veneno de animais peçonhentos, tétano e raiva, realizadas pelo Instituto Vital Brazil	38
Figura 4 – Cascavel (<i>Crotalus durissus</i>)	40
Figura 5 – Alterações clínicas por acidente crotálico	41
Figura 6– Escorpião-amarelo (<i>Tityus serrulatus</i>)	42
Figura 7 – Escorpião-marrom (<i>Tityus bahiensis</i>)	43
Figura 8 – Escorpião-amarelo do Nordeste (<i>Tityus stigmurus</i>)	43
Figura 9 - Ciclo Epidemiológico da Raiva	46
Figura 10 – Quadro clínico de uma pessoa acometida com vírus da raiva	48
Figura 11 – Sintomas de Tétano	49
Figura 12 – Opistótono (Contratura muscular generalizada causada pela toxina tetânica)	50
Quadro 3 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003)	53
Quadro 4 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. Adaptado do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003)	53
Quadro 5 - Parâmetros e Especificações da Curva Padrão (LONZA, 2016)	57
Quadro 6 – Resultados e declaração de incertezas da calibração de pipetas	61
Quadro 7– Qualificação inicial: parâmetros exigidos para validação da curva-padrão de endotoxina	66

Figura 13 – Curva padrão de endotoxina - Qualificação inicial	66
Quadro 8 – Parâmetros da curva padrão de endotoxina - Linearidade	67
Figura 14– Curva padrão de endotoxina - Linearidade	68
Quadro 9 - Ensaio de Inibição/Potencialização Soro Anticrotálico. Lote nº C 02	69
Quadro 10 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº C 02	69
Figura15- Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2	73
Figura 16 – Curva padrão de endotoxina - Exatidão	75
Quadro 11 – Parâmetro da curva padrão de endotoxina - Exatidão	76
Quadro 12 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro anticrotálico	78
Quadro 13 - Ensaio de Inibição/Potencialização Soro Antirrábico. Lote nº R 06	79
Quadro 14 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização Lote nº R 06	79
Figura 17 - Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2	83
Figura 18 – Curva padrão de endotoxina – Exatidão	85
Quadro 15 - Parâmetros da curva padrão de endotoxina - Exatidão	85
Quadro 16 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antirrábico	87
Quadro 17 - Ensaio de Inibição/Potencialização Soro Antitetânico. Lote nº T 01	88
Quadro 18 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº T 01	88
Figura 19- Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2	92

Figura 20 – Curva padrão de endotoxina – Exatidão	94
Quadro 19- Parâmetros da curva padrão de endotoxina – Exatidão	94
Quadro 20 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antitetânico	96
Quadro 21 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico	97
Quadro 22- Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização Lote nº E 03	98
Figura 21 - Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2	101
Figura 22– Curva padrão de endotoxina – Exatidão	103
Quadro 23- Parâmetros da curva padrão de endotoxina – Exatidão	104
Quadro 24 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antiescorpiônico	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Qualificação inicial: concentrações de endotoxina (EU/mL) utilizadas na curva padrão	65
Tabela 2 - Tempo de reação (s) de cada concentração em triplicata – Linearidade	67
Tabela 3 - - Ensaio de Inibição/Potencialização -.Soro Anticrotálico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40) Lote nº C 02	69
Tabela 4 - Ensaio de Inibição/Potencialização – Diluições 1:10; 1:20 e 1:40. Lote nº C 02	69
Tabela 5 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.	70
Tabela 6 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - - Soro Anticrotálico (lotes nº C 02, C 04 e C 06)	71
Tabela 7 – Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)	72
Tabela 8 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2.	73
Tabela 9 – Tempo de reação em amostra de soro anticrotálico (lote nº C 02) Analista 1 X Analista 2	74
Tabela 10 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro anticrotálico (lote nº C 02) pelos analistas 1 e 2	74

Tabela 11 - Recuperação das três concentrações de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro anticrotálico (lote nº C 02) utilizadas no ensaio de Exatidão	76
Tabela 12 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro anticrotálico (lote nº C 02)	77
Tabela 13 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antirrábico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40) Lote R 03	79
Tabela 14 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antirrábico (Diluições 1:10; 1:20 e 1:40) Lote R 03	80
Tabela 15 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.	80
Tabela 16 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antirrábico (lotes nº R 06, R 01 e R 10.)	81
Tabela 17 – Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)	82
Tabela 18 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2	82
Tabela 19 – Tempo de reação em amostras de soro antirrábico (.lote nº R 06) - Analistas 1 X Analista 2	83
Tabela 20- Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro antirrábico (lote nº 06) pelos analistas 1 e 2	84

Tabela 21- Recuperação das três concentrações de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antirrábico (lote nº R 06) utilizadas no ensaio de Exatidão.	85
Tabela 22 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antirrábico (lote nº R 06))	86
Tabela 23 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antitetânico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:25 e 1:50) Lote T 01	88
Tabela 24 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antitetânico (Diluições 1:10; 1:25 e 1:50) Lote T 01	88
Tabela 25 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade	89
Tabela 26 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antitetânico (lotes nº T 01, T 02 e T 03,.)	90
Tabela 27– Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)	91
Tabela 28 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2	91
Tabela 29– Tempo de reação em amostras de soro antitetânico (lote nº T 01). Analistas 1 X Analista 2.	92
Tabela 30- Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra soro antitetânico (lote nº T 01). pelos analistas 1 e 2	93

Tabela 31 - Recuperação das três concentrações de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antitetânico (lote nº T 01). utilizadas no ensaio de Exatidão	95
Tabela 32 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antitetânico (lote nº T 01)	96
Tabela 33 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico (Diluições 1:5; 1:10; 1:25, 1:50 e 1:100) Lote E 03	97
Tabela 34 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico (Diluições 1:25; 1:50 e 1:100) Lote E 03	98
Tabela 35 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade	98
Tabela 36 - Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antiescorpiônico (lotes nº E 01, E 0 2 e E 03,.)	99
Tabela 37 – Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)	100
Tabela 38- Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2	101
Tabela 39 – Tempo de reação em amostras de soro antiescorpiônico (lote nº E 03). Analistas 1 X Analista 2.	102
Tabela 40 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro antiescorpiônico (lote nº E 03) pelos analistas 1 e 2	102
Tabela 41 - Recuperação das três concentrações de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antiescorpiônico (lote nº E 03) utilizadas no ensaio de Exatidão.	104

Tabela 42 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antiescorpiônico (lote nº E 03)

105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Métodos Alternativos	22
1.2 Pirogênio (Histórico)	23
1.2.1 Classificação dos pirogênios	24
1.3 LAL (Histórico)	26
1.4 Endotoxinas	26
1.4.1 Natureza química da endotoxina	27
1.4.2 Composição química das regiões do LPS	27
1.4.3 Lipídeo A e virulência	28
1.5 Ensaio de Pirogênio	28
1.6 Ensaio de LAL- QCL Cinético	29
1.7 Argumentos para A Substituição do Ensaio de Pirogênio pelo Ensaio de LAL	30
1.8 Controle da Qualidade de Soros Hiperimunes	33
1.9 Histórico do Uso de Soros e o Processo de Produção	33
1.9.1 Desenvolvimento do uso de soros	33
1.9.2 Produção de soro	38
1.10 Acidentes Crotálico e Escorpiônico e Exposição ao Vírus Rábico e a Toxina Tetânica	40
1.10.1 Acidente Crotálico	40
1.10.2 Acidente Escorpiônico	42
1.10.3 Exposição ao vírus rábico	45
1.10.4 Exposição à toxina tetânica	49
1.11 Validação de Métodos	52
2 JUSTIFICATIVA	54

3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4 METODOLOGIA	56
4.1 Protocolo de Validação	56
4.2 Qualificação Inicial	56
4.3 Linearidade/Curva Padrão	57
4.3.1 Homocedasticidade das variâncias das respostas	57
4.4 Ensaio de Inibição/Potencialização	58
4.5 Seletividade	58
4.6 Precisão	59
4.6.1 Repetitividade (precisão intra-corridas)	59
4.6.2 Precisão Intermediária (precisão inter-corridas)	59
4.7 Exatidão	60
4.8 Procedimento Experimental Do Ensaio Lal (Método Cromogênico Cinético)	60
4.8.1 Materiais/Equipamentos	60
4.8.2 Preparo do material	60
4.8.3 Preparo da amostra	62
4.9 Cálculo da Concentração Limite de Endotoxina (CLE) e Máxima Diluição Válida (MDV)	63
4.10 Ensaio de Pirogênio.	63
4.10.1 Animais/Materiais/Equipamentos	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Concentração Limite de Endotoxina (Cle) e Máxima Diluição Válida (MDV)	64
5.1.1 Soro Anticrotálico	64

5.1.2 Soro Antirrábico	64
5.1.3 Soro Antitetânico	64
5.1.4 Soro Antiescorpiônico	64
5.2 Qualificação Inicial	65
5.3 Linearidade do Método	66
5.4 Inibição-Potencialização – Soro Anticrotálico (Lote Nº C 02)	68
5.5 Seletividade – Soro Anticrotálico (Lotes Nº C 02, C 04 E C 06)	70
5.6 Precisão - Soro Anticrotálico	70
5.6.1 Repetitividade (Repetibilidade)	71
5.6.2 Precisão intermediária (lote nº C 02)	71
5.7 Exatidão - Soro Anticrotálico (Lote Nº C 02)	75
5.8 Inibição-Potencialização - Soro Antirrábico (Lote Nº R 06)	78
5.9 Seletividade - Soro Antirrábico (Lote Nº R 06, R 01 E R 10)	80
5.10 Precisão - Soro Antirrábico	80
5.10.1 Repetitividade (Repetibilidade)	80
5.10.2 Precisão intermediária (lote nº R 06)	81
5.11 Exatidão - Soro Antirrábico (Lote Nº R 06)	84
5.12 Inibição-Potencialização - Soro Antitetânico (Lote Nº T 01)	87
5.13 Seletividade – Soro Antitetânico (Lote Nº T 01, T 02 E T 03)	89
5.14 Precisão - Soro Antitetânico	89
5.14.1 Repetitividade (Repetibilidade)	89
5.14.2 Precisão Intermediária (lote nº T 01)	90
5.15 Exatidão - Soro Antitetânico (Lote Nº T 01)	93
5.16 Inibição-Potencialização -Soro Antiescorpiônico (Lote Nº E 03)	97

5.17 Seletividade – Soro Antiescorpiônico (Lote N° E 01, E 02 E E 03)	98
5.18 Precisão – Soro Antiescorpiônico	99
5.18.1 Repetitividade (Repetibilidade)	99
5.18.2 Precisão intermediária (lote nº E 03)	99
5.19 Exatidão – Soro Antiescorpiônico (Lote N° E 03)	103
6 DISCUSSÃO	107
7 CONCLUSÃO	112
8 PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS

O desenvolvimento e a utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório é meta de longa data a ser alcançada pela comunidade científica (STEPHENS; GOLDBERG; ROWAN, 2001). Nesse sentido, pesquisadores têm procurado desenvolver métodos que reduzam a variabilidade biológica, aumentem a sensibilidade e que mantenham uma correlação de respostas com os ensaios à que se destinam substituir. Outra vantagem na busca de métodos alternativos ao uso de animais reside na possibilidade de que laboratórios, que não possuam infraestrutura para a criação/manutenção de animais de laboratório, possam ter em suas atividades analíticas métodos *in vitro* eficazes que permitam avaliar o potencial toxicológico de produtos (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Russel e Burch (1959) estabeleceram o princípio dos 3R's para o uso experimental de animais. O princípio dos 3 Rs: 1) *Reduction* (redução), 2) *Refinement* (refinamento) e 3) *Replacement* (substituição), preconiza a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhoria na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que por fim, substituam os testes *in vivo* (CAZARIN et al., 2004). Dessa forma, o propósito principal do princípio dos 3Rs é servir como um conceito unificador, um desafio e uma oportunidade para a obtenção de benefícios científicos, econômicos e humanitários (BALLS; VAN ZELLER; HALDER, 2000).

Com o avanço do conhecimento científico tornaram-se mais evidentes as diferenças metabólicas e de respostas que controlam a homeostasia tecidual em animais e humanos, sendo necessários modelos *in vitro* mais apropriados. Torna-se evidente, então, que temos, ao menos, dois grandes desafios. Primeiro, o de desenvolver métodos alternativos que atendam ao princípio dos 3R's. Uma vez desenvolvido e cientificamente comprovada a capacidade do método contribuir com os 3Rs, inicia-se o segundo estágio, ou seja, validar o método (GRANJEIRO, 2012)

Em nosso projeto, estamos propondo a substituição do ensaio de Pirogênio (método *in vivo*) pelo método cromogênico cinético *in vitro* empregando o Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL) para os soros anticrotálico, antiescorpiônico, antirrábico

e antitetânico. Estes soros antipeçonhentos são empregados no tratamento de acidentes crotálico e escorpiónico e na exposição ao vírus rábico e à toxina tetânica.

1.2 Pirogênio (histórico)

Muitos médicos na antiguidade, começando com os gregos, acreditavam que a febre devia ser estimulada como um meio de combate à doença. Hipócrates acreditava que a febre servia para cozinhar “humores” em excesso (a causa pretendida de doença naquele dia) e portanto removê-los do corpo. Somente após o início do século XVIII que sérias incursões foram feitas no estudo das causalidades da febre. Os primeiros estudos surgiram a partir de observações associando o início da febre em homens e animais quando em contato com materiais orgânicos em putrefação. Entre 1809 e 1822, Gaspard injetou extrato fluido pútrido em cachorros e assim demonstrando ser uma das causas de febre e doença. Em 1823, François Magendie observou condições pútridas no interior e ao redor de muitos portos e concluiu que as águas poluídas eram habituais na ocorrência de muitas doenças graves, incluindo febre tifóide, peste, febre intermitente, disenteria, febre amarela, cólera, entre outras. Ele seguiu os passos experimentais de Gaspard e descobriu que os peixes de águas pútridas eram particularmente um potente indutor de febre. Ele demonstrou que, sem a decomposição da matéria orgânica putrefata, nenhuma febre poderia ser induzida e que, para ser eficaz, deveria ser absorvida através das veias. Em meados do século XIX, o estudo de ferimentos ou infecções sépticas foi elucidado através de várias publicações incluindo a de Theodor Billroth “*Observations on Fever Caused by Wounds and Accidental Wound Diseases*” na qual ele utilizou os termos “pirogênio” e “pirogênico” pela primeira vez. Ele isolou uma bactéria que chamou de *Coccobacteria septica* e afirmou ser o agente causador da infecção no ferimento. Em 1868, Ernst Von Bergmann, publicou “*The Putrid Poison and the Putrid Intoxication*” seguido por “*On Sepsin, the Poison of Putrid Substances*” e “*On Fever Caused by Products of Putrefaction and Inflammation*”. Bergmann acreditava que pirogênio, ou “sepsin” como ele denominou, era uma substância quimicamente definida que ele produziu de forma semi-purificada a partir de putrefação de levedura. Em 1880, Koch contribuiu para o entendimento da infecção em feridas, escrevendo “*Investigations on the Aetiology of Infectious Wound Diseases*”, tendo como base suas próprias experiências de guerra, com milhares de soldados, bem como, com suas experiências em animais, utilizando

injeções de culturas puras de bactérias. A partir deste período, o estudo das causas da febre teve seu foco voltado para sua origem bacteriana. Em 1892, Richard Pfeiffer, um dos estudantes de Koch em Berlim, descobriu que a bactéria *Vibrio cholerae* produzia dois tipos distintos de toxinas: uma exotoxina termolábil e uma substância termorresistente que não era secretada pela célula, mas liberada mediante a desintegração celular. Pfeiffer primeiro usou a palavra “endotoxina” (ET) para descrever essa “toxina interna”, que na verdade acabou por ser uma espécie de equívoco, uma vez que ela se encontra na superfície das células, contudo, estava correto em afirmar que ela é parte do organismo e não uma secreção como as exotoxinas. Paralelamente, em 1892, Eugenio Centanni na Universidade de Bolonha extraiu uma toxina termoestável de *Salmonella typhi*, o agente causador da febre tifóide, chamando-a de “pirotoxina”. Hoje sabe-se que as toxinas termoestáveis de Pfeiffer e Centanni são a mesma endotoxina comum às bactérias Gram negativas (WILLIAMS, 2007).

1.2.1 Classificação dos pirogênicos

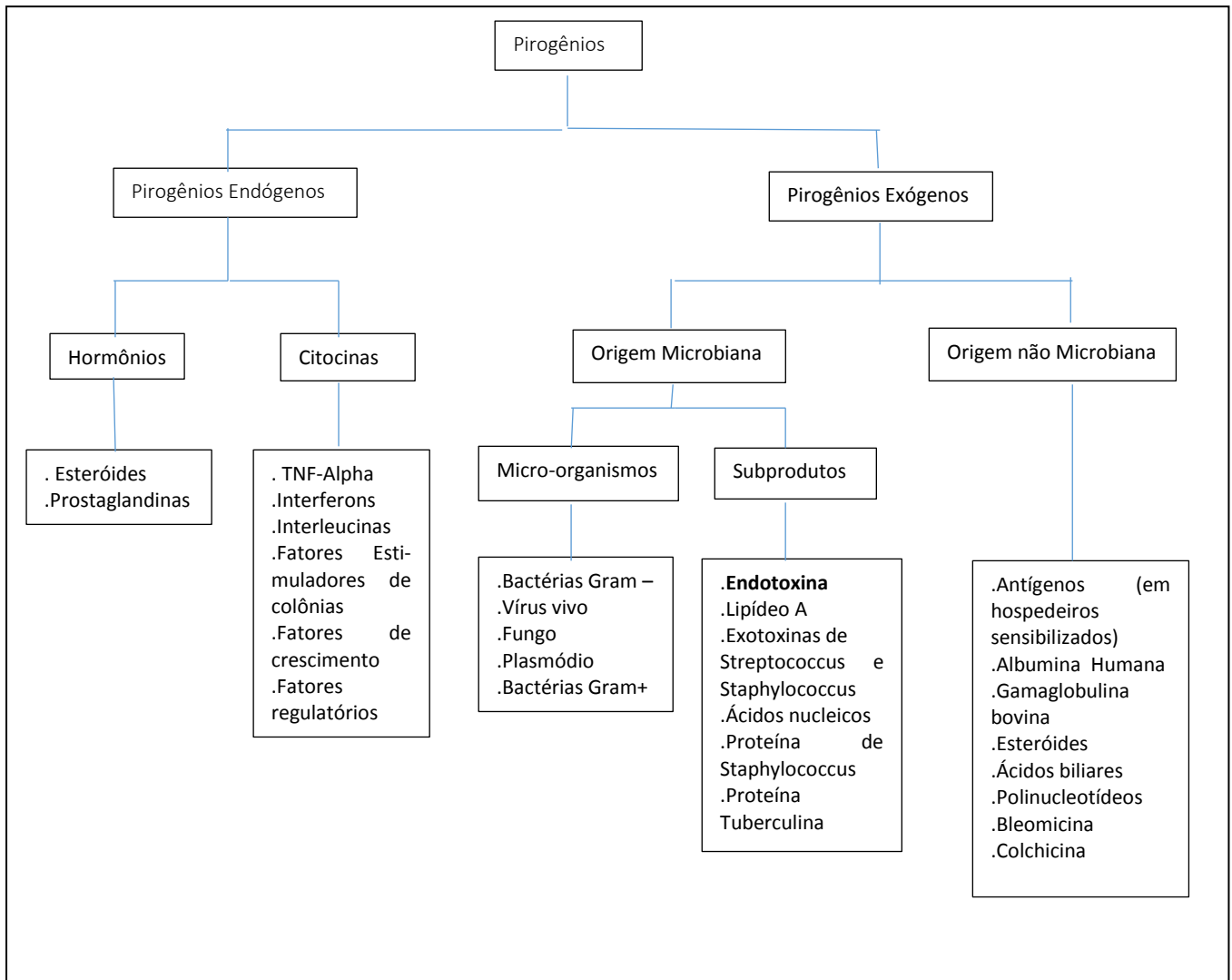
Os pirogênicos são divididos em exógenos ou endógenos, tendo como base sua origem externa ou interna ao corpo, respectivamente. Os termos “pirogênio endógeno” e “mediadores endógenos” referem-se às substâncias produzidas pelo organismo e que são responsáveis pela mediação de respostas inflamatórias, na coagulação e nos mecanismos de produção de febre (Quadro 1). O “pirogênio exógeno” é qualquer substância estranha ao organismo capaz de induzir uma resposta febril em consequência de sua injeção ou infecção, incluindo o “pirogênio” microbiano, sendo a ET o mais potente de todos (Quadro 1). “Pirogênio exógeno”, não microbiano, inclui certos agentes farmacológicos ou, por sensibilização do hospedeiro, antígenos, tais como albumina humana (WILLIAMS, 2007).

O termo “pirogênio” vem ao longo do tempo sendo menos utilizado, tanto em termos gerais, quanto específicos. O termo tem entrado em desuso: 1) pelo conceito equivocado do ensaio do LAL, como ensaio de pirogênio *in vitro*, 2) pela caracterização de vários subprodutos microbianos análogos ao do hospedeiro ativo, 3) pela identificação de respostas nocivas, que não incluem febre e 4) talvez o mais importante, pelo recente enfoque nos mecanismos celulares e moleculares que não

estão particularmente relacionados à febre como uma medida da resposta biológica (WILLIAMS, 2007).

Quanto a perda de precisão relacionada ao termo “pirogênio”, existe atualmente muitas substâncias identificadas e ativas no hospedeiro, com potências biológicas variáveis e, às vezes atuando em conjunto. Desta forma, o termo “pirogênio” requer uma melhor qualificação e descrição. Dezenas de substâncias microbianas têm sido identificadas, seja para induzir febre, seja para ativar hospedeiros que possam levar à febre, especialmente em combinação com a endotoxina (WILLIAMS, 2007).

Quadro 1- Pirogênios endógenos e exógenos de origem microbiana e não microbiana.



Fonte: Adaptado de Williams, 2007.

1.3 LAL (Histórico)

Bang, nos anos de 1950, observou que a infecção do *Limulus polyphemus* (caranguejo ferradura) era induzida por bactérias Gram negativas, resultando na coagulação intravascular e morte do caranguejo. Nos anos de 1960, Levin e Bang, demonstraram que esta coagulação era um resultado da reação entre endotoxina e uma proteína coagulável nos amebócitos circulantes do sangue de *Limulus*. Na década seguinte, estes mesmos pesquisadores, prepararam um lisado do lavado de amebócitos, demonstrando ser um indicador extremamente sensível da presença de endotoxina. Posteriormente, Solum, Young, Levin e Prendergast, isolaram, purificaram e caracterizaram uma proteína coagulável do LAL, concluindo que a reação entre o lisado e a endotoxina era de natureza enzimática. (LONZA, 2016)

O ensaio de LAL foi introduzido na USP XX em 1980. No Brasil, só foi incluído na Farmacopeia em 1996, em sua 4ª edição.

1.4 Endotoxinas

Endotoxinas são macromoléculas carregadas negativamente, variando de tamanho entre 20.000 a 30.000 x 10⁶ daltons. São parte da membrana externa da parede celular de bactérias Gram negativas. Embora o termo endotoxina seja por vezes usado para se referir a qualquer célula associada à toxina bacteriana, o termo deve ser empregado para fazer referência ao complexo lipopolissacarídeo (LPS), que está associado à membrana externa de patógenos Gram negativos, tais como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* e *Bordetella pertussis* e de bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e *Neisseria* (TODAR, 2008).

A atividade biológica da ET está associada ao LPS. A toxicidade está relacionada com o componente lipídico (**lipídeo A**) e a imunogenicidade está associada com o componente polissacarídico. Os antígenos da parede celular (**antígenos O**) são também componentes do LPS.

O LPS produz uma variedade de respostas inflamatórias em animais, ativando complementos por vias alternativas (properdina), importantes na fisiopatologia de infecções por bactérias Gram negativas. As bactérias Gram negativas provavelmente liberam *in vivo* quantidades mínimas de LPS enquanto se multiplicam o que pode ser

importante na estimulação da imunidade natural. Pequenas quantidades de LPS podem ser liberadas na forma solúvel em culturas recentes cultivadas em laboratório. Para maioria dos pesquisadores, o LPS permanece associado com a parede celular até a desintegração da célula *in vivo* resultante de autólise, lise externa mediada pelo complemento e lisozima, e digestão fagocítica de células bacterianas (TODAR, 2008).

1.4.1 Natureza química da endotoxina

O LPS é composto por 3 regiões distintas: lipídeo A antígeno central ou polissacarídeo R e antígeno somático O ou polissacarídeo O (Figura 1).

A maioria dos trabalhos sobre a estrutura química de ET tem sido feita com *Escherichia coli* e espécies de *Salmonella*. O LPS pode ser extraído a partir de células inteiras pelo tratamento com solução aquosa de fenol entre 45% e 90%. A hidrólise moderada de LPS produz lipídeo A e polissacarídeos (TODAR, 2008).

1.4.2 Composição química das regiões do LPS

Região I. Lipídeo A – Corresponde à região hidrofóbica do LPS, com a função de proteger a membrana. O lipídeo A consiste de um dímero fosforilado N-acetilglicosamina (NAG) com 6 ou 7 ácidos graxos (AG) ligados. Todos os AG no lipídeo A são saturados e alguns estão ligados diretamente ao dímero NAG. Sua atividade biológica parece depender de uma conformação peculiar que é determinada pelo dissacarídeo glicosamina, pelos grupos fosfatos (PO_4), pelas cadeias acila e do ácido 2-ceto-3-desoxioctanóico (KDO). O KDO é o único e invariavelmente presente açúcar no LPS e por isso tem sido utilizado como um indicador em ensaios de LPS. O lipídeo A é o responsável pela ativação do LAL.

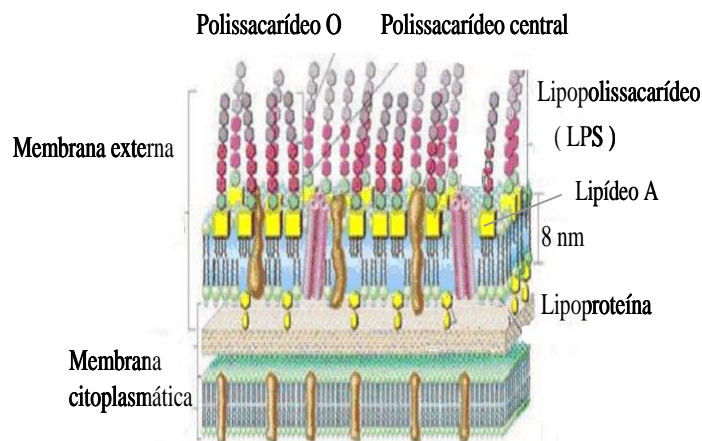
Região II. Antígeno central R ou polissacarídeo R – Está ligado à posição 6 de uma NAG e constituído por uma pequena cadeia de açúcares.

Região III. Antígeno somático O ou polissacarídeo O – Está ligado ao núcleo polissacarídico. Consiste de subunidades de oligossacarídeos compostos de 3 a 5 açúcares. O polissacarídeo O é muito maior do que o núcleo polissacarídico, e mantém a propriedade hidrofílica da molécula do LPS. O maior determinante antigênico da parede celular de bactérias Gram negativas reside no polissacarídeo O (TODAR, 2008).

1.4.3 Lipídeo A e virulência

As atividades fisiológicas do LPS são mediadas principalmente pelo lipídeo A. O lipídeo A tem uma potente resposta biológica modificadora que pode estimular o sistema imune de mamíferos. Durante doenças infecciosas causadas por bactérias Gram negativas, ETs ou fragmentos da membrana externa liberados a partir da multiplicação celular têm efeitos similares em animais e contribuem significativamente para os sintomas e patologias das doenças encontradas. Provavelmente o lipídeo A só exerce seus efeitos tóxicos quando liberado a partir da multiplicação celular em forma solúvel, ou quando a bactéria é lisada como um resultado de autólise através de um complexo ataque à membrana (MAC), ingestão e morte por fagócitos, ou pela morte causada por certos tipos de antibióticos. Dentre os efeitos biológicos induzidos pelo LPS podemos citar: febre, choque, coagulação intravascular disseminada, leucopenia, leucocitose, etc (TODAR, 2008).

Figura 1 - Parede celular de bactéria Gram negativa



Fonte: (Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

1.5 Ensaio de pirogênio

É um ensaio onde são utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, com peso a partir de 1.5 kg. No teste inicial utiliza-se 03 coelhos por produto. Caso algum animal

do ensaio inicial apresentar variação de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, o ensaio será repetido com 05 (cinco) novos coelhos. O produto será considerado satisfatório se no máximo 03 (três) dos oito animais apresentar variações individuais de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, ou se o somatório das variações de temperatura dos oito coelhos não for superior a $3,3^{\circ}\text{C}$. Para os soros hiperimunes a dose do produto administrada por coelho é de 1 mL/kg. O ensaio de pirogênio é realizado de acordo como o Procedimento Operacional Padronizado (POP), do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE EM SAUDE, (INCQS, 2017). POP nº 65.3330.002 (ENSAIO DE PIROGÊNIO), baseado nas diretrizes estabelecidas na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA Brasileira, 2010).

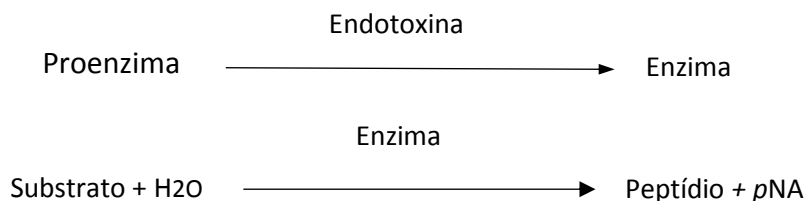
1.6 Ensaio de LAL- QCL cinético

O ensaio LAL pelo método QCL (Quantitativo Cinético em *Limulus*) é um ensaio quantitativo cinético para detecção de endotoxina de bactérias Gram negativas. Uma amostra é misturada ao LAL/substrato reagente, colocada em uma placa incubadora e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma coloração amarela. O tempo necessário para o aparecimento da coloração amarela (Tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra, ou seja, na presença de uma grande quantidade de ET a reação ocorre mais rapidamente (em menor tempo), ao contrário, na presença de uma pequena quantidade de ET o tempo para que ocorra a reação é maior. A concentração em amostras desconhecidas deve ser calculada a partir de uma curva padrão. De forma contínua durante todo o ensaio, o programa de computador leitor de microplaca/WinKQCL® monitora a 405 nm a absorvância em cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente 0,200 unidades de absorvância. Esse tempo é denominado “tempo de reação”. O programa de computador executa automaticamente uma correlação linear log/log do “tempo de reação” de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim prever as concentrações de ET presentes nas amostras em teste. O modelo polinomial utilizado no ensaio, denominado *PowerCurve*, melhora

a precisão da previsão de concentrações de ET sobre a série total de ET. Quando se utiliza o modelo *PowerCurve*, uma curva padrão é gerada usando-se o \log_{10} dos valores do “tempo de reação” e seus correspondentes \log_{10} das concentrações de endotoxina para definir uma equação polinomial. A equação polinomial utilizada para gerar a curva de regressão é determinada pelo número de padrões de ET no ensaio. De forma a calcular as concentrações de ET em amostras desconhecidas, todo teste de LAL QCL-Cinético deve ser submetido a uma curva padrão de referência. Devido a larga faixa de concentração em que os valores de ET podem ser determinados, é possível ajustar a faixa quantitativa de qualquer teste através do ajuste da concentração dos padrões de ET usados para gerar a curva padrão. Um mínimo de 3 (três) concentrações do padrão é requerido. O ensaio do LAL QCL-Cinético foi desenvolvido para ser linear de 0,005 EU/mL a 50 EU/mL. (LONZA, 2016).

Como podemos ver na figura abaixo (Figura 2), a ET de bactéria Gram-negativa catalisa a ativação da proenzima no reagente LAL. A velocidade inicial de ativação é determinada pela concentração de ET presente. A enzima ativada catalisa a divisão do *p*-nitroanalina (*p*NA) do substrato sem cor Ac-LLe-Glu-Ala-Arg-*p*NA. O *p*NA liberado é mensurado fotometricamente, a 405 nm continuamente durante o período de incubação. A concentração de ET na amostra é calculada a partir da comparação do seu Tempo de Reação com o Tempo de Reação da amostra contaminada com ET padrão (*spike*).

Figura 2 - Princípio do teste LAL cromogênico



Fonte: LONZA, 2016.

1.7 Argumentos para a substituição do ensaio de pirogênio pelo ensaio de LAL

A Segunda Guerra Mundial ocasionou uma grande demanda em relação à terapia envolvendo parenterais de grande volume e chamou a atenção para a necessidade de um ensaio oficial da Farmacopeia Americana (USP) para garantir a

ausência de pirogênios em preparações intravenosas. Assim, em 1941, o Comitê de Revisão da USP autorizou 3 Subcomissões em ensaios biológicos para a realização do estudo colaborativo de pirogênios. O estudo foi realizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), *National Institute of Health* (NIH) e por 14 laboratórios farmacêuticos. Os resultados desse estudo levaram

à incorporação do primeiro ensaio oficial de pirogênio em coelhos na 12ª edição da USP em 1942 (WILLIAMS, 2007).

Por mais de 40 anos o ensaio de pirogênio em coelhos permaneceu invariável e sua efetividade foi pouco questionada. Hoje, para aprovação e comercialização de grande parte dos produtos farmacêuticos e biotecnológicos administrados por via parenteral, os principais órgãos regulatórios internacionais exigem o controle pelo método *in vitro* de LAL (MORALES, 2004).

Apesar das medidas preventivas serem tomadas durante as etapas de produção ou purificação de soros hiperimunes, esses podem vir a ser contaminados com ET, um tipo de pirogênio liberado pela parede de bactérias Gram-negativas. Endotoxinas produzem uma reação febril quando injetadas em humanos ou outros mamíferos, podendo ocasionar a morte em alguns casos. Desta forma, a sua concentração em soluções a serem administradas parenteralmente deve ser reduzida em níveis toleráveis pelo organismo (ACCONCI, 1999).

A importância de se controlar a contaminação por ET na produção de soluções parenterais torna-se evidente quando confrontada com quatro aspectos de sua existência. A primeira é a sua ubiquidade na natureza; a segunda é a alta toxicidade que a ET apresenta em relação a outros pirógenos; a terceira é a sua estabilidade ou capacidade de reter a sua natureza endotóxica após ser submetida a condições extremas de temperatura e a quarta é a relativa probabilidade de sua ocorrência em soluções parenterais. A preocupação com a ET, a partir de uma perspectiva de controlar sua contaminação na produção de parenterais, superou as preocupações em proteger as contaminações oriundas de todos os outros tipos de pirogênios predominantes na segunda metade de quase um século de produção de parenterais (a primeira metade dispendo de pouco ou nenhum controle da qualidade). A mudança no paradigma de preocupação, passando de pirogênios em geral para ETs, especificamente se iniciou com o teste em água para soluções injetáveis e de materiais em processo, culminando na disponibilidade do teste do LAL para o produto final como uma alternativa ao teste de pirogênio da *United States Pharmacopeia*

(USP), em 1980. A questão central que se levantou sobre a proposta de substituição do ensaio de pirogênio em coelhos pelo teste de LAL foi: como se pode ter a certeza em testes apenas para a detecção de ET de que outros pirógenos microbianos passarão despercebidos no processo de fabricação parenteral ? Tem se respondido a questão em parte, ao se considerar a ubiquidade, estabilidade e relativa pirogenicidade de ET de bactérias Gram negativas, mas também pelos requisitos mínimos de crescimento de bactérias Gram negativas que permitem seu crescimento em águas purificadas. Inversamente, a resposta pode ser encontrada na desqualificação da preocupação excessiva para cada tipo de organismo não Gram negativo que poderia ocorrer nas operações de produção de parenterais, devido: (1) a predisposição ambiental do organismo que impede a sua proliferação em larga escala no processo de produção de parenterais aquosos, (2) a relativa facilidade de degradação de seus subprodutos (com exceção das exotoxinas termoestáveis de bactérias Gram positivas que têm significantes necessidades de crescimento), (3) ao emprego de modernos procedimentos assépticos na produção e (4) ao uso de métodos de controle da qualidade exigidos para as Boas Práticas de Produção (GMPs) (WILLIANS, 2007). O Quadro 2 resume as vantagens e desvantagens dos ensaios *in vitro* do LAL e do pirogênio *in vivo* (WILLIANS, 2007).

Quadro 2- Vantagens e desvantagens do ensaio do LAL X Ensaio de Pirogênio

Ensaio do LAL	Ensaio de Pirogênio
Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram negativas	Detecta outros pirógenos além de endotoxinas
Várias amostras podem ser analisadas simultaneamente	Não pode utilizar um grande número de animais simultaneamente
A execução do ensaio é feita por uma única pessoa	São necessárias no mínimo duas pessoas para a execução do ensaio
É econômico, dispensando altos gastos com equipamentos especializados	Necessita de altos gastos para construção de um biotério, assim como, sua manutenção

Continuação do Quadro 2

É sensível, detectando pequenas concentrações de endotoxina. É um ensaio quantitativo	Não é sensível para detecção de pequenas concentrações de endotoxina e/ou outros pirógenos. Ausência de quantificação.
É um teste <i>in vitro</i>	Envolve resistência e estresse dos animais, bem como, a questão ética de sua utilização.
Controles positivos e negativos são realizados a cada ensaio	Recomenda-se uma curva dose-resposta a cada seis meses para avaliar a resposta dos animais
Duração do ensaio (2 horas em média)	Duração do ensaio (6 horas em média)

Fonte: Do autor, 2018.

1.8 Controle da qualidade de soros hiperimunes

É responsabilidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), desde 1983, o controle da qualidade dos soros hiperimunes antes de serem distribuídos às Secretarias de Saúde. Atualmente os principais ensaios de controle de qualidade realizados pelo INCQS para esses soros são: Pirogênio, Análise de Protocolo, Potência, Esterilidade Bacteriana e Fúngica, pH, Teor de Fenol, Teor de Sólidos Totais e Volume Médio.

1.9 Histórico do Uso de Soros e o Processo de Produção

1.9.1 Desenvolvimento do uso de soros

Depois que Émile Roux demonstrou que a bactéria da difteria, descoberta por Loeffler em 1883, exercia sua ação deletéria por meio de uma exotoxina absorvida pelos linfáticos da orofaringe, surgiu a idéia de neutralizar esta toxina por agentes químicos ou biológicos.

Von Behring, depois de exaustivos experimentos, verificou que o soro de um animal antes inoculado com a toxina diftérica, produzia a desejada antitoxina,

tornando o soro deste animal capaz de neutralizar doses letais da toxina injetadas em outro animal não imune. Kitasato, que trabalhava juntamente com Von Behring nos laboratórios de Koch, em Berlim, comprovou que o mesmo se passava em relação ao tétano. Em 1890 ambos assinaram em conjunto um artigo que se tornou clássico, intitulado "Mecanismo de imunidade em animais à difteria e ao tétano".

Em 1893 Von Behring aplicou pela primeira vez o soro antidiftérico em humanos, porém os resultados não foram tão bons quanto se esperava. Contudo, no ano seguinte já se notava um declínio na mortalidade por difteria na Alemanha.

Até então, os animais usados nos experimentos eram a cobaia, carneiro e cabra. Visando aumentar o teor de antitoxina no soro, ambos tiveram a idéia de usar um animal de grande porte e passaram a imunizar o cavalo, cujo soro se mostrou mais eficaz.

Em 1898 já não havia mais dúvida quanto ao valor da grande descoberta e em 1901 Von Behring recebeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, o primeiro a ser concedido pela Fundação Nobel.

O processo passou a ser utilizado no tratamento de outras doenças infecciosas de origem bacteriana, como a peste bubônica.

Comprovada a possibilidade de se produzir biologicamente uma antitoxina específica para as diferentes toxinas bacterianas, nada mais natural do que estender o método também às toxinas não bacterianas. Foi o que sucedeu com o veneno das serpentes.

Em 1888, em Saigon, capital da então possessão francesa, a Indochina, foi fundado um Instituto para tratamento antirrábico segundo o método descoberto por Pasteur. Trabalhando neste Instituto, Albert Calmette, em 1891, um ano após a publicação das experiências de Von Behring e Kitasato, iniciou pesquisas objetivando a produção de soro antiofídico, capaz de neutralizar a peçonha das serpentes.

A espécie de serpente comum na região é a *Naja tripudians*. Calmette extraiu o veneno de 19 exemplares, inoculando-o em doses crescentes em animais, os quais se tornaram resistentes a doses letais do mesmo veneno.

Em 1894, regressando à França, continuou seus estudos no Instituto Pasteur de Lille, onde recebia de Saigon grande quantidade de veneno da *Naja*, suficiente para inocular grandes animais.

Orientado por Émile Roux, Calmette produziu um soro muito ativo contra o veneno da Naja, de ação preventiva e curativa, e que se mostrou igualmente ativo para outras espécies de serpentes asiáticas.

No Brasil preocupava-se com o problema do ofidismo um dos mais eminentes personagens dentre os cientistas que implantaram a pesquisa científica no País, Vital Brazil Mineiro da Campanha. Ele, em suas peregrinações pelo interior, presenciou muitos acidentes ofídicos e começou a se interessar pelo problema. Deixando o serviço público, foi clinicar em Botucatu, onde encontrou um velho conhecido seu, Reverendo Carvalho Braga. Segundo relato do próprio Vital Brazil, o Reverendo Braga teve influência decisiva na sua carreira futura, quando lhe falou de várias plantas usadas empiricamente no tratamento das mordeduras de cobras e o encorajou a estudar este campo. "Segui o conselho do Reverendo", diz Vital Brazil, "e comecei a estudar as substâncias contidas em tais plantas".

Neste ínterim, Vital Brazil tomou conhecimento dos trabalhos de Calmette, na Indochina, e convenceu-se de que deveria dar novo rumo às suas pesquisas. Como não poderia desenvolver experimentos de soroterapia e imunologia em Botucatu, transferiu-se para a capital, São Paulo, onde conseguiu, em julho de 1897, um lugar de assistente no Instituto Bacteriológico, sob a direção de Adolfo Lutz.

Lutz permitiu a Vital Brazil continuar seus estudos sobre ofidismo, agora como parte das atividades do Instituto. Um ano depois ele apresentava ao diretor do Instituto os primeiros resultados obtidos com o veneno de duas espécies de serpentes, as mais freqüentes no Brasil: *Bothrops jararaca* e *Crotalus terrificus*. Esta última espécie é facilmente reconhecida pela existência do "chocalho" na extremidade da cauda.

Ao contrário de Calmette, que acreditava que o soro anti-Naja fosse polivalente, servindo para qualquer espécie de serpente, Vital Brazil defendia a idéia da especificidade do soro, baseado no fato de que o soro por ele preparado com o veneno da jararaca, do gênero *Bothrops*, não neutralizava o veneno da cascavel, do gênero *Crotalus*, e vice-versa. Experimentou ele o soro de Calmette, que se mostrou destituído de ação contra o veneno das serpentes brasileiras.

Em 1899 ocorreram na cidade de Santos vários casos de óbitos, atribuídos inicialmente à febre amarela. Tais casos foram precedidos de uma mortandade nos ratos, que eram abundantes na região portuária, o que fez suspeitar de peste bubônica.

Vital Brazil foi encarregado pelo Instituto Bacteriológico de estudar *in loco* a natureza da doença. Em instalações precárias e improvisadas realizou autópsias, examinou bubões dos doentes e obteve culturas positivas para o bacilo da peste no sangue e no baço de ratos infectados. Comprovou, assim, tratar-se realmente de um surto epidêmico de peste bubônica, que havia entrado no Brasil pelo porto de Santos, o que foi confirmado por Oswaldo Cruz, designado pelo Governo Federal para acompanhar os trabalhos.

No contato com os doentes, Vital Brazil contraiu a peste e por pouco não encerrava ali a sua carreira. Assim como vencera a febre amarela, também sobreviveu à peste bubônica.

A epidemia estendeu-se a vários municípios do Estado de São Paulo, ao mesmo tempo que se registraram casos no Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul.

O tratamento da peste, na época, era feito com soro e vacina, e o controle epidemiológico pela desratização. Tendo em vista a rápida propagação da peste e dadas as dificuldades de importação de soro e vacina da Europa, tornou-se necessário e urgente iniciar a fabricação do soro em nosso País, o que foi feito no Rio de Janeiro por Oswaldo Cruz, e em São Paulo, por Vital Brazil.

Emílio Ribas, diretor do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, cômico da falta de espaço e de condições no Instituto Bacteriológico para imunização de cavalos e considerando o temor da população a um possível contágio pelo bacilo da peste, propôs ao Governo a criação de um Instituto Soroterápico, longe do centro da Capital.

Uma Comissão constituída por Adolfo Lutz, Oswaldo Cruz e Vital Brazil escolheram como local adequado para instalação do novo Instituto, a fazenda Butantan, distante 9 km da Capital, com uma área de 4.000.000 m².

A chefia do novo Instituto foi entregue a Vital Brazil, que ficou responsável pela produção do soro antipestoso. Um primitivo rancho junto ao estábulo, antes utilizado para a ordenha de vacas, foi transformado em laboratório improvisado e ali tiveram início os primeiros trabalhos para a produção do soro.

Em fevereiro de 1901 o Instituto foi legalmente oficializado com o nome de Instituto Butantan e Vital Brazil nomeado seu diretor. Em junho do mesmo ano, o Instituto entregava para consumo a primeira partida de soro antipestoso, que foi utilizado na epidemia da cidade de Campos, no Estado do Rio de Janeiro.

Apesar de todos os contratemplos e dos inesperados acontecimentos que reclamavam a sua participação, Vital Brazil não desistira das suas investigações sobre ofidismo e no Instituto Butantan encontrou espaço e ambiente adequados à continuidade de seu trabalho nesse setor. E tal foi o seu empenho, que em agosto de 1901 os soros anticrotálico, antibotrópico e misto foram liberados para uso no homem.

A fim de obter uma quantidade suficiente de veneno para a produção destes soros, o Instituto Butantan deflagrou uma campanha, inicialmente no interior do Estado de São Paulo e, a seguir, em todo o País, de esclarecimento à população sobre o novo tratamento para mordedura de cobra, oferecendo o soro em troca de serpentes vivas. Foram dadas instruções de como as cobras deveriam ser capturadas, acondicionadas em caixas de madeira e remetidas ao Instituto.

A iniciativa foi bem recebida e permitiu a instalação de um serpentário no Instituto, assegurando a obtenção de veneno na quantidade desejada. Até 1949, o Instituto havia recebido cerca de 500.000 serpentes entre venenosas e não venenosas, e extraído 51 litros de veneno. A mortalidade por acidentes ofídicos no País caiu verticalmente e milhares de vidas foram poupadas na zona rural.

A primeira consagração ao trabalho de Vital Brazil ocorreu no V Congresso de Medicina e Cirurgia, realizado no Rio de Janeiro em 1903. Por indicação deste Congresso, o Governo Federal concedeu-lhe um prêmio e o Governo do Estado de São Paulo proporcionou-lhe uma viagem de estudos à Europa, com a duração de um ano.

Regressando ao Brasil em 1905, além da produção dos soros antiofídicos, iniciou a produção do soro antidiftérico e dedicou-se ao estudo de outros animais peçonhentos como o escorpião e as aranhas venenosas.

Em 1911 Vital Brazil publicou um livro de divulgação sobre o ofidismo, intitulado "Defesa contra o ofidismo", o qual foi traduzido para o francês em edição ampliada.

Em 1915 Vital Brazil foi oficialmente convidado a participar de um Congresso Pan-americano em Washington, no qual discorreu sobre o ofidismo e seu tratamento.

Nesta sua viagem aos Estados Unidos, Vital Brazil, conseguiu projetar a medicina brasileira em âmbito internacional e comprovar o acerto de sua teoria, da especificidade do soro, senão quanto à espécie, pelo menos quanto ao gênero das serpentes.

Vital Brazil permaneceu na direção do Instituto Butantan até 1919, quando, por razões políticas, afastou-se do cargo, voltando a exercê-lo, posteriormente, no período de 1924 a 1927. (REZENDE, 2004)

1.9.2 Produção de soro

Etapas realizadas durante a produção de soros (Figura 3).

Figura 3 - Etapas da produção de soro contra o veneno de animais peçonhentos, tétano e raiva, realizadas pelo Instituto Vital Brazil:



Fonte: (INSTITUTO VITAL BRAZIL, 2015).

Soro contra o veneno de animais peçonhentos:

- 1 - São feitos a partir dos próprios venenos. A extração de venenos é feita no Serpentário e Aracnário do Instituto Vital Brazil.
- 2 - Posteriormente, o antígeno é processado, diluído e filtrado e encaminhado à Fazenda Vital Brazil.
- 3 – Uma vez na Fazenda Vital Brazil, o antígeno é injetado no cavalo, que fica em quarentena para produzir os anticorpos necessários para o combate aos venenos específicos. Em seguida, o sangue é retirado do cavalo e as hemácias são separadas do plasma. O plasma é a parte necessária para a produção do soro.

Soro contra o tétano:

- 1 - A produção da toxina tetânica é feita no Departamento de Vacinas Bacterianas (DVBI), no Vital Brazil.

Soro contra a raiva:

1 - A produção do vírus rábico é feita no Departamento de Vacinas Virais (DVVI), no Instituto Vital Brazil.

Comum ao tétano e à raiva:

2 - Depois disso, o antígeno é processado, diluído, filtrado e encaminhado à Fazenda Vital Brazil.

3 - Os cavalos da Fazenda Vital Brazil passam por um processo de vacinação. Posteriormente, o antígeno é injetado no cavalo, que fica em quarentena para produzir os anticorpos necessários para o combate às doenças específicas. Em seguida, o sangue é retirado do cavalo e as hemácias são separadas do plasma. O plasma é a parte necessária para a produção do soro.

Comum aos três:

4 - O plasma é armazenado em uma câmara frigorífica, onde aguarda até ser aprovado em análise para ser encaminhado para a Produção de Soro.

5 - Este plasma é diluído em água apropriada e misturado a uma enzima que quebra as moléculas em tamanhos menores.

6 - Depois disso, o plasma passa por um processo de separação das moléculas. Os anticorpos, presentes em algumas destas moléculas, são a parte do plasma que interessa para a produção do soro.

7 - Após passar por dois processos de filtração, os anticorpos já estão devidamente separados do resto do plasma e prontos para seguir em frente no caminho da produção do soro.

8 - Os anticorpos passam por um processo que os separam de outras substâncias que não devem fazer parte do soro. Ficam, então, purificados.

9 - Nesta fase, os anticorpos passam por testes de controle de qualidade que avaliam sua potência e composição.

10 - Se aprovado, os anticorpos passam por um último processo de filtração esterilizante, que garantirá a ausência de bactérias ou fungos.

11 - Aqui, o líquido já é o soro. Nesta etapa, o soro passa por uma análise do Controle da Qualidade. Se aprovado, é envasado em ampolas.

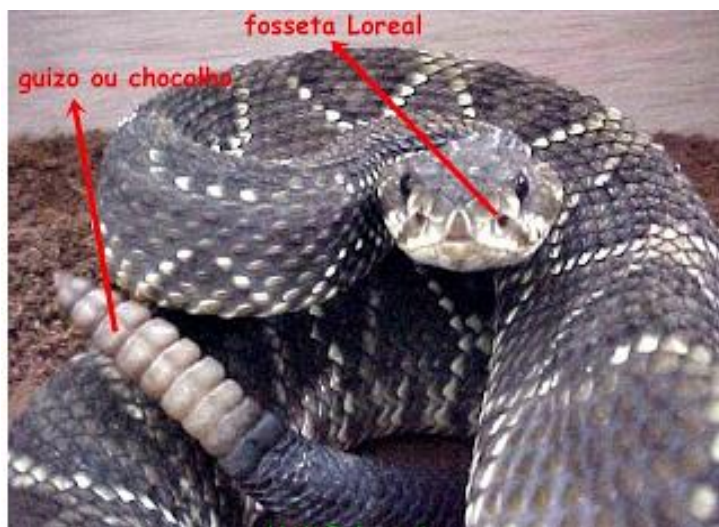
12 - Mais uma vez, passa por análise do Controle da Qualidade. Se aprovado, é revisado e armazenado em caixas apropriadas para ser entregue ao Ministério da Saúde. (INSTITUTO VITAL BRAZIL, 2015)

1.10 Acidentes Crotálico e Escorpiônico e Exposição ao Vírus Rábico e a Toxina Tetânica

1.10.1- Acidente Crotálico

Envenenamento causado pela inoculação de toxinas, através das presas de serpentes (aparelho inoculador), podendo determinar alterações locais (na região da picada) e sistêmicas. A presença de fosseta loreal, órgão termorregulador localizado entre o olho e a narina, caracteriza o grupo de serpentes peçonhentas de interesse médico no Brasil, onde se incluem os gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu, pico-de-jaca); como exceção de serpente peçonhenta, o gênero *Micrurus* (coral verdadeira) não possui fosseta loreal. As serpentes do gênero *Crotalus* (cascavel) são identificadas pela presença de guizo ou chocalho na extremidade caudal. São representadas no Brasil por uma única espécie (*Crotalus durissus*) (Figura 4), com ampla distribuição geográfica, desde os cerrados do Brasil central, regiões áridas e semiáridas do Nordeste, campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. A maioria das serpentes de interesse em saúde pública tem hábito terrícola e noturno. Alimentam-se principalmente de roedores (ratos, camundongos, preás, etc.).

Figura 4 – Cascavel (*Crotalus durissus*)



Fonte: (FONSECA, 2011).

O acidente crotálico representa cerca de 7,5% dos casos de ofidismo notificados no país. Podem ocorrer alterações neuromusculares (ptose palpebral), mialgia (dor local moderada), mioglobinúria (urina escura) (Figura 5), incoagulabilidade sanguínea, bloqueio da junção neuromuscular (paralisia de grupos musculares). A principal complicação do acidente crotálico é a insuficiência renal aguda, com necrose tubular, geralmente nas primeiras 48 horas (Guia de Vigilância Epidemiológica-7ª edição. Normas e Manuais Técnicos- 2009- MS- Brasília).

Figura 5 - Alterações clínicas por acidente crotálico

Acidente por Cascavel – *Crotalus*



Ptose Palpebral



Pouca alteração local



Mioglobinúria

Fonte: (TIBALI, 2013).

O tratamento específico é a infusão do soro anticrotálico (SAC), por via endovenosa, sendo a dose administrada dependente da gravidade do acidente. Nos casos considerados graves devem ser administradas 20 ampolas (10 mL/ampola) (FUNED, 2015).

O soro anticrotálico, heterólogo e hiperimune, é apresentado em ampolas contendo 10 mL de solução injetável da fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas de plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura de venenos crotamino positivo de serpentes do gênero *Crotalus*.

Composição:

Cada ampola de 10 mL contém:

Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas que neutralizam no mínimo 15 mg de veneno de referência de *Crotalus durissus terrificus* (soroneutralização em camundongo)

Fenol(máximo) 35 mg
 Cloreto de sódio 85 mg
 Água para injetáveis q.s.p. 10 mL

1.10.2- Acidente Escorpiônico

O envenenamento é causado pela inoculação de toxinas, através de aparelho inoculador (ferrão) de escorpiões, podendo determinar alterações locais (na região da picada) e sistêmicas. Os escorpiões de importância médica para o Brasil pertencem ao gênero *Tityus*, com várias espécies descritas: *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo) (Figura 6), com ampla distribuição desde o Paraná até o norte da Bahia, com alguns relatos para Sergipe e Alagoas, além da região central do país. Representa a espécie de maior interesse pela facilidade de proliferação, pois essa espécie só possui fêmeas e realiza reprodução por partenogênese, pela alta adaptação ao meio urbano e pelo grande potencial de gravidade do envenenamento; *Tityus bahiensis* (escorpião-marrom) (Figura 7), encontrado em todo o país, com exceção da região Norte; *Tityus stigmurus* (Figura 8), espécie mais comum no Nordeste; *Tityus paraensis* (escorpião-preto) e *Tityus metuendus*, encontrados na Amazônia.

Figura 6 - Escorpião-amarelo (*Tityus serrulatus*)



Fonte: (SANTOS; SANTOS; MEDEIROS, 2014).

Figura 7 - Escorpião-marrom (*Tityus bahiensis*)



Fonte: (SANTOS; SANTOS; MEDEIROS, 2014).

Figura 8 - Escorpião-amarelo do Nordeste (*Tityus stigmurus*)



Fonte: (SANTOS; SANTOS; MEDEREIROS, 2014).

Podem ser encontrados nos mais variados ambientes, escondidos junto às habitações humanas, construções e sob os dormentes das linhas dos trens. Podem sobreviver vários meses sem alimento ou água, o que torna seu controle muito difícil. O hábito noturno é registrado para a maioria das espécies. São mais ativos durante os meses mais quentes do ano. Um dos principais fatores que determinam a periculosidade de uma espécie é a toxicidade do veneno em relação ao homem. A gravidade dos acidentes provocados por espécies perigosas varia conforme a

quantidade de veneno injetada, o local da picada e a sensibilidade da pessoa ao veneno, que geralmente é maior quanto mais jovem for a pessoa, sendo as crianças abaixo de 7 anos o grupo mais vulnerável devido a sua baixa imunidade. Apesar da intensidade das manifestações clínicas serem dependentes da quantidade de veneno inoculada, em geral, os adultos apresentam quadro local benigno, enquanto crianças constituem o grupo mais suscetível ao envenenamento sistêmico grave. Os casos graves podem evoluir com arritmias cardíacas, bloqueio átrio-ventricular total, taquicardia supraventricular, insuficiência cardíaca, edema agudo de pulmão, choque e óbito. O tratamento específico consiste na administração de soro antiescorpionico (SAE) aos pacientes com formas moderadas e graves, que são mais frequentes nas crianças picadas por *T. serrulatus*. Pacientes com manifestações sistêmicas, especialmente crianças (casos moderados e graves), devem ser mantidos em regime de observação continuada das funções vitais, objetivando o diagnóstico e tratamento precoces das complicações. De caráter predominantemente urbano, sua ocorrência tem se elevado nos últimos anos, particularmente nos estados do Nordeste e Sudeste, chegando a mais de 35.000 acidentes em 2005, um aumento de 55% em relação ao ano de 2004, baixando para 33.000 casos em 2006, mas, em 2008, ultrapassou 37.000 notificações. A maior incidência também ocorre no Nordeste: 31,5 casos por 100.000 habitantes, superando a média de incidência nacional (19,5 casos/100.000 habitantes). Apesar da baixa letalidade (0,2%), crianças abaixo de 10 anos têm um risco mais elevado de evoluir para óbito (0,7%). No ano de 2008, foram registrados 86 óbitos, sendo 52,3% em menores de 14 anos. Até 31/03/2017 tivemos 90.119 casos de escorpionismo no Brasil, com 138 óbitos (Acidentes por animais peçonhentos – Ministério da Saúde, 2017).

No caso do escorpionismo, o tempo entre acidente e o início de manifestações sistêmicas graves é bem mais curto do que para os acidentes ofídicos. Desse modo, crianças picadas por *T. serrulatus*, ao apresentar os primeiros sinais e sintomas de envenenamento sistêmico, devem receber o soro específico o mais rapidamente possível, bem como cuidados para manutenção das funções vitais.

Manifestações locais – a dor, de instalação imediata, é o principal sintoma, podendo se irradiar para o membro e ser acompanhada de parestesia, eritema e sudorese localizada ao redor do ponto de picada. Tem duração de até 24 horas, embora o quadro mais intenso ocorra nas primeiras horas após o acidente. Manifestações sistêmicas – após intervalo de minutos até poucas horas (de 2 a 3),

podem surgir, em crianças, manifestações sistêmicas como sudorese profusa, agitação psicomotora, tremores, náuseas, vômitos, sialorreia, hipertensão ou hipotensão arterial, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar agudo e choque (Guia de Vigilância Epidemiológica-7ª edição. Normas e Manuais Técnicos- 2009- MS- Brasília)

O tratamento soroterápico é indicado em pacientes que apresentem, além do quadro local, manifestações de envenenamento sistêmico. Nos casos considerados graves devem ser administrados de 5-10 ampolas (5 mL/ampola) (Instituto Butantan, 2015).

O soro antiescorpiônico, heterólogo e hiperimune, é apresentado em ampolas contendo 5 mL de solução injetável da fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, proteínas encontradas no sangue com anticorpos capazes de garantir a proteção contra o veneno, obtidas de plasma de sangue de cavalos hiperimunizados contra o veneno de escorpiões *Tityus serrulatus*.

Composição:

Cada ampola de 5 mL contém:

Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas que neutralizam no mínimo 5 mg de veneno de referência de *Tityus serrulatus* (soroneutralização em camundongo)

Fenol (máximo) 17,5 mg

Cloreto de sódio 42,5 mg

Água para injetáveis q.s.p. 5 mL

1.10.3 Exposição ao vírus rábico

A raiva é uma zoonose viral, que se caracteriza como uma encefalite progressiva aguda e letal. Todos os mamíferos são suscetíveis ao vírus da raiva e, portanto, podem transmiti-la. A doença apresenta dois principais ciclos de transmissão: urbano e silvestre, sendo o urbano passível de eliminação, por se dispor de medidas eficientes de prevenção, tanto em relação ao ser humano, quanto à fonte de infecção. Podendo ainda apresentar mais dois ciclos de transmissão: ciclos aéreo e rural (Figura 9).

Figura 9 - Ciclo Epidemiológico da Raiva



Fonte: (RAIVA, 2011).

O vírus rábico pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e gênero Lyssavirus e seu genoma é constituído por RNA. Apresenta dois antígenos principais: um de superfície, constituído por uma glicoproteína, responsável pela formação de anticorpos neutralizantes e adsorção vírus-célula, e outro interno, constituído por uma nucleoproteína, que é grupo específico.

Em relação à fonte de infecção, didaticamente, pode-se subdividir a transmissão urbana e rural em quatro ciclos epidemiológicos: – ciclo aéreo, que envolve os morcegos; – ciclo rural, representado pelos animais de produção; – ciclo urbano, relacionado aos cães e gatos; – ciclo silvestre terrestre, que engloba os saguis, cachorros do mato, raposas, guaxinim, entre outros animais selvagens. A transmissão da raiva se dá pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente, pela arranhadura e lambertura de mucosas. O vírus penetra no organismo, multiplica-se no ponto de inoculação, atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o sistema nervoso central. A partir daí, dissemina-se para vários órgãos e glândulas salivares, onde também se replica e é eliminado pela saliva das pessoas ou animais enfermos. Existe,

na literatura, o relato de oito casos de transmissão inter-humana por meio de transplante de córnea. Nos Estados Unidos, em 2004, foram registrados quatro casos de raiva humana referentes a indivíduos que receberam órgãos doados (fígado, dois rins e artéria ilíaca) de um indivíduo que morreu por infecção pelo vírus da raiva. O mesmo ocorreu na Alemanha, em 2005, com três indivíduos após transplante de órgãos (pulmão, rim e pâncreas) de um indivíduo que faleceu devido àquela infecção. Em ambos os países, os doadores dos órgãos não tiveram suspeita diagnóstica de raiva. Possibilidade remota de transmissão sexual, respiratória, digestiva (em animais) e vertical também são relatadas. No Brasil, a raiva é endêmica, em grau diferenciado de acordo com a região geopolítica. A região Nordeste responde por 54% dos casos humanos registrados de 1980 a 2008; seguida da região Norte, com 19%; Sudeste, com 17%; Centro-oeste, 10%; e Sul, com menos de 1%. Desde 1987, não há registro de casos de raiva humana nos estados do Sul, sendo o último caso no Paraná, cuja fonte de infecção foi um morcego hematófago. No período de 1980 a 2008, cães e gatos foram responsáveis por transmitir 79% dos casos humanos de raiva; os morcegos, por 11%; outros animais (raposas, sagüis, gato selvagem, bovinos, equinos, caititus, gambás, suínos e caprinos), 10%. Vale salientar que, nos anos de 2004 e 2005, devido a ocorrência de surtos de raiva humana nos estados do Pará e Maranhão, o morcego passou a ser o principal responsável pelos casos de raiva humana, com 86,48% dos casos nesses dois anos, ultrapassando os índices de transmissão canina. No ano de 2008, foram notificados 3 casos de raiva humana, sendo 2 por morcegos e 1 por sagüi, não houve transmissão por cão ou gato.

Os sintomas se manifestam após um período variável de incubação, o paciente apresenta mal estar geral, pequeno aumento de temperatura, anorexia, cefaleia, náuseas, dor de garganta, entorpecimento, irritabilidade, inquietude e sensação de angústia. Podem ocorrer hiperestesia e parestesia no trajeto de nervos periféricos, próximos ao local da mordedura, e alterações de comportamento. A infecção progride, surgindo manifestações de ansiedade e hiperexcitabilidade crescentes, febre, delírios, espasmos musculares involuntários, generalizados e/ou convulsões. Espasmos dos músculos da laringe, faringe e língua ocorrem quando o paciente vê ou tenta ingerir líquido, apresentando sialorreia intensa. Os espasmos musculares evoluem para um quadro de paralisia, levando a alterações cardiorrespiratórias, retenção urinária e obstipação intestinal. O paciente se mantém consciente, com período de alucinações, até a instalação de quadro comatoso e evolução para óbito. Observa-se, ainda, a

presença de disfagia, aerofobia, hiperacusia, fotofobia. O período de evolução do quadro clínico depois de instalados os sinais e sintomas até o óbito, é em geral de 5 a 7 dias (Figura 10).

Figura 10 – Quadro clínico de uma pessoa acometida com vírus da raiva.



Fonte: (GUILLEN, 2015).

Em 2004, foi registrado nos Estados Unidos o primeiro relato de tratamento de raiva humana em paciente que não recebeu vacina ou soro antirrábico e evoluiu para cura. A descrição detalhada da terapêutica realizada nessa paciente encontra-se publicada no protocolo de Milwaukee. No Brasil, em 2008, foi confirmada raiva em um paciente do sexo masculino, de 15 anos, proveniente do município de Floresta, estado de Pernambuco. A investigação demonstrou que o menino foi mordido por um morcego hematófago. Após suspeita clínica, foi iniciado o protocolo de Milwaukee adaptado à realidade brasileira, resultando no primeiro registro de cura de raiva humana, no país. A evolução do paciente para cura abriu perspectivas para tratamento de uma doença que, até o momento, era considerada letal. Esse protocolo consiste, basicamente, na indução de coma, uso de antivirais e reposição de enzimas, além da manutenção dos sinais vitais do paciente (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

Administrar o soro antirrábico, heterólogo e hiperimune, em dose única (40 UI/Kg de peso corporal) não ultrapassando o total de 3.000 UI. O soro antirrábico deve ser aplicado sob supervisão médica. Parte do volume total do soro deve ser infiltrada

no local da mordedura, desde que seja possível. O volume restante deve ser aplicado sempre por via intramuscular, nas nádegas, de acordo com as doses estipuladas e em ambiente hospitalar, pois pode desencadear reações alérgicas.

O paciente deve ser orientado a procurar assistência médica ao aparecimento de qualquer reação adversa mesmo após o final do tratamento com o soro. O soro antirrábico pode ser administrado a qualquer momento, mesmo após refeições ou ingestão de bebidas alcoólicas, mas exige cuidado mais rigoroso desses pacientes pelo risco de complicações relacionadas a vômitos (aspiração). O uso concomitante de outros medicamentos não impede a utilização do soro. (FUNED, 2015).

O soro antirrábico, heterólogo e hiperimune, é apresentado em ampolas contendo 5 mL de solução injetável da fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas de plasma de equinos hiperimunizados com vírus rábico fixo, replicado em cultivo celular.

Composição:

Cada ampola de 5 mL contém:

Fração F(ab')₂ de origem equina que equivalem, no mínimo, a 1.000 UI
(soroneutralização em camundongos)

Fenol	(máximo) 17,5 mg
Cloreto de sódio	42,5 mg
Água para injetáveis	q.s.p. 5 mL

1.10.4- Exposição à toxina tetânica

O tétano, também conhecido como tétano acidental, é uma doença infecciosa aguda não contagiosa, causada pela ação de exotoxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*, as quais provocam um estado de hiperexcitabilidade do sistema nervoso central. Clinicamente, a doença manifesta-se com febre baixa ou ausente, hipertonia muscular mantida, hiperreflexia e espasmos ou contraturas paroxísticas, sudorese, opistótono. Em geral, o paciente mantém-se consciente e lúcido. (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Sintomas de Tétano



Fonte: (Frazão, 2017).

Figura 12 - Opistótono (Contratura muscular generalizada causada pela toxina tetânica)

Opistótono



Fonte: (BRAGA, 2015).

O *C. tetani* é um bacilo gram-positivo esporulado, anaeróbico e que produz esporos que lhe permitem sobreviver no meio ambiente, por vários anos. É normalmente encontrado na natureza, sob a forma de esporo, podendo ser identificado em: pele, fezes, terra, galhos, arbustos, águas putrefatas, poeira das ruas,

trato intestinal dos animais (especialmente do cavalo e do homem, sem causar doença).

A toxina tetânica é introduzida no organismo através de ferimentos ou lesões de pele (traumático, cirúrgico, dentário, queimaduras, injeções, etc) e mucosas (ferimentos superficiais ou profundos de qualquer natureza).

No Brasil, o coeficiente de incidência do tétano acidental na década de 80 foi de 1,8 chegando a 0,44 por 100 mil habitantes em 1998. No período de 1998 a 2007 houve um declínio progressivo, e o número absoluto de casos por ano passou de 705 para 334, representando uma redução de 52,6% no número de casos. A incidência por 100 mil habitantes no mesmo período passou de 0,44 para 0,17, representando uma redução de 73%. Neste mesmo período a região Sudeste apresentou a maior redução do número absoluto de casos (66,28%), seguida da Norte (54,29%), Nordeste (52,94%), Centro-oeste (50%) e Sul (27,72%). Em 2008 foram 331 casos absolutos em todo território nacional, sendo: 39 na região Norte (12%); 110 no Nordeste (33%); 74 no Sudeste (22%); 72 no Sul (22%) e 36 no Centro-oeste (11%). O coeficiente de incidência se manteve igual ao de 2007, ou seja, 1,8; portanto, a redução no número de casos de 2007 para 2008 não foi significativa, abaixo de 1%. No período de 2000 a 2008, 51% dos casos estão concentrados no grupo com a faixa etária entre 25 a 54 anos de idade. Em segundo lugar os casos se concentraram na faixa etária de 55 a 64 anos, somando 17%. No mesmo período, a ocorrência da doença em menores de 5 anos em 2008 diminuiu para 1,4%, incluindo casos em menores de 1 ano. O tétano acomete todas as faixas etárias e, tanto no ano de 2008 como em todo o período citado, a maioria dos casos ocorreu com pessoas entre 25 e 64 anos de idade, sendo o sexo masculino o mais acometido pela doença. A maioria dos casos de tétano acidental ocorreu em agricultores, seguida pelos grupos de aposentados e donas de casa.

Na neutralização da toxina tetânica utiliza-se a imunoglobulina humana antitetânica (IGHAT), somente IM, por conter conservante ou, o soro antitetânico (SAT). A dose terapêutica recomendada depende do quadro clínico e do critério médico (Guia de Vigilância Epidemiológica-7ª edição. Normas e Manuais Técnicos-2009- MS- Brasília).

Uso Profilático: Administrar 5.000 UI (1 ampola) por via intramuscular (5 mL/ampola). Uso Terapêutico: 20.000 a 100.000 UI, (podendo se aplicar metade da dose por via intramuscular ou subcutânea e metade por via intravenosa) dependendo

da gravidade, em casos considerados mais graves aplica-se mais 50.000 UI no dia seguinte por via intramuscular (FUNED, 2015). O soro antitetânico, heterólogo e hiperimune, é apresentado em ampolas contendo 5 mL de solução injetável da fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas obtidas de plasma de equinos hiperimunizados com toxoide e toxina tetânica.

Composição:

Cada ampola de 5 mL contém:

Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas de origem equina que equivalem, no mínimo, a 5.000 UI (soroneutralização em camundongos)

Fenol (máximo) 17,5 mg

Cloreto de Sódio 42,5 mg

Água para injetáveisq.s.p 5 mL

1.11 Validação de métodos

Os conceitos envolvendo a validação de métodos analíticos são uma constante preocupação das principais agências reguladoras mundiais. Segundo a Farmacopeia Americana, 39ª edição, “validação de um procedimento analítico é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos laboratoriais, que as características de desempenho do processo atendam aos requisitos para os quais as aplicações analíticas se destinam”.

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR ISO/IEC 17025 define validação como sendo “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” onde preconiza que “a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003). O objetivo de uma validação, de acordo com a Resolução- RE nº 899 é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a

determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para fins de validação, os testes são classificados em 4 categorias de acordo com sua finalidade (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: (ANVISA, 2003).

Para cada categoria aplica-se um conjunto de testes (parâmetros de desempenho), relacionados no Quadro 4.

Quadro 4 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. Adaptado do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria V
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão: Repetitividade (repetibilidade) e Precisão Intermediária	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: (ANVISA, 2003).

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

2 JUSTIFICATIVA

A relevância de nosso trabalho está voltada para uma grande preocupação da comunidade científica e da sociedade de uma maneira geral, que é a utilização de animais em experimentações. Os transtornos e sofrimentos pelos quais passam várias espécies de animais durante os ensaios nos aflige e nos deixa impotentes frente a essa realidade. Este projeto propõe a substituição do ensaio de pirogênio em coelhos pelo ensaio de LAL, pelo método cromogênico cinético, para quatro produtos sujeitos ao controle de qualidade no âmbito da Vigilância Sanitária. São quatro soros hiperimunes: soro anticrotálico, soro antirrábico, soro antitetânico e soro antiescorpiônico. A partir de levantamento realizado entre janeiro de 2017 a novembro de 2017, constatamos que cerca de 280 coelhos foram utilizados no ensaio de pirogênio para testar a qualidade de soros hiperimunes (Fonte Harpya/INCQS, 2017). No futuro, com a substituição do ensaio *in vivo* pelo ensaio *in vitro*, poderemos não só evitar o sofrimento de inúmeros animais, como passar a ter um método mais eficiente e mais sensível. O ensaio de pirogênio detecta endotoxinas a partir de 5 EU/mL enquanto o ensaio de LAL pelo método cromogênico cinético detecta endotoxinas a partir de 0,05 EU/mL. Desta forma, teremos um método mais seguro para o controle de qualidade toxicológico dos produtos (soros hiperimunes) e que principalmente evite o uso de animais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Validar intralaboratorialmente o ensaio de LAL (método cromogênico cinético – *in vitro*) para os soros anticrotálico, antiescorpionico, antirrábico e antitetânico.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros de desempenho: especificidade, linearidade/curva-padrão, precisão (repetitividade e/ou precisão intermediária), e exatidão para cada tipo de soro hiperimmune
- Confirmar, através de ensaios analíticos, a Concentração Limite de Endotoxina (CLE) calculada teoricamente, para cada tipo de soro hiperimmune pelo método cromogênico cinético.
- Confirmar, através de ensaios analíticos, a Máxima Diluição Válida (MDV) calculada teoricamente, para cada tipo de soro hiperimmune pelo método cromogênico cinético.
- Comparar os resultados obtidos a partir do ensaio de pirogênio (*in vivo*) com os resultados do ensaio de LAL. (*in vitro*).

4 METODOLOGIA

O programa computacional GraphPad Prism versão 6 “GraphPad Software” (2015) foi empregado na análise estatística dos resultados obtidos em nossos experimentos. Foram utilizados nas análises o teste de normalidade D’Agostino & Pearson, o teste t de Student, *runs test* (desvio de linearidade), teste ANOVA de regressão linear. Para a avaliação da correlação entre o somatório das variações individuais de temperatura no ensaio em coelhos e os valores de concentração de endotoxina em EU/mL no teste de LAL foram empregados o coeficiente de correlação de Pearson (r) paramétrico ou o coeficiente de correlação Spearman (rs) não paramétrico. Para valores discrepantes foi utilizado o teste de Grubbs. O teste de Cochran foi usado para verificarmos a homocedasticidade do método.

4.1 Protocolo de Validação

A seleção dos parâmetros deve ser feita baseada no objetivo de cada método e no princípio básico de medição que se utiliza. Através de uma avaliação crítica do método e das orientações específicas para a execução de uma validação, o técnico poderá estabelecer quais parâmetros deverão ser avaliados (POP nº 65.1120.065/INCQS, 2007). O teste do LAL, em questão, se enquadra na Categoria II (Quantitativo) (Quadros 4).

Para a validação do ensaio de LAL para os soros anticrotálico, antirrábico, antitetânico e antiescorpiônico, pelo método cromogênico cinético, serão avaliados os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade (especificidade), precisão (repetitividade e precisão intermediária), e exatidão. O ensaio de Qualificação Inicial do laboratório, bem como, a linearidade/curva-padrão do método serão realizados antes de serem avaliados os parâmetros de desempenho. Assim como, os ensaios de Inibição/Potencialização serão realizados para cada soro antes de serem avaliados os parâmetros de desempenho.

4.2 Qualificação inicial

A qualificação inicial permite avaliar o material utilizado no ensaio e o desempenho do analista, bem como, a eficácia dos reagentes utilizados (endotoxina, reagente LAL e água apirogênica). Utiliza-se no ensaio um Controle Padrão de Endotoxina (CSE) ou o Padrão de Referência de Endotoxina (RSE) da USP (United States Pharmacopeia), de potência conhecida, com pelo menos 3 concentrações, em quadruplicata, que contemple a faixa desejada da curva-padrão de endotoxina. O coeficiente de correlação, r , deve ser $\geq -0,980$ para comprovação da linearidade da curva (FDA,1992; LONZA, 2016).

4.3 Linearidade/Curva padrão

É a capacidade de uma metodologia demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito no produto, demonstrando haver uma relação linear. Como critérios para a validação serão utilizados o coeficiente de correlação, a interseção da reta com o eixo Y (coeficiente linear) e o coeficiente angular. Os critérios devem obedecer aos parâmetros descritos abaixo (Quadro 5).

Quadro 5 - Parâmetros e Especificações da Curva Padrão.

Parâmetros	Especificações
Coeficiente de correlação linear	-1 a - 0,980
Interseção com o eixo Y	2,5 a 3,5
Coeficiente angular	-0,4 a -0,1

Fonte: (LONZA, 2016).

4.3.1 Homocedasticidade das variâncias das respostas

Avaliação da homocedasticidade das variâncias das respostas dos tempos de reação em relação as concentrações de endotoxina (Teste de Cochran), conforme equação 1:

$$C_{cal.} = S^2 \text{ maior} / \Sigma S^2, \text{ Equação 1}$$

onde:

S^2 maior = maior variância

ΣS^2 = somatório das variâncias

A variância (S^2 ou V) é calculada dividindo-se o somatório dos quadrados dos desvios de cada valor em relação à média, pelo número de graus de liberdade

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Onde,

X_1 = valor obtido

\bar{x} = média dos valores obtidos

O critério de aceitação: $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ = Homocedasticidade

4.4 Ensaio de inibição/Potencialização

É indicado para determinar em quais diluições do produto pode-se trabalhar sem que haja interferentes para inibir ou potencializar a presença de endotoxina.

No Teste de Inibição/Potencialização o controle do produto contaminado (PPC) ou *spike* (concentração média da curva padrão) é testado juntamente com o produto não contaminado. A endotoxina recuperada no produto contaminado deve estar dentro da faixa de aceitação de recuperação, ou seja, entre 50% e 200% (USP, 2015).

4.5 Seletividade

É a habilidade do método bioanalítico de medir (quantificar) e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes no produto, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação e componentes da matriz

(ANVISA, 2003). O teste de LAL QCL-cinético utiliza uma preparação de lisado de amebócitos do *Limulus* (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um programa de computador apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Este reagente foi projetado para ser usado como um teste para detecção de endotoxina *in vitro* para produtos parenterais acabados, produtos biológicos e dispositivos médicos de uso humano e animal. (LONZA, 2016).

4.6 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

4.6.1 Repetitividade (precisão intra-corridas)

Repetitividade (Repetibilidade) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, as amostras replicadas (em triplicatas) devem ser testadas para calcular o coeficiente de variação (CV %) expresso em valores percentuais.

4.6.2 Precisão Intermediária (precisão inter-corridas)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A ANVISA preconiza para critérios de validação em relação ao parâmetro Precisão, o CV (%). Para ensaios analíticos o CV (%) deve ser < 5%, para ensaios bioanalíticos o CV (%) deve ser < 15%. Para o FDA, Farmacopeia Americana e Europeia, o CV (%) para a aprovação de produtos analisados pelo método cromogênico cinético, deve ser < 10% (FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

Cálculo do coeficiente de variação se determina conforme equação 2:

$CV (\%) = (DP / CMD) \times 100$, Equação 2, onde;
DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada (média do tempo de reação em segundos).

4.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado (*spike*) à amostra, e é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme equação 3:

Recuperação (%) = (Concentração média experimental / Concentração teórica) X 100, Equação 3.

A ANVISA preconiza para critérios de validação em relação ao parâmetro Exatidão, uma recuperação de 100% ± 30%. Para aprovação de produtos, FDA, Farmacopeia Americana e Europeia preconizam uma faixa de recuperação de 50% a 200%.

A recuperação foi realizada pelo *Software WinKQCL®* (LONZA - versão 4.0, 2016).

4.8 Procedimento Experimental do Ensaio LAL (Método Cromogênico Cinético)

4.8.1 Materiais/Equipamentos

- Água Reagente LAL apirogênica; tubos de vidro borossilicato apirogênicos; micropipetas (10 µL, 100 µL e 900 µL); pipeta repetidora, pipetas sorológicas descartáveis e apirogênicas, ponteiros apirogênicos; leitor de microplacas Elx808 IU (Bio-Tek Instruments, INC); *Software WinKQCL®* (LONZA - versão 4.0); cronômetro e agitador de tubos; reagente LAL cromogênico; microplacas com 96 poços; endotoxina padrão (E.coli 055:B5).

4.8.2 Preparo do material

As micropipetas de 10 µL (volume fixo – marca Biohit), 100 e 900 µL (volume variável - marca Eppendorf) e pipeta repetidora (volume variável - marca Eppendorf)

utilizadas nos ensaios foram calibradas pelo setor de metrologia do INCQS, segundo o POP nº 65.1120.027 (CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS VOLUMÉTRICOS OPERADOS A PISTÃO E/OU ÊMBOLO) e POP nº 65.1120.048 (DETERMINAÇÃO DAS MASSAS ESPECÍFICAS DO AR E DA ÁGUA). (Quadro 6). As pipetas sorológicas descartáveis de 10 mL (marca CORNING) utilizadas na reconstituição dos kits de LAL e endotoxina, são apirogênicas e possuem precisão volumétrica de $\pm 2\%$ do volume máximo (10 mL). São certificadas pela ANSI/AAMI ST 72, Bacterial Endotoxins. (*American National Standards Institute / Association for the Advanced of Medical Instrumentation*).

Quadro 6 - Resultados e declaração de incertezas da calibração de pipetas.

Valor nominal (μL)	10	100	900	100 r [#]
Valor medido (μL)	10	100	903	100,3
Erro (μL)	0	0	3	0,3
Erro (%)	0	0	0	0,3
CV (%)	0	0	0	0
U (μL)	0	1	1	0
k	2	2	2	2,25

Fonte: (Do autor, 2016).

CV - Coeficiente de variação

U - incerteza expandida ($k \times u_c$)

k - fator de abrangência (probabilidade de abrangência de 95,45%)

u_c - incerteza padrão de medição

r[#] - pipeta repetidora

A variabilidade no preparo da amostra, referente às sucessivas diluições levará em conta as incertezas do material volumétrico utilizado (u_c). O impacto em diluições sucessivas (variabilidade volumétrica) é muito pequeno. Os cálculos de incerteza das diluições são feitos de acordo com o POP nº 65.1120.061 (INCERTEZA EM MEDIÇÕES ANALÍTICAS, 2015).

Os tubos de vidro utilizados nos testes foram tratados através do processo de despirogenização, PU nº 3330.020 (ESTUFA DE DESPIROGENIZAÇÃO, 2015) por no mínimo 30 minutos à temperatura de no mínimo 250° C (USP 39). O reagente LAL

é reconstituído com água apirogênica (2,6 mL), antes de seu uso. O reagente fica estável por 8 horas, quando armazenado em temperaturas entre 2 e 8°C, e estável por 4 semanas, quando armazenado em temperaturas inferiores a -10°C. A endotoxina também é reconstituída com água apirogênica e o volume de reconstituição dependerá da especificação fornecida pelo fabricante, tendo sempre uma concentração de endotoxina final de 50 EU/ml. A endotoxina reconstituída fica estável por 4 semanas entre 2 e 8°C. Ao realizar o ensaio, executa-se diluições seriadas (fator 10) a partir do padrão 50 EU/ml a fim de se obter as concentrações de endotoxina com 5 EU/ml; 0,5 EU/ml; 0,05EU/ml e 0,005EU/ml. Essas concentrações de endotoxina serão utilizadas para a construção da curva padrão para cada experimento.

4.8.3. Preparo da amostra

Na placa teste (microplaca contendo 96 poços), coloca-se 100 µL do branco (água apirogênica), 100 µL dos padrões de endotoxina (curva padrão de 0,005 a 50 EU/mL) e 100 µL das amostras nos poços da microplaca previamente determinados na configuração do programa computacional. O ensaio será realizado em triplicata para garantir melhor precisão. Adicionam-se aos poços específicos para o Controle Positivo do Produto (CPP), conforme procedimento preconizado pelo FDA e USP, 10 µL da solução de 5 EU/ml (ponto médio da curva padrão, obtendo-se assim um CPP de 0,5 EU/mL. Como o volume de trabalho, como descrito acima, é de 100 µL e não de 1000 µL, o ponto médio da curva passa a ser de 0,05 EU/mL.. A seguir, a microplaca será colocada no leitor de microplacas e pré-incubada por um período de tempo \geq a 10 minutos a 37°C \pm 1°C. Ao final do período de pré-incubação, reconstitui-se cada frasco de reagente LAL e dispensa-se 100 µL do reagente dentro de todos os poços da microplaca, começando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em seqüência até a última coluna usada. O tempo de leitura e término do ensaio irá variar de acordo com a concentração de endotoxina presente em cada amostra analisada. A recuperação do CPP adicionado (0,5 EU/mL) deve estar entre 50-200% (FDA, Farmacopeia Americana e Europeia). O pH da amostra deve estar compreendido entre 6-8.

4.9 Cálculo da Concentração Limite de Endotoxina (CLE) e Máxima Diluição Válida (MDV)

A concentração limite de endotoxina foi calculada conforme equação 4.

$CLE = K / M$, Equação 4 onde:

$K = 5 \text{ EU/kg}$ (é uma constante)

M = é a dose humana máxima / kg de peso corporal, que pode ser administrado em um período de uma única hora, sendo utilizada a dose mais alta recomendada do produto e considerando-se 70 kg como sendo o peso médio humano.

A Máxima Diluição Válida (MDV) foi calculada conforme equação 5

$MDV = CLE/\text{Ponto mais baixo da curva padrão}$. Equação 5.

4.10 Ensaio de pirogênio

Os procedimentos do ensaio serão realizados de acordo com o POP nº 65.3330.002 (ENSAIO DE PIROGÊNIO), de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5ª edição). São analisados lotes de soros que entram como amostras para o controle da qualidade no DFT/INCQS.

4.10.1 Animais/Materiais/Equipamentos

- Coelhos adultos (mínimo de 1,5 kg), raça Nova Zelândia provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos no Setor de Animais de Laboratório (SAL) do INCQS; caixas de contenção de coelhos; seringas descartáveis de 5 mL; agulhas descartáveis de 25 X 7,0 mm; algodão; equipamentos de proteção individuais (EPIs) (luvas, gorro, jaleco, sapatilhas e máscaras); sistema de monitoramento de temperatura Pyromon (Ellab).

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Limite de Endotoxina (CLE) e Máxima Diluição Válida (MDV)

5.1.1 Soro Anticrotálico

Cálculo do soro anticrotálico - dose: 20 ampolas (10 mL/ampola):

$$\text{CLE} = 5 \text{ EU/kg} / 200 \text{ mL}/70 \text{ kg. Equação 4}$$

$$\text{CLE} = 1,75 \text{ EU/mL}$$

$$\text{MDV} = 1,75 \text{ EU/mL} / 0,005 \text{ EU/mL} = 350$$

5.1.2 Soro Antirrábico

Cálculo do soro antirrábico - dose: Máximo de 3000 UI:

$$5 \text{ mL equivale a } 1000 \text{ UI} \rightarrow 1 \text{ mL} / 200 \text{ UI}$$

$$\text{CLE} = 5 \text{ EU/kg} / 3000 \text{ UI}/70 \text{ kg} = 0,1166 \text{ EU/UI. Equação 4}$$

$$\text{CLE} = 0,1166 \text{ EU/UI} \times 200 \text{ UI/mL} = 23,3 \text{ EU/mL}$$

$$\text{MDV} = 23,3 \text{ EU/mL} / 0,005 \text{ EU/mL} = 4660$$

5.1.3. Soro Antitetânico

Cálculo do soro antitetânico - dose: 100.000 UI (5mL/ampola/ 5000 UI):

$$1 \text{ ampola} - 5 \text{ mL} - 5000 \text{ UI} \rightarrow 100.000 \text{ UI} - 20 \text{ ampolas} - 100 \text{ mL}$$

$$\text{CLE} = 5 \text{ EU/kg} / 100 \text{ mL}/70 \text{ kg. Equação 4}$$

$$\text{CLE} = 3,5 \text{ EU/mL}$$

$$\text{MDV} = 3,5 \text{ EU/mL} / 0,005 \text{ EU/mL} = 700$$

5.1.4 Soro Antiescorpiônico

Cálculo do soro antiescorpiônico- dose: 10 ampolas (5 mL/ampola):

CLE = 5 EU/kg / 50 mL/70 kg. Equação 4

CLE = 7,0 EU/mL

MDV = 7,0 EU/mL / 0,005 EU/mL = 1400

5.2 Qualificação inicial

Na qualificação inicial do método cromogênico cinético, os resultados obtidos satisfazem a condição exigida para a validação dos *kits* e equipamento utilizados no ensaio em relação aos parâmetros exigidos em uma curva padrão para a endotoxina (Tabela 1, Quadro 7 e Figura 13).

Tabela 1 - Qualificação inicial: concentrações de endotoxina (EU/mL) utilizadas na curva padrão

Curva-padrão de endotoxina (CSE) (EU/mL)	CV (%)	Especificação*
0,005	4,60	< 10%
0,05	3,87	< 10%
0,5	1,05	< 10%
5	0,31	< 10%
50	1,99	< 10%
Branco	Não reativo	Não reativo

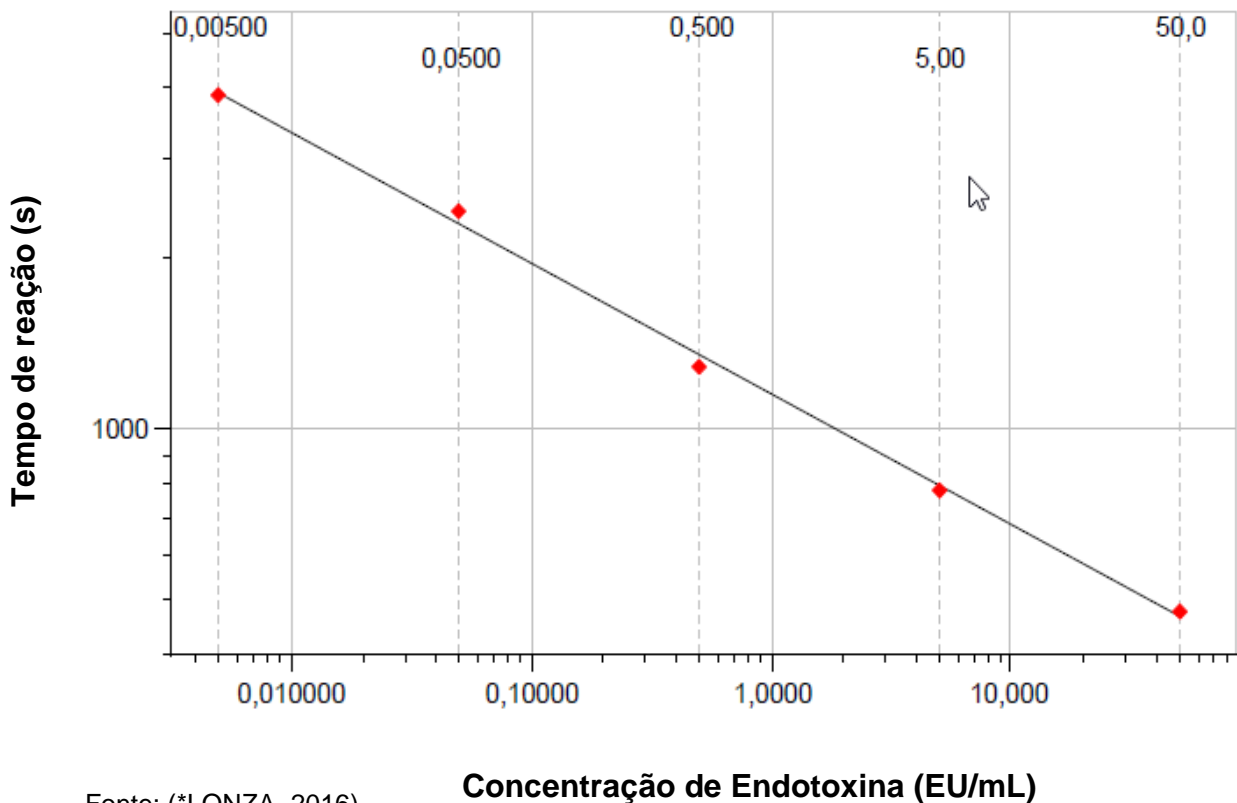
Fonte: * FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014

Quadro 7– Qualificação inicial: parâmetros exigidos para validação da curva-padrão de endotoxina

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,191	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	2,990	2,500 a 3,500

Fonte: (*LONZA, 2016).

Figura 13 - Curva padrão de endotoxina - Qualificação inicial



Fonte: (*LONZA, 2016).

5.3 Linearidade do método

A linearidade do método foi demonstrada através de uma curva padrão de endotoxina (Quadro 8, Tabela 2 e Figura14). Foram utilizadas 5 concentrações de endotoxina em triplicata: 50 EU/mL; 5 EU/mL; 0,5 EU/mL; 0,05 EU/mL e 0,005 EU/mL.

Através do teste de Cochran, verificou-se a homocedasticidade do método, ou seja, a independência da variância das respostas do método com as concentrações das amostras analisadas ($p < 0,0001$). O desvio de linearidade foi não significativo ($p > 0,05$).

Quadro 8 – Parâmetros da curva padrão de endotoxina – Linearidade

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,228	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,021	2,500 a 3,500

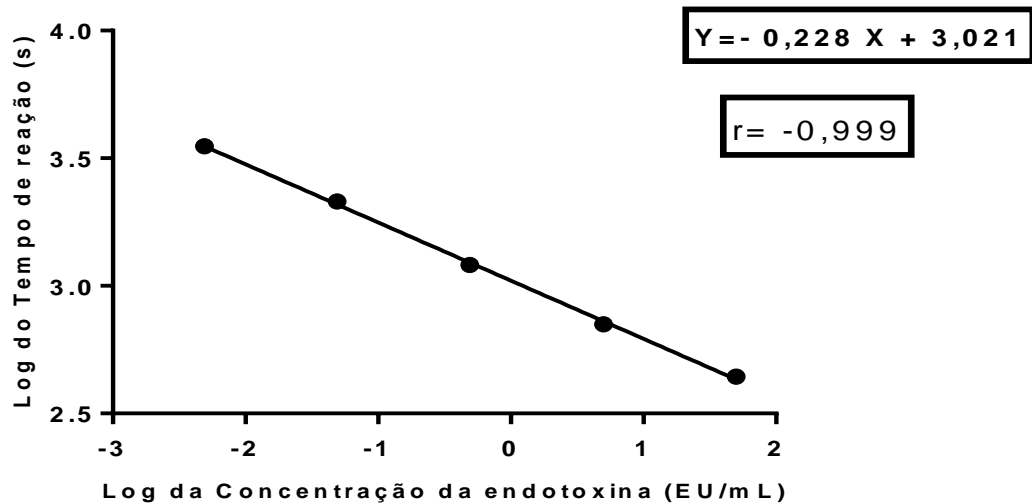
Fonte: (* LONZA, 2016).

Tabela 2 - Tempo de reação (s) de cada concentração em triplicata – Linearidade

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Log da concentração de endotoxina	Tempo de reação de cada concentração em triplicata (s)	Log do tempo de reação de cada triplicata	Média do log das triplicatas (s)
0,005	-2,309804	3453	3,538	3,546
		3479	3,541	
		3626	3,559	
0,05	-1,309804	2106	3,323	3,330
		2115	3,325	
		2198	3,342	
0,5	-0,309804	1164	3,065	3,081
		1176	3,070	
		1287	3,109	
5	0,697229	702	2,846	2,848
		706	2,848	
		710	2,851	
50	1,697578	429	2,632	2,645
		442	2,645	
		454	2,657	

Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 14 - Curva padrão de endotoxina - Linearidade



Fonte: (Do autor, 2017).

Teste de Cochran:

$S^2 = 17404,67 (0,005), 5144,8 (0,05), 9198 (0,5), 32 (5,0), 312,67(50)$. Logo,
 $C_{cal} = 17404,67/32092,14 = 0,542$. Equação 1
 $C_{cal} (0,542) < C_{tab.}(0,684)$

5.4 Inibição-Potencialização - Soro Anticrotálico (lote nº C 02)

No teste de inibição-potencialização para o soro anticrotálico (Quadros 9 e 10, e Tabelas 3 e 4) observa-se que as recuperações do controle positivo do produto (CPP) nas diluições de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 estão de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Europeia para o ensaio de endotoxina bacteriana (LAL), ou seja, a recuperação deve estar compreendida entre 50 a 200%. Tanto o FDA, quanto as Farmacopeias acima citadas não recomendam trabalhar próximo ou na MDV (1:350). Optamos por trabalhar na diluição de 1:10 em nossos estudos, o que nos permite detectar baixas concentrações de endotoxina em amostras de soro anticrotálico. Essa diluição de trabalho (1:10), além de ser uma diluição de segurança, também nos fornece informações mais precisas à cerca da contaminação do produto.

Contudo, em um ensaio de rotina, qualquer diluição abaixo da MVD (1:350) pode ser utilizada.

Quadro 9 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Anticrotálico. Lote nº C 02

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,216	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	2,995	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

* FDA, 1992, USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014.

Tabela 3 - Ensaio de Inibição/Potencialização – Soro Anticrotálico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40) Lote nº C 02

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:2,5	17,27 %	35 %
1:5	0,90 %	78 %
1:10	0,63 %	88 %
1:20	6,85 %	84 %
1:40	4,18 %	81 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV deve ser <10% (FDA, 1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação deve ser de 50% a 200% (USP, 2016)

Quadro 10 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº C 02

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,998	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,205	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,012	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

* LONZA, 2016

Tabela 4 - Ensaio de Inibição/Potencialização – Diluições 1:10; 1:20 e 1:40. Lote nº C 02

Diluição	CV (%) [*]	Recuperação (%) ¹
1:10	0,09 %	97 %
1:10	1,29 %	114 %
1:20	1,67 %	89 %
1:20	2,06 %	88 %
1:40	2,95 %	98 %
1:40	N/A ²	62 %

Fonte: (Do autor, 2017).

^{*}CV (<10%) (FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

²N/A – Não Avaliado

5.5 Seletividade - Soro Anticrotálico (lotes nº C 02, C 04 e C 06)

No teste de seletividade foram testados três lotes do produto (Tabela 5) onde não houve reação do controle negativo (branco) em presença do reagente LAL. O lote C 02 em presença do reagente LAL detectou uma concentração de endotoxina de 0,248 EU/mL, o lote C 04 detectou uma concentração de endotoxina de 0,489 EU/mL e o lote C 06 detectou uma concentração de endotoxina de 0,286 EU/mL, comprovando que apenas endotoxina é detectada e quantificada pelo método LAL QCL-cinético.

Tabela 5 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.

SAC Lote	Diluição	Recuperação (%)	Endotoxina (EU/mL)	Branco
C 02	1:10	102	0,248	Não reativo
C 04	1:10	89	0,489	Não reativo
C 06	1:10	95	0,286	Não reativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,999; Coeficiente angular: -0,216; Interseção com Y: 2,995.

5.6 Precisão - Soro Anticrotálico

5.6.1 Repetitividade (Repetibilidade)

O ensaio apresentou uma ótima repetibilidade do método (precisão intra-corridas), através do experimento realizado em três lotes de SAC, lotes C 02, C 04 e C 06, obtendo-se um CV % de 0,25 %; 1,22 % e 0,29 %, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Repetibilidade (precisão intra-corridas) - soro anticrotálico (lotes nº C 02, C 04 e C 06)

Lote SAC	Tempo de reação (s)	Média do tempo de reação (s)	Desvio padrão	CV %	Especificação
C 02	2401 2409 2397	2402	6,11	0,25	< 10 %
C 04	2280 2335 2298	2304	28,04	1,22	< 10 %
C 06	2406 2401 2392	2399	7,09	0,29	< 10 %

Fonte: (Do autor, 2017).

Coefficiente de correlação: -0,999; Coeficiente angular: -0,216; Interseção com Y: 2,995.

5.6.2 Precisão intermediária (lote nº C 02)

A precisão intermediária do método em relação ao produto soro anticrotálico foi comprovada através do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corridas). Foram realizados ensaios do mesmo lote de SAC comparando-se os resultados de dois analistas diferentes, em dias diferentes (mínimo de dois dias entre as análises) e utilizando-se o mesmo equipamento. Foram realizadas 12 determinações da amostra de SAC (diluição 1:10) para cada analista. Para a avaliação da precisão utilizou-se o tempo de reação de cada determinação para o cálculo do coeficiente de variação (CV%).

Os dados referentes às curvas de endotoxina padrão obtidas pelos analistas 1 e 2 na avaliação da precisão do método são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Log da concentração de endotoxina	Analista 1		Analista 2	
		Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata	Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata
0,005	-2,309804	3866	3,857	3805	3,580
		3990	3601	3955	3,597
		3994	3601	3961	3,598
0,05	-1,309804	2205	3,343	2150	3,332
		2179	3,338	2119	3,326
		2124	3,327	2083	3,319
0,5	-0,309804	1221	3,087	1163	3,066
		1198	3078	1152	3,061
		1197	3,078	1149	3,060
5	0,697229	762	2,882	703	2,847
		748	2874	701	2,846
		741	2,657	681	2,833
50	1,697578	471	2,673	435	2,638
		466	2,668	431	2,634
		454	2,657	416	2,632

Fonte: (Do autor, 2017).

A partir dos dados constantes da Tabela 7, foram obtidos os parâmetros de coeficiente angular (inclinação), interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação (Tabela 8). Os coeficientes angulares das retas dos dois analistas foram extremamente significativos ($p < 0,0001$).

Tabela 8 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2

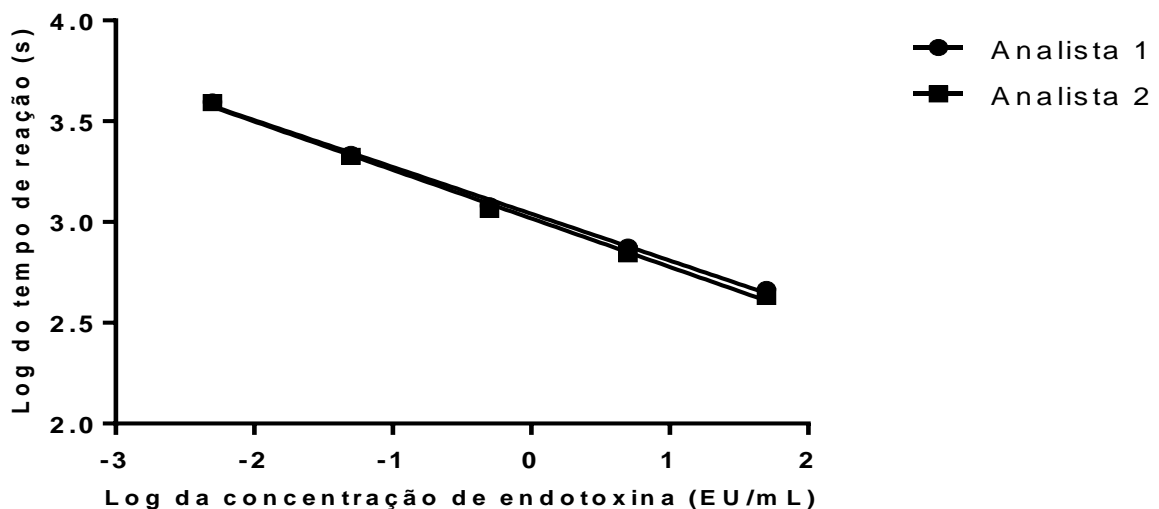
Parâmetros	Analista 1	Analista 2
C. de correlação	-0,998	-0,998
Coeficiente angular	-0,2322	-0,2406
Interseção com o eixo Y	3,041	3,018
Equação da reta	$Y = -0,2322X + 3,041$	$Y = -0,2406X + 3,018$

Fonte: (Do autor, 2017).

$p < 0,0001$ pelo teste ANOVA de regressão linear.

As inclinações ou coeficientes angulares das duas retas obtidas pelos analistas 1 e 2 (Tabela 8 e Figura 15) não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,137$).

Figura15- Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2



Fonte: (Do autor, 2017).

A Tabela 9 mostra o tempo de reação em amostras de soro anticrotálico (lote nº C 03) realizadas por dois analistas diferentes, em dias diferentes e utilizando-se o mesmo equipamento.

Tabela 9 - Tempo de reação em amostra de soro anticrotálico (lote nº C 02) Analista 1 X Analista 2

Analista 1	Analista 2
Tempo de reação (s) ¹	Tempo de reação (s)
2391	2412
2400	2375
2344	2404
2381	2322
2376	2374
2369	2364
2473	2382
2483	2327
2345	2354
2465	2402
2434	2377
2408	2390
Média = 2406	Média = 2374
Desvio padrão = 48,06	Desvio padrão = 28,39
CV (%) = 2,00%	CV (%) = 1,20%

Fonte: (Do autor, 2017).

(s)¹: segundos

A Tabela 10 mostra além dos valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 9, os resultados dos testes de Grubbs para os dois analistas, nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 10 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro anticrotálico (lote nº C 02) pelos analistas 1 e 2

Parâmetros	Analista 1	Analista 2
Valor médio	2406	2374
Desvio padrão	48,06	28,39
Grubbs (menor valor)	${}^1C_{\text{cal.}} (1,29) < {}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,83) < C_{\text{tab.}} (2,41)$
Grubbs (maior valor)	$C_{\text{cal.}} (1,60) < C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,34) < C_{\text{tab.}} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

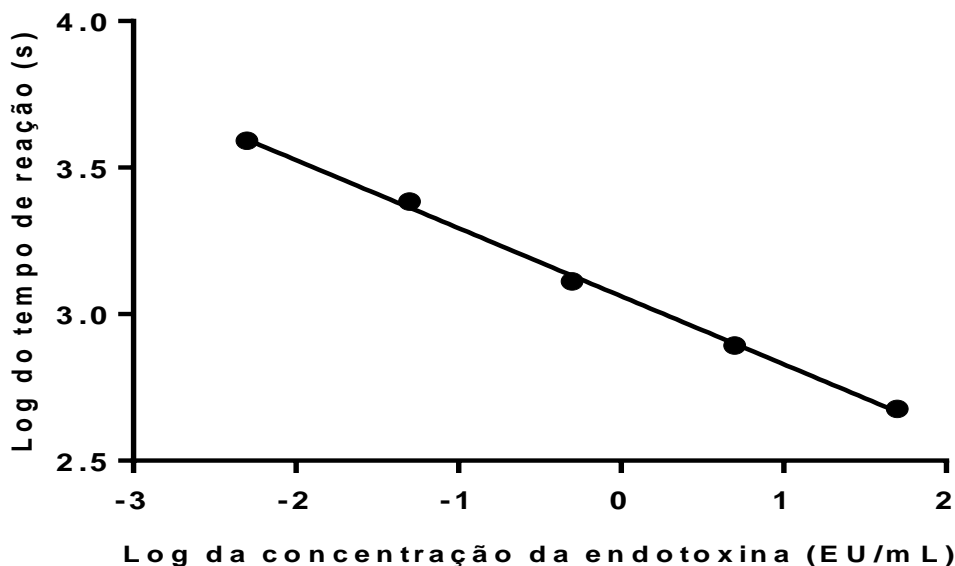
${}^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; ${}^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

As determinações de endotoxina no soro anticrotálico pelos Analistas 1 e 2 (Tabela 7) passaram no teste de normalidade D'Agostino & Pearson, $p = 0,4899$ (Analista 1) e $p = 0,5868$ (Analista 2). A partir da constatação da distribuição normal dos dados, ao se empregar o teste t de *Student*, não se detectou diferenças significativas ($p = 0,0584$) ao se comparar a média dos valores médios de tempo de reação (s) obtidos pelos dois analistas na análise de amostra de soro anticrotálico.

5.7 Exatidão - Soro Anticrotálico (lote nº C 02)

A exatidão foi comprovada através da recuperação de três concentrações conhecidas de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas à amostra de soro anticrotálico. A Figura 16 mostra a curva padrão de endotoxina obtida no ensaio. O Quadro 11 mostra os parâmetros obtidos para a curva padrão de endotoxina. A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações de cada uma das concentrações de endotoxina adicionadas na amostra de soro anticrotálico como mostrado na Tabela 8.

Figura 16 - Curva padrão de endotoxina - Exatidão



Fonte: (Do autor, 2017).

Quadro 11- Parâmetros da curva padrão de endotoxina – Exatidão

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,2322	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,061	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

A inclinação medida pelo coeficiente angular foi altamente significativa ($p < 0,0001$) e o desvio de linearidade pelo *runs test* não foi significativo ($p = 0,9000$).

$$\text{Equação da reta : } Y = -0,2322x + 3,061$$

Tabela 11 - Recuperação das três concentrações de endotoxina (**0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL**) adicionadas ao soro anticrotálico (lote nº C 02) utilizadas no ensaio de Exatidão.

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)
0,05	0,5	5
0,0354	0,448	4,30
0,0355	0,451	4,44
0,0356	0,451	4,45
0,0357	0,460	4,66
0,0357	0,460	4,70
0,0360	0,466	4,70
0,0414	0,511	4,73
0,0419	0,515	4,77
0,0420	0,515	4,83
Média = 0,0377	Média = 0,475	Média = 4,62
Desvio padrão = 0,0031	Desvio padrão = 0,029	Desvio padrão = 0,179

Fonte: (Do autor, 2017).

Recuperação = concentração média experimental / concentração teórica x 100

Recuperação (0,05 EU/mL) = $0,0377 / 0,05 \times 100 = 75,4\%$

Recuperação (0,5 EU/mL) = $0,475 / 0,5 \times 100 = 95\%$ (melhor recuperação)

Recuperação (5 EU/mL) = $4,62 / 5 \times 100 = 92,4\%$

A Tabela 12 mostra os valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 11, para os resultados dos testes de Grubbs das concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro anticrotático (lote nº 135202 D), nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 12 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro anticrotático (lote nº C 02).

Parâmetros	0,05 EU/mL	0,5 EU/mL	5 EU/mL
Valor médio	0,0377	0,475	4,62
Desvio padrão	0,0031	0,029	0,179
Grubbs menor valor	$^1C_{\text{cal.}} (0,74) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	$^1C_{\text{cal.}} (0,93) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	$^1C_{\text{cal.}} (1,8) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$
Grubbs maior valor	$^1C_{\text{cal.}} (1,40) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	$^1C_{\text{cal.}} (1,37) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	$^1C_{\text{cal.}} (1,17) <$ $^2C_{\text{tab.}}(2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

$^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; $^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

O Quadro 12 mostra os resultados obtidos nas análises de 10 lotes de SAC para os ensaios de LAL e Pirogênio. Todas as amostras de SAC foram consideradas satisfatórias no ensaio de pirogênio, pois o somatório das variações individuais de temperatura dos 3 coelhos inoculados com cada um dos 10 lotes de SAC foi inferior a 3,3°C.

Uma correlação significativa ($p= 0,0231$) foi encontrada para o SAC entre as concentrações de endotoxina (EU/mL) determinadas no ensaio de LAL e os somatórios das variações individuais de temperatura no ensaio em coelhos. O coeficiente de correlação Spearman (r_s) obtido foi igual a 0,7038 indicando que a concentração de endotoxina aumenta quando o somatório de variação de temperatura em coelhos aumenta.

Quadro 12 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro anticrotálico

Lote nº	LAL EU/mL	Pirogênio – ($\Sigma T^{\circ}\text{C}$) ¹
C 01	0,268	0,3
C 02	0,248	0,2
C 03	0,229	0,3
C 04	0,489	0,6
C 05	0,273	0,2
C 06	0,286	0,3
C 07	0,395	0,5
C 08	0,305	0,1
C 09	0,334	0,4
C 10	0,692	0,6

Fonte: (Do autor, 2017).

¹Somatório de variações individuais de temperatura de 3 coelhos

5.8 Inibição-Potencialização - Soro Antirrábico (Lote Nº R 06)

No teste de inibição-potencialização para o soro antirrábico (Quadros 13 e 14 e Tabelas 12 e 13) observa-se que as recuperações do controle positivo do produto (CPP) nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:40 estão de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Europeia para o ensaio de endotoxina bacteriana (LAL), ou seja, a recuperação deve estar compreendida entre 50 a 200%. A diluição de 1:40 apresentou um CV% maior que 10% em ambos os ensaios. Optamos por trabalhar na diluição de 1:10 em nossos estudos, o que nos permite detectar baixas concentrações de endotoxina em amostras de soro antirrábico. Essa diluição de trabalho (1:10), além de ser uma diluição de segurança, também nos fornece informações mais precisas à cerca da contaminação do produto. Tanto o FDA, quanto as Farmacóeias acima citadas não recomendam trabalhar próximo ou na MDV (1:4660). Contudo, em um ensaio de rotina, qualquer diluição abaixo da MDV (1:4660) pode ser utilizada.

Quadro 13 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antirrábico lote nº R 06

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,996	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,224	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	2,999	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

* LONZA, 2016

Tabela 13 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antirrábico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40) Lote R 06

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:2,5	2,27 %	7 %
1:5	3,93 %	36 %
1:10	1,39 %	72 %
1:20	7,08 %	76 %
1:40	2,04 %	81 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV deve ser <10% (FDA, 1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

Quadro 14 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº R 06

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,998	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,233	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,031	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

* LONZA

Tabela 14- Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antirrábico (Diluições 1:10; 1:20 e 1:40) Lote R 03

Diluição	CV (%) [*]	Recuperação (%) ¹
1:10	0,24 %	131 %
1:10	0,90 %	113 %
1:20	0,99 %	160 %
1:20	0,62 %	128 %
1:40	18,39 %	122 %
1:40	38,85 %	101 %

Fonte: (Do autor, 2017).

^{*}CV (<10%)(FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

5.9 – Seletividade - Soro Antirrábico (lote nº R 06, R 01 e R 10)

No teste de seletividade foram testados três lotes do produto (Tabela 5) onde não houve reação do controle negativo (branco) em presença do reagente LAL. O lote R 06 em presença do reagente LAL detectou uma concentração de endotoxina de 0,115 EU/mL, o lote R 01 detectou uma concentração de endotoxina de 0,536 EU/mL, e o lote R 10 detectou uma concentração de endotoxina de 0,314 EU/mL, comprovando que apenas endotoxina é detectada e quantificada pelo método LAL QCL-cinético.

Tabela 15 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.

SAR Lote	Diluição	Recuperação (%)	Endotoxina (EU/mL)	Branco
R 06	1:10	86	0,115	Não reativo
R 01	1:10	124	0,536	Não reativo
R 10	1:10	98	0,314	Não reativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,997; Coeficiente angular: -0,206; Interseção com Y: 3,014

5.10 Precisão - Soro Antirrábico

5.10.1 Repetitividade (Repetibilidade)

A repetibilidade (precisão intra-corridas) do método foi demonstrada através do experimento realizado em três lotes de SAR, lotes R 06, R 01 e R 10, obtendo-se um CV % de 0,38 %; 0,64 % e 0,33 %, respectivamente. (Tabela 16).

Tabela 16 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antirrábico (lotes nº R 06, R 01 e R 10.)

Lote SAC	Tempo de reação (s)	Média do tempo de reação (s)	Desvio padrão	CV %	Especificação
R 06	2263 2265 2279	2269	8,72	0,38	< 10 %
R 01	2220 2229 2248	2232	14,29	0,64	< 10 %
R 10	2252 2237 2246	2245	7,55	0,33	< 10 %

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,997; Coeficiente angular: -0,206; Interseção com Y: 3,014

5.10.2 Precisão intermediária (lote nº R 06)

A precisão do método em relação ao produto soro antirrábico foi comprovada através do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corridas). Foram realizados ensaios do mesmo lote de SAR comparando-se os resultados de dois analistas diferentes, em dias diferentes (mínimo de dois dias entre as análises) e utilizando-se o mesmo equipamento. Foram realizadas 12 determinações da amostra de SAR (diluição 1:10) para cada analista. Para a avaliação da precisão utilizou-se o tempo de reação de cada determinação para o cálculo do coeficiente de variação (CV%).

Os dados referentes às curvas de endotoxina padrão obtidas pelos analistas 1 e 2 na avaliação da precisão do método são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Log da concentração de endotoxina	Analista 1		Analista 2	
		Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata	Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata
0,005	-2,309804	3736	3,572	4394	3,643
		3849	3,585	4454	3,649
		3443	3,537	4717	3,674
0,05	-1,309804	2289	3,360	2885	3,460
		2196	3,342	2502	3,398
		2206	3,344	2765	3,442
0,5	-0,309804	1176	3,070	1465	3,166
		1179	3,072	1470	3,167
		1174	3,070	1450	3,161
5	0,697229	691	2,839	873	2,941
		682	2,834	875	2,942
		682	2,834	880	2,944
50	1,697578	431	2,634	518	2,714
		428	2,631	510	2,708
		428	2,631	501	2,700

Fonte: (Do autor, 2017).

A partir dos dados constantes da Tabela 17 foram obtidos os parâmetros de coeficiente angular (inclinação), interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação (Tabela 18). Os coeficientes angulares das retas dos dois analistas foram extremamente significativos ($p < 0,0001$).

Tabela 18 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2

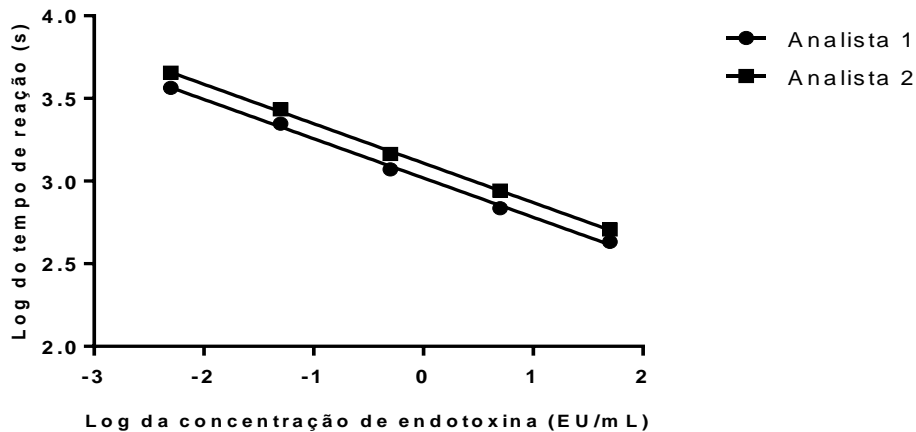
Parâmetros	Analista 1	Analista 2
C. de correlação	-0,998	-0,999
Coeficiente angular	-0,238	-0,239
Interseção com o eixo Y	3,019	3,109
Equação da reta	$Y = -0,2377x + 3,019$	$Y = -0,2387x + 3,109$

Fonte: (Do autor, 2017).

$p < 0,0001$ pelo teste ANOVA de regressão linear

As inclinações ou coeficientes angulares das duas retas obtidas pelos analistas 1 e 2 (Tabela 18 e Figura 17) não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,857$).

Figura 17 - Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2



Fonte: (Do autor, 2017).

A Tabela 19 mostra o tempo de reação em amostras de soro antirrábico (lote nº 155303 A) realizadas por dois analistas diferentes, em dias diferentes e utilizando-se o mesmo equipamento.

Tabela 19 – Tempo de reação em amostras de soro antirrábico (.lote nº R 06) - Analistas 1 X Analista 2

Analista 1	Analista 2
Tempo de reação (s)	Tempo de reação (s)
2249	2268
2265	2249
2250	2248
2220	2232
2222	2239
2260	2216
2240	2267
2277	2228
2253	2266
2215	2271
2216	2243
2267	2253
Média = 2244,5	Média = 2248,3
Desvio padrão = 21,65	Desvio padrão = 17,64
CV (%) = 0,96%	CV (%) = 0,78%

Fonte: (Do autor, 2017).

(s)¹: segundos

A Tabela 20 mostra além dos valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 19, os resultados dos testes de Grubbs para os dois analistas, nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi $<$ do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 20- Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro antirrábico (lote nº R 06) pelos analistas 1 e 2.

Parâmetros	Analista 1	Analista 2
Valor médio	2244,5	2248,3
Desvio padrão	21,65	17,64
Grubbs (menor valor)	${}^1C_{\text{cal.}} (1,36) < {}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,83) < C_{\text{tab.}} (2,41)$
Grubbs (maior valor)	$C_{\text{cal.}} (1,50) < C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,28) < C_{\text{tab.}} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

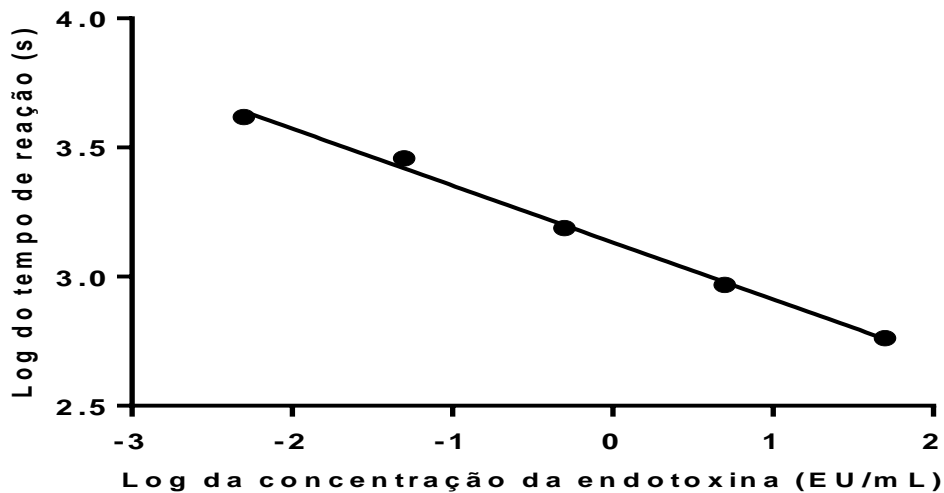
${}^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; ${}^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

As determinações de endotoxina no soro antirrábico pelos Analistas 1 e 2 (Tabela 17) passaram no teste de normalidade D'Agostino & Pearson, $p = 0,3302$ (Analista 1) e $p = 0,8190$ (Analista 2). A partir da constatação da distribuição normal dos dados, ao se empregar o teste t de *Student*, não se detectou diferenças significativas ($p = 0,6391$) ao se comparar a média dos valores médios de tempo de reação (s) obtidos pelos dois analistas na análise de amostra de soro antirrábico.

5.11 Exatidão - Soro Antirrábico (lote nº r 06)

A exatidão foi comprovada através da recuperação de três concentrações conhecidas de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas à amostra de soro antirrábico. A Figura 18 mostra a curva padrão de endotoxina obtida no ensaio. O Quadro 15 mostra os parâmetros obtidos para a curva padrão de endotoxina. A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações de cada uma das concentrações de endotoxina adicionadas na amostra de soro antirrábico como mostrado na Tabela 21.

Figura 18 – Curva padrão de endotoxina - Exatidão



Fonte: (Do autor, 2017).

Quadro 15- Parâmetros da curva padrão de endotoxina – Exatidão

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,997	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,220	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,133	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

A inclinação medida pelo coeficiente angular foi altamente significativa ($p < 0,0001$) e o desvio de linearidade pelo *runs test* não foi significativo ($p = 0,9000$).

Equação da reta: $Y = -0,2202x + 3,133$.

Tabela 21- Recuperação das três concentrações de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antirrábico (lote nº R 06) utilizadas no ensaio de Exatidão.

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)
0,05	0,5	5
0,049	0,591	3,48
0,048	0,576	3,51
0,046	0,576	3,42
0,037	0,464	6,15
0,037	0,462	6,08
0,035	0,472	6,09
0,037	0,464	4,70
0,036	0,460	4,50
0,034	0,450	4,40
Média = 0,039	Média = 0,502	Média = 4,70
Desvio padrão = 0,0059	Desvio padrão = 0,060	Desvio padrão = 1,15

Fonte: (Do autor, 2017).

Recuperação = concentração média experimental / concentração teórica x 100

Recuperação (0,05 EU/mL) = 0,039 / 0,05 x 100 = 78%

Recuperação (0,5 EU/mL) = 0,502 / 0,5 x 100 = 100,4% (melhor recuperação)

Recuperação (5 EU/mL) = 4,70 / 5 x 100 = 94%

A Tabela 22 mostra os valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 21, para os resultados dos testes de Grubbs das concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antirrábico (lote nº R 06)), nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 22 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antirrábico (lote nº R 06).

Parâmetros	0,05 EU/mL	0,5 EU/mL	5 EU/mL
Valores médios	0,039	0,502	4,70
Desvio padrão	0,0059	0,060	1,15
Grubbs menor valor	${}^1C_{\text{cal.}} (0,85) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (0,87) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,11) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$
Grubbs maior valor	${}^1C_{\text{cal.}} (1,7) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,48) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,26) <$ ${}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

${}^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; ${}^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

O Quadro 16 mostra os resultados obtidos nas análises de 10 lotes de SAR para os ensaios de LAL e Pirogênio. Todas as 10 amostras de SAR foram consideradas satisfatórias quanto ao ensaio de pirogênio. Os somatórios das variações individuais de temperatura de 3 coelhos inoculados com os 7 lotes de SAR (R01, R02, R06 a R10) e dos 8 animais quando houve repetição do ensaio (R03 a R05) foram inferiores a 3,3°C.

Uma correlação altamente significativa ($p= 0,0005$) foi encontrada para o SAR entre as concentrações de endotoxina (EU/mL) determinadas no ensaio de LAL e os somatórios das variações individuais de temperatura no ensaio em coelhos. O coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido foi igual a 0,8954 indicando que a

concentração de endotoxina aumenta quando o somatório de variação de temperatura em coelhos aumenta.

Quadro 16 - Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antirrábico

Lote nº	LAL EU/mL	Pirogênio - Σ T°C
R 01	0,536	0,3
R 02	0,368	0,4
R 03	1,140	2,9 ¹
R 04	0,828	1,9 ¹
R 05	0,780	1,6 ¹
R 06	0,115	0,2
R 07	0,395	0,4
R 08	0,625	0,3
R 09	0,625	0,7
R 10	0,314	0,2

Fonte: (Do autor, 2017).

¹ Σ = 8 animais

5.12 Inibição-Potencialização - Soro Antitetânico (lote nº T 01)

No teste de inibição-potencialização para o soro antitetânico (Quadros 17 e 18 e Tabelas 23 e 24) observa-se que as recuperações do controle positivo do produto (CPP) nas diluições de 1:10, 1:25 e 1:50 estão de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Europeia para o ensaio de endotoxina bacteriana (LAL), ou seja, a recuperação deve estar compreendida entre 50 a 200%. A diluição de 1:50 apresentou um CV% maior que 10% em uma determinação e N/A (Não Avaliado) na outra. Optamos por trabalhar na diluição de 1:10 em nossos estudos, o que nos permite detectar baixas concentrações de endotoxina em amostras de soro antitetânico. Essa diluição de trabalho (1:10), além de ser uma diluição de segurança, também nos fornece informações mais precisas à cerca da contaminação do produto. Tanto o FDA, quanto as Farmacopeias acima citadas não recomendam trabalhar próximo ou na MDV (1:700). Contudo, em um ensaio de rotina, qualquer diluição abaixo da MDV (1:700) pode ser utilizada.

Quadro 17- Ensaio de Inibição/Potencialização.Soro Antitetânico Lote nº T 01

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,216	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,049	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 23- Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antitetânico (Diluições 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:25 e 1:50) Lote T 01

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:2,5	8,86 %	2 %
1:5	1,55 %	8 %
1:10	0,90 %	134 %
1:25	0,65 %	162 %
1:50	0,82 %	199 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV (<10%) (FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

Quadro 18 - Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº T 01

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,999	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,232	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,048	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 24 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antitetânico (Diluições 1:10; 1:25; 1:50) Lote T 01

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:10	0,56 %	102 %
1:10	0,89 %	90 %
1:25	0,45 %	140 %
1:25	0,05 %	133 %
1:50	33,92 %	99 %
1:50	N/A	53 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV (<10%) (FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

²N/A – Não Avaliado

5.13 Seletividade – Soro Antitetânico (lote nº T 01, T 02 e T 03)

No teste de seletividade foram testados três lotes do produto (Tabela 23) onde não houve reação do controle negativo (branco) em presença do reagente LAL. O lote T 02 em presença do reagente LAL detectou uma concentração de endotoxina de 0,779 EU/mL, o lote T 01 detectou uma concentração de endotoxina de 0,578 EU/mL, e o lote T 03 detectou uma concentração de endotoxina de 0,176 EU/mL, comprovando que apenas endotoxina é detectada e quantificada pelo método LAL QCL-cinético

Tabela 25- Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.

SAT Lote	Diluição	Recuperação (%)	Endotoxina (EU/mL)	Branco
T 02	1:10	85	0,779	Não reativo
T 01	1:10	92	0,578	Não reativo
T 03	1:10	90	0,176	Não reativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,998; Coeficiente angular: -0,224; Interseção com Y: 3,117

5.14 Precisão - Soro Antitetânico

5.14.1 Repetitividade (Repetibilidade)

A repetibilidade (precisão intra-corridas) do método foi demonstrada através do experimento realizado em três lotes de SAT, lotes T 01, T02 e T 03, obtendo-se um CV % de 1,22 %; 1,15 % e 0,56 %, respectivamente.(Tabela 26).

Tabela 26 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antitetânico (lotes nº T 01, T 02 e T 03)

Lote SAC	Tempo de reação (s)	Média do tempo de reação (s)	Desvio padrão	CV %	Especificação
T 01	1978	1951	23,81	1,22	< 10 %
	1942				
	1933				
T 02	1988	1962	22,60	1,15	< 10 %
	1951				
	1947				
T 03	1989	1977	11,06	0,56	< 10 %
	1976				
	1967				

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,998; Coeficiente angular: -0,224; Interseção com Y: 3,117

5.14.2 Precisão intermediária (lote nº T 01)

A precisão do método em relação ao produto soro antitetânico foi comprovada através do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corridas). Foram realizados ensaios do mesmo lote de SAT comparando-se os resultados de dois analistas diferentes, em dias diferentes (mínimo de dois dias entre as análises) e utilizando-se o mesmo equipamento. Foram realizadas 12 determinações da amostra de SAT (diluição 1:10) para cada analista. Para a avaliação da precisão utilizou-se o tempo de reação de cada determinação para o cálculo do coeficiente de variação (CV%).

Os dados referentes às curvas de endotoxina padrão obtidas pelos analistas 1 e 2 na avaliação da precisão do método são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27 – Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Log da concentração de endotoxina	Analista 1		Analista 2	
		Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata	Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata
0,005	-2,309804	3563	3,551	4065	3,609
		3571	3,552	4172	3,620
		3119	3,494	3775	3,576
0,05	-1,309804	2191	3,340	2345	3,370
		2163	3,335	2271	3,356
		2159	3,334	2294	3,360
0,5	-0,309804	1214	3,084	1309	3,116
		1193	3,077	1296	3,112
		1192	3,076	1279	3,106
5	0,697229	701	2,845	771	2,887
		694	2,841	755	2,877
		691	2,839	748	2,873
50	1,697578	469	2,671	630	2,799
		461	2,663	441	2,644
		452	2,655	447	2,650

Fonte: (Do autor, 2017).

A partir dos dados constantes da Tabela 27, foram obtidos os parâmetros de coeficiente angular (inclinação), interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação (Tabela 28). Os coeficientes angulares das retas dos dois analistas foram extremamente significativos ($p < 0,0001$).

Tabela 28 – Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2

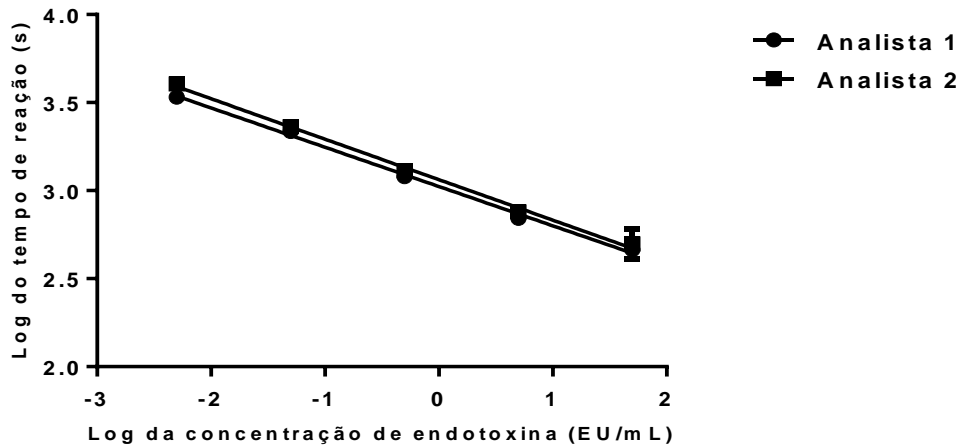
Parâmetros	Analista 1	Analista 2
C. de correlação	-0,997	-0,993
Coeficiente angular	-0,2231	-0,2298
Interseção com o eixo Y	3,023	3,062
Equação da reta	$Y = -0,2231x + 3,023$	$Y = -0,2298x + 3,062$

Fonte: (Do autor, 2017).

$p < 0,0001$ pelo teste ANOVA de regressão linear

As inclinações ou coeficientes angulares das duas retas obtidas pelos analistas 1 e 2 (Tabela 28 e Figura 19) não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,894$).

Figura 19- Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2



Fonte: (Do autor, 2017).

A Tabela 29 mostra o tempo de reação em amostras de soro antitetânico (lote nº T 01) realizadas por dois analistas diferentes, em dias diferentes e utilizando-se o mesmo equipamento.

Tabela 29– Tempo de reação em amostras de soro antitetânico (lote nº T 01). Analistas 1 X Analista 2.

Analista 1 Tempo de reação (s)	Analista 2 Tempo de reação (s)
1973	1938
1936	1962
1925	1899
1980	1941
1969	1918
1940	1913
1882	1913
1881	1892
1891	1888
1924	1980
1932	1983
1935	1976
Média = 1930,7	Média = 1934
Desvio padrão = 33,46	Desvio padrão = 34,86
CV (%) = 1,73	CV (%) = 1,80

Fonte: (Do autor, 2017).

(s)¹: segundos

A Tabela 30 mostra além dos valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 29, os resultados dos testes de Grubbs para os dois analistas, nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi $<$ do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 30- Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra soro antitetânico (lote nº T 01) pelos analistas 1 e 2.

Parâmetros	Analista 1	Analista 2
Valor médio	1930,7	1934
Desvio padrão	33,46	34,86
Grubbs (menor valor)	${}^1C_{\text{cal.}} (1,49) < {}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,32) < C_{\text{tab.}} (2,41)$
Grubbs (maior valor)	$C_{\text{cal.}} (1,47) < C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,40) < C_{\text{tab.}} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

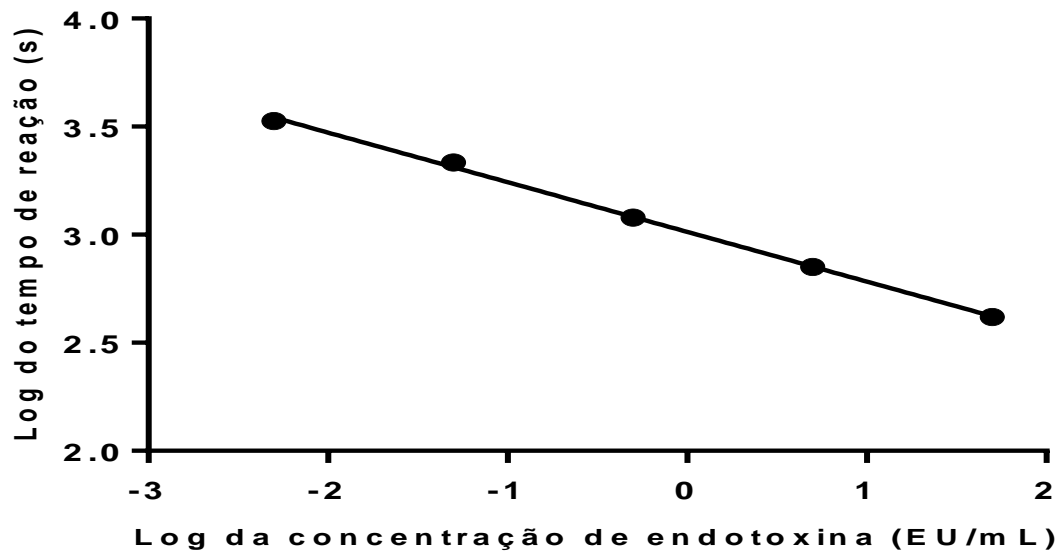
${}^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; ${}^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

As determinações de endotoxina no soro antitetânico pelos Analistas 1 e 2 (Tabela 27) passaram no teste de normalidade D'Agostino & Pearson, $p = 0,7914$ (Analista 1) e $p = 0,2372$ (Analista 2). A partir da constatação da distribuição normal dos dados, ao se empregar o teste t de *Student*, não se detectou diferenças significativas ($p = 0,8363$) ao se comparar a média dos valores médios de tempo de reação (s) obtidos pelos dois analistas na análise de amostra de soro antitetânico.

5.15 Exatidão - Soro Antitetânico (lote nº T 01)

A exatidão foi comprovada através da recuperação de três concentrações conhecidas de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas à amostra de soro antitetânico. A Figura 20 mostra a curva padrão de endotoxina obtida no ensaio. O Quadro 19 mostra os parâmetros obtidos para a curva padrão de endotoxina. A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações de cada uma das concentrações de endotoxina adicionadas na amostra de soro antitetânico como mostrado na Tabela 31

Figura 20 – Curva padrão de endotoxina - Exatidão



Fonte: (Do autor, 2017).

Quadro 19- Parâmetros da curva padrão de endotoxina - Exatidão

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,998	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,2297	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,013	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

A inclinação medida pelo coeficiente angular foi altamente significativa ($p < 0,0001$) e o desvio de linearidade pelo *runs test* não foi significativo ($p = 1,0000$).

Equação da reta: $Y = -0,2297x + 3,013$.

Tabela 31- Recuperação das três concentrações de endotoxina (**0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL**) adicionadas ao soro antitetânico (lote nº T 01). utilizadas no ensaio de Exatidão.

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)
0,05	0,5	5
0,060	0,511	8,34
0,049	0,497	8,29
0,059	0,493	7,91
0,032	0,454	5,52
0,032	0,465	5,32
0,031	0,462	5,11
0,027	0,490	4,78
0,027	0,484	4,73
0,028	0,486	5,02
Média = 0,038	Média = 0,482	Média = 6,11
Desvio padrão = 0,0137	Desvio padrão = 0,0185	Desvio padrão = 1,57

Fonte: (Do autor, 2017).

Recuperação = concentração média experimental / concentração teórica x 100

Recuperação (0,05 EU/mL) = $0,038 / 0,05 \times 100 = 76\%$

Recuperação (0,5 EU/mL) = $0,482 / 0,5 \times 100 = 96,4\%$ (melhor recuperação)

Recuperação (5 EU/mL) = $6,11 / 5 \times 100 = 122,2\%$

A Tabela 32 mostra os valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 31, para os resultados dos testes de Grubbs das concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas soro antitetânico (lote nº T 01), nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 32 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antitetânico (lote nº T 01)

Parâmetros	0,05 EU/mL	0,5 EU/mL	5 EU/mL
Valores médios	0,038	0,482	6,11
Desvio padrão	0,0137	0,0185	1,57
Grubbs menor valor	${}^1C_{cal.} (0,80) < {}^2C_{tab.} (2,41)$	${}^1C_{cal.} (1,51) < {}^2C_{tab.} (2,41)$	${}^1C_{cal.} (0,88) < {}^2C_{tab.} (2,41)$
Grubbs maior valor	${}^1C_{cal.} (1,60) < {}^2C_{tab.} (2,41)$	${}^1C_{cal.} (1,56) < {}^2C_{tab.} (2,41)$	${}^1C_{cal.} (1,42) < {}^2C_{tab.} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

${}^1C_{cal.}$: C calculado; ${}^2C_{tab.}$: C tabelado para $p=0,05$

O Quadro 20 mostra os resultados obtidos nas análises de 10 lotes de SAT para os ensaios de LAL e Pirogênio. Todas as 10 amostras de SAR foram consideradas satisfatórias quanto ao ensaio de pirogênio. Os somatórios das variações individuais de temperatura de 3 coelhos inoculados com os 8 lotes de SAT (T01 a T03, T06 a T10) e dos 8 animais quando houve repetição do ensaio (T04 e T05) foram inferiores a 3,3°C.

Uma correlação altamente significativa ($p < 0,0001$) foi encontrada para o SAT entre as concentrações de endotoxina (EU/mL) determinadas no ensaio de LAL e os somatórios das variações individuais de temperatura no ensaio em coelhos. O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) obtido foi igual a 0,9451 indicando que a concentração de endotoxina aumenta quando o somatório de variação de temperatura em coelhos aumenta.

Quadro 20 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antitetânico

Lote nº	LAL EU/mL	Pirogênio - $\Sigma T^\circ\text{C}$
T 01	0,578	0,4
T 02	0,779	0,7
T 03	0,176	0,2
T 04	1,84	1,7 ¹
T 05	1,65	2,4 ¹
T 06	0,492	0,6
T 07	0,127	0,2
T 08	0,309	0,3
T 09	0,463	0,5
T 10	0,285	0,3

Fonte: (Do autor, 2017).

¹ Σ = 8 animais

5.16 Inibição-Potencialização - Soro Antiescorpiônico (lote nº E 03)

No teste de inibição-potencialização para o soro antiescorpiônico (Quadros 21 e 22 e Tabelas 30 e 31) observa-se que as recuperações do controle positivo do produto (CPP) nas diluições de 1:50 e 1:100 estão de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Europeia para o ensaio de endotoxina bacteriana (LAL), ou seja, a recuperação deve estar compreendida entre 50 a 200%. A diluição de 1:25 apresentou uma recuperação dentro do limite preconizado (50 a 200 %), contudo, em uma das determinações houve uma variação do CV% maior que 10%. Optamos por trabalhar na diluição de 1:100 em nossos estudos, visto que, em todas as determinações foi a diluição que mais se aproximou de 100 % de recuperação. Tanto o FDA, quanto as Farmacopeias acima citadas não recomendam trabalhar próximo ou na MDV (1:1400). Contudo, em um ensaio de rotina, qualquer diluição abaixo da MDV (1:1400) pode ser utilizada.

Quadro 21 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações*
Coeficiente de Correlação	-0,997	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,229	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	2,976	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

* LONZA, 2016

Tabela 33 Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico (Diluições 1:5; 1:10; 1:25, 1:50 e 1:100) Lote E 03

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:5	0,31 %	3 %
1:10	25,04 %	39 %
1:25	3,39 %	103 %
1:50	0,69 %	102 %
1:100	3,53 %	104 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV deve ser <10%(FDA, 1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

Quadro 22- Parâmetros da curva padrão de Inibição/Potencialização. Lote nº E 03

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,997	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,218	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,058	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 34 - Ensaio de Inibição/Potencialização - Soro Antiescorpiônico (Diluições 1:25; 1:50 e 1:100) Lote E 03

Diluição	CV (%)*	Recuperação (%) ¹
1:25	2,04 %	87 %
1:25	10,60 %	59 %
1:50	1,66 %	86 %
1:50	1,76 %	71 %
1:100	1,26 %	88 %
1:100	0,64 %	118 %

Fonte: (Do autor, 2017).

*CV (<10%)(FDA,1992; USP, 2016 e Farmacopeia Europeia, 2014)

¹Recuperação (50 a 200%) (USP, 2016)

5.17 Seletividade – Soro Antiescorpiônico (lote nº E 01, E 02 e E 03)

No teste de seletividade foram testados três lotes do produto (Tabela 32) onde não houve reação do controle negativo (branco) em presença do reagente LAL. O lote E 01 em presença do reagente LAL detectou uma concentração de endotoxina de 0,711 EU/mL, o lote E 02 detectou uma concentração de endotoxina de 0,615 EU/mL, e o lote E 03 detectou uma concentração de endotoxina de 0,190 EU/mL, comprovando que apenas endotoxina é detectada e quantificada pelo método LAL QCL-cinético.

Tabela 35 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Seletividade.

SAT Lote	Diluição	Recuperação (%)	Endotoxina (EU/mL)	Branco
E 01	1:100	105	0,711	Não reativo
E 02	1:100	112	0,615	Não reativo
E 03	1:100	89	0,190	Não reativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Coeficiente de correlação: -0,999; Coeficiente angular: -0,246; Interseção com Y: 3,030

5.18 Precisão - Soro Antiescorpiônico

5.18.1 Repetitividade (Repetibilidade)

A repetibilidade (precisão intra-corridas) do método foi demonstrada através do experimento realizado em três lotes de SAE lotes E 01, E 02 e E 03, obtendo-se um CV % de 0,91 %; 0,30 % e 0,93 %, respectivamente.(Tabela 36).

Tabela 36 – Repetibilidade (precisão intra-corridas) - Soro Antiescorpiônico (lotes nº E 01, E 02 e E 03)

Lote SAC	Tempo de reação (s)	Média do tempo de reação (s)	Desvio padrão	CV %	Especificação
E 01	2910 2860 2871	2880	26,27	0,91	< 10 %
E 02	2901 2887 2885	2891	8,71	0,30	< 10 %
E 03	2924 2872 2910	2902	26,90	0,93	< 10 %

Fonte: (Do autor, 2017).

Coefficiente de correlação: -0,999; Coeficiente angular: -0,246; Interseção com Y: 3,030

5.18.2 Precisão intermediária (lote nº E 03)

A precisão do método em relação ao produto soro antiescorpiônico foi comprovada através do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corridas). Foram realizados ensaios do mesmo lote de SAE comparando-se os resultados de dois analistas diferentes, em dias diferentes (mínimo de dois dias entre as análises) e utilizando-se o mesmo equipamento. Foram realizadas 12 determinações da amostra de SAE (diluição 1:100) para cada analista. Para a avaliação da precisão utilizou-se o

tempo de reação de cada determinação para o cálculo do coeficiente de variação (CV%).

Os dados referentes às curvas de endotoxina padrão obtidas pelos analistas 1 e 2 na avaliação da precisão do método são mostrados na Tabela 37.

Tabela 37 – Comparação entre as análises de endotoxina padrão (Analista 1 X Analista 2)

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Log da concentração de endotoxina	Analista 1		Analista 2	
		Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata	Tempo de reação de cada concentração em triplicata	Log do tempo de reação de cada triplicata
0,005	-2,309804	3373	3,528	3430	3,535
		3425	3,534	3533	3,548
		3348	3,524	3168	3,500
0,05	-1,309804	2389	3,378	2290	3,359
		2368	3,374	2266	3,355
		2333	3,367	2283	3,358
0,5	-0,309804	1389	3,142	1221	3,086
		1372	3,137	1204	3,080
		1387	3,142	1205	3,080
5	0,697229	795	2,900	757	2,879
		791	2,898	732	2,864
		787	2,884	727	2,861
50	1,697578	480	2,681	451	2,654
		471	2,673	431	2,634
		467	2,669	431	2,634

Fonte: (Do autor, 2017).

A partir dos dados constantes da Tabela 37 foram obtidos os parâmetros de coeficiente angular (inclinação), interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação (Tabela 38). Os coeficientes angulares das retas dos dois analistas foram extremamente significativos ($p < 0,0001$).

Tabela 38 - Parâmetros de coeficiente angular, interseção com eixo Y (coeficiente linear) e coeficiente de correlação: Analista 1 / Analista 2

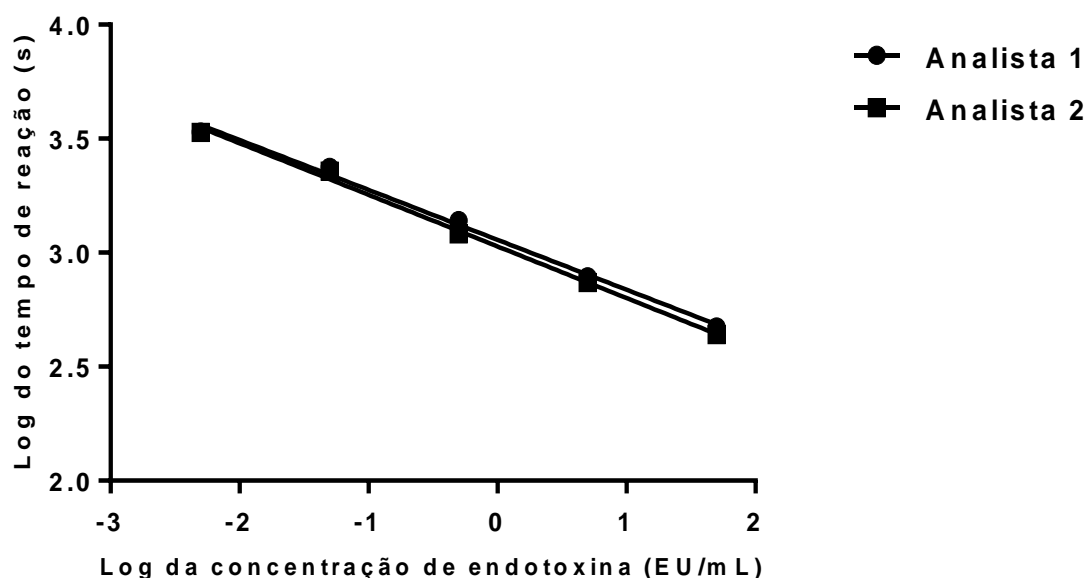
Parâmetros	Analista 1	Analista 2
C. de correlação	-0,997	-0,997
Coeficiente angular	-0,2188	-0,2264
Interseção com o eixo Y	3,057	3,027
Equação da reta	$Y = -0,2188x + 3,057$	$Y = -0,2264x + 3,027$

Fonte: (Do autor, 2017).

$p < 0,0001$ pelo teste ANOVA de regressão linear

As inclinações ou coeficientes angulares das duas retas obtidas pelos analistas 1 e 2 (Tabela 38 e Figura 21) não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,238$).

Figura 21 - Inclinação das curvas de endotoxina padrão – Analista 1 / Analista 2



Fonte: (Do autor, 2017).

A Tabela 39 mostra o tempo de reação em amostras soro antiescorpiônico (lote nº E 03), realizadas por dois analistas diferentes, em dias diferentes e utilizando-se o mesmo equipamento.

Tabela 39 – Tempo de reação em amostras de soro antiescorpiônico (lote nº E 03).

Analistas 1 X Analista 2.

Analista 1	Analista 2
Tempo de reação (s)	Tempo de reação (s)
2859	2865
2816	2819
2842	2891
2923	2863
2866	2829
2925	2857
2916	2768
2865	2803
2956	2803
2856	3058
2875	3083
2836	3014
Média = 2878	Média = 2888
Desvio padrão = 42,46	Desvio padrão = 105,32
CV (%) = 1,48%	CV (%) = 3,65%

Fonte: (Do autor, 2017).

(s)¹: segundos

A Tabela 40 mostra além dos valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 39, os resultados dos testes de Grubbs para os dois analistas, nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 40 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs referentes aos tempos de reação obtidos para a amostra de soro antiescorpiônico (lote nº E 03) pelos analistas 1 e 2

Parâmetros	Analista 1	Analista 2
Valor médio	2878	2888
Desvio padrão	42,46	105,32
Grubbs (menor valor)	${}^1C_{\text{cal.}} (1,46) < {}^2C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,14) < C_{\text{tab.}} (2,41)$
Grubbs (maior valor)	$C_{\text{cal.}} (1,84) < C_{\text{tab.}} (2,41)$	$C_{\text{cal.}} (1,85) < C_{\text{tab.}} (2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

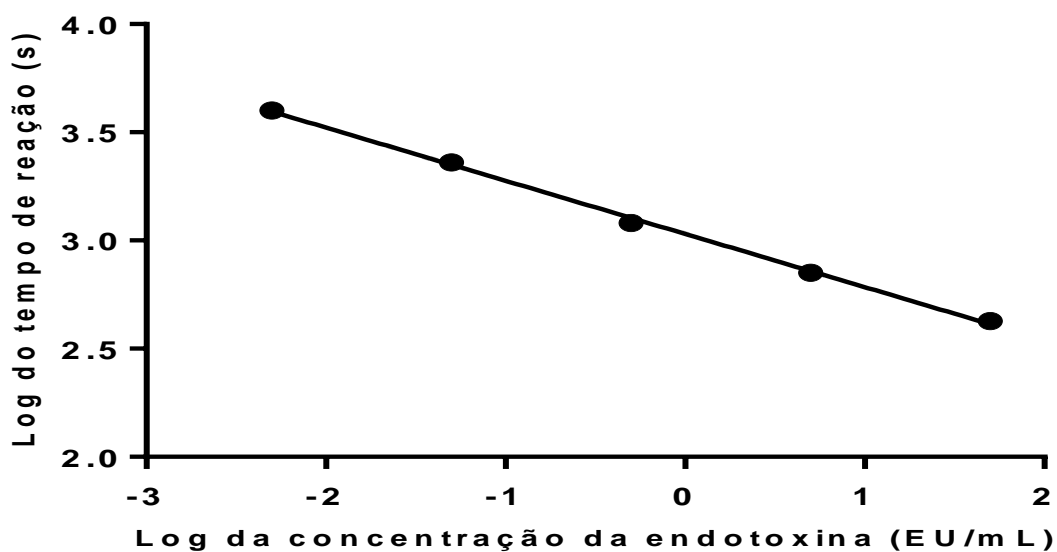
¹ $C_{\text{cal.}}$: C calculado; ² $C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

As determinações de endotoxina no soro antiescorpiônico pelos Analistas 1 e 2 (Tabela 37) passaram no teste de normalidade D'Agostino & Pearson, $p = 0,6290$ (Analista 1) e $p = 0,2746$ (Analista 2). A partir da constatação da distribuição normal dos dados, ao se empregar o teste t de *Student*, não se detectou diferenças significativas ($p = 0,7670$) ao se comparar a média dos valores médios de tempo de reação (s) obtidos pelos dois analistas na análise de amostra de soro antiescorpiônico (1:100).

5.19 Exatidão – Soro Antiescorpiônico (lote nº E 03)

A exatidão foi comprovada através da recuperação de três concentrações conhecidas de endotoxina (0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas à amostra de soro antiescorpiônico. A Figura 22 mostra a curva padrão de endotoxina obtida no ensaio. O Quadro 23 mostra os parâmetros obtidos para a curva padrão de endotoxina. A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações de cada uma das concentrações de endotoxina adicionadas na amostra de soro antiescorpiônico como mostrado na Tabela 41.

Figura 22 – Curva padrão de endotoxina - Exatidão



Fonte: (Do autor, 2017).

Quadro 23- Parâmetros da curva padrão de endotoxina - Exatidão

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,998	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,246	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	3,030	2,500 a 3,500

Fonte: (Do autor, 2017).

A inclinação medida pelo coeficiente angular foi altamente significativa ($p < 0,0001$) e o desvio de linearidade pelo *runs test* não foi significativo ($p = 0,5000$).

Equação da reta: $Y = -0,246x + 3,030$.

Tabela 41 - Recuperação das três concentrações de endotoxina (**0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL e 5 EU/mL**) adicionadas ao soro antiescorpiônico (lote nº E 03) utilizadas no ensaio de Exatidão.

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)
0,05	0,5	5
0,039	0,442	6,44
0,040	0,436	6,30
0,039	0,447	6,07
0,042	0,535	5,25
0,043	0,616	5,18
0,043	0,618	5,08
0,045	0,379	4,61
0,046	0,376	4,58
0,045	0,370	4,50
Média = 0,042	Média = 0,469	Média = 5,33
Desvio padrão = 0,0026	Desvio padrão = 0,0981	Desvio padrão = 0,7568

Fonte: (Do autor, 2017).

Recuperação = concentração média experimental / concentração teórica x 100

Recuperação (0,05 EU/mL) = $0,042 / 0,05 \times 100 = 84\%$

Recuperação (0,5 EU/mL) = $0,469 / 0,5 \times 100 = 93,8\%$ (melhor recuperação)

Recuperação (5 EU/mL) = $5,33 / 5 \times 100 = 106,6\%$

A Tabela 42 mostra os valores médios e desvios padrões dos dados constantes da Tabela 41, para os resultados dos testes de Grubbs das concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antiescorpionico (lote nº 166002 C), nos quais não se detectou nenhum valor discrepante, pois o $C_{\text{calculado}}$ foi. < do que o C_{tabelado} para $p=0,05$.

Tabela 42 - Valores médios, desvio padrão e resultados do teste de Grubbs para as concentrações de endotoxina (0,5 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas ao soro antiescorpionico (lote nº E 03)

Parâmetros	0,05 EU/mL	0,5 EU/mL	5 EU/mL
Valores médios	0,042	0,469	5,33
Desvio padrão	0,0026	0,0981	0,7568
Grubbs menor valor	${}^1C_{\text{cal.}} (1,15) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,01) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,09) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$
Grubbs maior valor	${}^1C_{\text{cal.}} (1,54) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,52) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$	${}^1C_{\text{cal.}} (1,46) < {}^2C_{\text{tab.}}(2,41)$

Fonte: (Do autor, 2017).

${}^1C_{\text{cal.}}$: C calculado; ${}^2C_{\text{tab.}}$: C tabelado para $p=0,05$

O Quadro 24 mostra os resultados obtidos nas análises de 10 lotes de SAE para os ensaios de LAL e Pirogênio. Todas as 10 amostras de SAE foram consideradas satisfatórias quanto ao ensaio de pirogênio. Os somatórios das variações individuais de temperatura dos 3 coelhos inoculados com os 10 lotes de SAE foram inferiores a 3,3°C.

Uma correlação altamente significativa ($p= 0,0004$) foi encontrada para o SAE entre as concentrações de endotoxina (EU/mL) determinadas no ensaio de LAL e os somatórios das variações individuais de temperatura no ensaio em coelhos. O coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido foi igual a 0,9012 indicando que a concentração de endotoxina aumenta quando o somatório de variação de temperatura em coelhos aumenta.

Quadro 24 – Correlação dos resultados do ensaio de LAL e Pirogênio para o soro antiescorpionico

Lote nº	LAL EU/mL	Pirogênio – ($\Sigma T^{\circ}\text{C}$) ¹
E 01	0,711	0,8
E 02	0,615	0,6
E 03	0,190	0,2
E 04	0,216	0,3
E 05	0,401	0,6
E 06	0,301	0,2
E 07	0,462	0,5
E 08	0,748	0,8
E 09	0,436	0,3
E 10	0,385	0,3

Fonte: (Do autor, 2017).

¹Somatório de variações individuais de temperatura de 3 coelhos

6 DISCUSSÃO

As concentrações de endotoxinas, calculadas teoricamente, provaram ser na prática adequadas concentrações limites para a detecção de endotoxinas nos soros anticrotálico, antirrábico, antitetânico e antiescorpiônico. As determinações das concentrações de endotoxinas obtidas em todos os experimentos, para todos os soros, ao longo dos processos de validação, foram compatíveis com os limites de endotoxina dos respectivos soros, soro anticrotálico (1,75 EU/mL); soro antirrábico (23,3 EU/mL); soro antitetânico (3,5 EU/mL) e soro antiescorpiônico (7,0 EU/mL). O soro anticrotálico, para o teste de pirogênio, apresentou no somatório da variação de temperatura de cada coelho, uma faixa variando entre 0,1°C a 0,6°C, enquanto que a concentração de endotoxina variou de 0,229 EU/mL a 0,692 EU/mL. O soro antirrábico para o teste de pirogênio, apresentou no somatório da variação de temperatura de cada coelho, uma faixa variando entre 0,2°C a 2,9°C, enquanto que a concentração de endotoxina variou de 0,115 EU/mL a 1,140 EU/mL. O soro antitetânico para o teste de pirogênio, apresentou no somatório da variação de temperatura de cada coelho, uma faixa variando entre 0,2°C a 2,4°C, enquanto que a concentração de endotoxina variou de 0,127 EU/mL a 1,84 EU/mL. O soro antiescorpiônico para o teste de pirogênio, apresentou no somatório da variação de temperatura de cada coelho, uma faixa variando entre 0,2°C a 0,8°C, enquanto que a concentração de endotoxina variou de 0,190 EU/mL a 0,748 EU/mL. Podemos observar que o soro antirrábico apresentou no lote R 03 um somatório de temperatura em coelhos bastante elevado (2,9°C), em relação à concentração de endotoxina (1,140 EU/mL), assim como, nos lotes R 04 e R 05 (respectivamente, 1,9 e 1,6) em relação aos resultados das concentrações de endotoxina (respectivamente, 0,828 e 0,780), porém dentro do limite de satisfatoriedade em ambos os testes. No soro antitetânico também podemos observar nos lotes T 04 e T 05 somatórios de variação de temperatura em coelhos elevados (1,7°C e 2,4°C), correspondendo às mais altas concentrações de endotoxina determinadas (1,84 EU/mL e 1,65 EU/mL), porém dentro dos limites de satisfatoriedade em ambos os testes.

Para todos os soros hiperimunes detectou-se uma correlação significativa entre os níveis de endotoxina determinadas pelo ensaio de LAL e os somatórios de variação individual de temperatura em coelhos. A melhor correlação foi obtida para o SAT ($r_s=0,9451$), seguidos pelo SAE ($r=0,9012$, SAR ($r=0,8954$) e SAC ($r_s=0,7038$).

A Wako Chemicals, uma empresa americana especializada na produção do reagente LAL para detecção de endotoxinas, destaca alguns pontos que devem ser considerados quando se utiliza o ensaio de pirogênio:

- Se for considerado que muitas outras substâncias, tanto endógenas quanto exógenas podem causar a elevação da temperatura nos coelhos, este é um ponto bastante limitante para se utilizar este ensaio como determinação de endotoxinas em uma amostra. Embora seja difícil que este teste tenha como resultado um falso positivo devido a substâncias endógenas, pelo razoável número de coelhos usados para o ensaio, é muito comum que se ofereça resultados errôneos quando as amostras se encontram contaminadas por organismos, tais como, vírus, fungos ou outro tipo de substância exógena que pode causar febre em animais no ensaio.
- É um método inadequado para determinar pirogênios em determinadas classes de medicamentos como, os esteroidais, os utilizados em quimioterapia que quando administradas ao organismo podem atuar através de mecanismos que causam o aumento da temperatura. Esta propriedade confere uma grande limitação no emprego do ensaio de pirogênio na fase de pesquisa de novos medicamentos ou quando se trata do controle de endotoxinas em produtos na indústria farmacêutica.— Uma desvantagem muito grande é o fato de não poder quantificar o conteúdo de endotoxinas presentes em uma amostra mediante este ensaio, que oferece somente um resultado qualitativo.
- Existem produtos, como aqueles que contêm plasma sanguíneo, onde as endotoxinas se encontram em uma forma inativa que não produzem febre ao serem inoculadas, porém, com o passar do tempo, devido aos processos metabólicos que o plasma sofre dentro do organismo aparece a toxicidade. Nestas ocasiões, o método de pirogênios em coelhos produz um resultado falso negativo (WAKO CHEMICALS, 2015) .

O teste de inibição/potencialização demonstrou que a diluição de trabalho utilizada para os soros foi de 1:10, exceto para o soro antiescorpiônico onde trabalhou-se com a diluição de 1:100. Esta diluição (1:100) demonstrou ser eficaz para a análise do soro antiescorpiônico.. O FDA e a USP recomendam que não se trabalhe com a amostra pura (não diluída) para se evitar interferentes e nem que se trabalhe no limite, utilizando-se a máxima diluição válida (MDV). Para o soro anticrotálico a MDV é de

350, para o soro antirrábico a MDV é de 4660, para o soro antitetânico a MDV é de 700 e para o soro antirrábico a MDV é de 1400. Portanto, todas as diluições utilizadas nos quatro soros atenderam as recomendações do FDA e USP.

A seletividade do método demonstrou, através dos resultados de três lotes analisados de cada soro, que não houve reação do branco (controle negativo da água) e nenhuma impureza ou metabólito que pudesse mascarar os resultados. Nos três lotes do soro anticrotálico, C 02, C04 e C 06, a concentração de endotoxina foi de 0,248 EU/mL, 0,489 EU/mL e 0,286 EU/mL respectivamente. Nos três lotes do soro antirrábico, R 06, R 01 e R 10, a concentração de endotoxina foi de 0,115 EU/mL, 0,536 EU/mL e 0,314 EU/mL. Nos três lotes de soro antitetânico, T 02, T 01 e T 03, a concentração de endotoxina foi de 0,779 EU/mL, 0,578 EU/mL e 0,176 EU/mL. Nos três lotes do soro antiescorpiônico, E 01, E 02 e E 003, a concentração de endotoxina foi de 0,711 EU/mL, 0,615 EU/mL e 0,190 EU/mL. Os lotes R 01, T 02, T 01, E 01 e E 02 apresentaram concentrações de endotoxina um pouco mais elevadas que os demais lotes de soros, porém essas concentrações de endotoxinas encontradas são inerentes de cada lote analisado, confirmando que o ensaio de LAL (método cromogênico cinético) detecta e quantifica somente endotoxina.

A validação do parâmetro precisão foi determinada através da repetibilidade (precisão intra-corridas) e da precisão intermediária (precisão inter-corridas). Na repetibilidade foram analisados três lotes diferentes de cada soro, em triplicata, totalizando-se 9 determinações, três determinações para cada lote, onde se determinou o tempo de reação em segundos, dentro de um curto período de tempo e com o mesmo analista. A repetibilidade dos ensaios alcançou os critérios propostos, onde se comprovou uma boa técnica e um baixo CV % em todos os soros analisados. SAC lotes C 02; C 04 e C 06, onde o CV % foi de 0,25 %; 1,22 % e 0,29 % respectivamente. SAR lotes R 06; R 01 e R 10, onde o CV % foi de 0,38 %; 0,64 % e 0,33 % respectivamente. O SAT lotes T 01; T 02 e T 03, onde o CV % foi de 1,22 %; 1,15 % e 0,56 % respectivamente. SAE lotes E 01; E 02 e E 03, onde o CV % foi de 0,91 %; 0,30 % e 0,93 % respectivamente. Pelo critério preconizado pela ANVISA, o CV% deve ser < 15%, já o critério preconizado pelo FDA e USP requer um CV% < 10%. A validação do parâmetro precisão intermediária, dos quatro soros analisados, onde se determinou o tempo de reação em segundos, foi demonstrada. utilizando-se como critério o coeficiente de variação (CV%) obtidos através da concordância dos resultados das análises de dois analistas do mesmo laboratório e em dias diferentes

(mínimo de dois dias para cada análise). Foram realizadas 12 determinações da amostra de cada soro por cada analista. Pelo critério preconizado pela ANVISA, o CV% deve ser $< 15\%$, já o critério preconizado pelo FDA e USP requer um CV% $< 10\%$. Para o soro anticrotálico o CV% foi de 2,0% e 1,20%, respectivamente analista 1 e analista 2. Para o soro antirrábico o CV% foi de 0,96% e 0,78%, respectivamente analista 1 e analista 2. Para o soro antitetânico o CV% foi de 1,73% e 1,80%, respectivamente analista 1 e analista 2 e para o soro antiescorpiônico. o CV% foi de 1,48% e 3,65%, respectivamente analista 1 e analista 2. Com os resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, verificamos que a precisão (precisão inter-corridas) foi alcançada cumprindo-se os critérios tanto da ANVISA, quanto do FDA e USP. No parâmetro Precisão (repetibilidade e precisão intermediária), em nossas análises, utilizaremos o CV % preconizado pelo FDA e USP (CV % < 10), por ser um critério mais rigoroso em relação ao critério da ANVISA (CV % < 15 %) e por ser um critério internacionalmente aceito pela comunidade científica para validação de metodologia.

A validação do parâmetro exatidão dos quatro soros analisados, foi demonstrada utilizando-se como critério a recuperação de três concentrações conhecidas de endotoxina (0,05 EU/mL, 0,5 EU/mL e 5 EU/mL) adicionadas (*spike*) às amostras dos quatro soros. A recuperação seguiu o método preconizado pela USP $< 85 >$ BET (Bacterial endotoxin test). Em 2013, Chen e Winther publicaram e apresentaram um artigo no Encontro Anual do FDA, no qual descreveram uma baixa recuperação de endotoxina em produtos biológicos.

Baseado neste artigo, o FDA solicitou dados específicos que demonstrassem a capacidade do método LAL BET (ou seja, USP $< 85 >$) para recuperar endotoxina em amostras contaminadas (*spike*). Esse estudo ficou a cargo de Bolden e colaboradores. Após uma análise cuidadosa e exame dos detalhes experimentais, verificou-se que o projeto e a execução do estudo realizado por Chen e Vinther diferiram do método de rotina de liberação de lotes realizados pela USP $< 85 >$. O projeto foi posteriormente revisto e realizado de acordo com o preconizado pela USP $< 85 >$ BET, onde constatou-se que os resultados demonstraram que a endotoxina poderia ser consistentemente recuperada ao longo do experimento. (BOLDEN et al, 2016). O estudo solicitado pelo FDA, ratifica a validação da exatidão realizada em nossos testes..

A ANVISA preconiza para critérios de validação em relação ao parâmetro Exatidão uma recuperação de $100\% \pm 30\%$. Para aprovação de produtos, FDA,

Farmacopeia Americana e Europeia preconizam uma recuperação de 50% a 200%.

A recuperação foi calculada pelo *Software WinKQCL®* (LONZA - versão 4.0). Dos quatro soros analisados no processo de validação, soro anticrotálico, soro antirrábico, soro antitetânico e soro antiescorpiônico, cumpriram os critérios exigidos pela ANVISA, FDA, Farmacopeia Americana e Europeia.

Os SAC, SAR, SAT e SAE demonstraram ótima recuperação nas três concentrações adicionadas (*spike*) às amostras (0,05; 0,5 e 5 EU/mL). A concentração de 0,5 EU/mL apresentou a melhor recuperação em todas as amostras analisadas, SAC (95 %), SAR (100,4 %), SAT (96,4 %) e SAE (93,8 %), sendo as recuperações mais próximas de 100 %. É sempre recomendado que se utilize a concentração média da curva padrão nas análises de determinação da concentração de endotoxina em produtos. Sendo assim, nossos resultados estão condizentes com as recomendações do FDA e USP.

7 CONCLUSÃO

O ensaio do LAL (Método Cromogênico Cinético – *in vitro*) foi considerado válido para a determinação da concentração de endotoxina bacteriana em amostras dos soros anticrotálico, antirrábico, antitetânico e antiescorpiônico, porque cumpriu os parâmetros de desempenho descritos no protocolo de validação.

Nosso estudo comprovou que a substituição do ensaio de pirogênio (*in vivo*) pelo ensaio de LAL (Método Cromogênico Cinético – *in vitro*) para os SAC, SAR, SAT e SAE é extremamente conclusivo e necessário, visto que, utilizaremos em nossas análises um ensaio mais sensível, validado e conseqüentemente seguindo o princípio dos 3 Rs estabelecidos por Russel e Burch.

Qualquer diluição abaixo da MDV pode ser utilizada nos ensaios. Essa recomendação deve ser seguida para que nunca se trabalhe no limite da MDV de cada soro analisado, visto que, pode-se eventualmente haver algum erro de diluição e assim extrapolar a MDV.

8 PERSPECTIVAS

Realizar um estudo colaborativo com os três principais produtores de soros hiperimunes no Brasil.

Continuar os estudos para uma futura submissão do trabalho para a avaliação da Farmacopeia Brasileira para que possa ser inserido como um ensaio *in vitro* para o controle de qualidade dos Soros anticrotálico, antiescorpiônico, antirrábico e antitetânico, que atualmente são realizados em animais (coelhos).

A partir da validação do método do LAL cromogênico cinético para os Soros anticrotálico, antiescorpiônico, antirrábico e antitetânico, poderemos validar outros soros hiperimunes, atendendo ao Princípio dos 3 Rs.

REFERÊNCIAS

A CAMREX COMPANY. **LAL test made easy**: kinetic-QCL, catalog No. 50-650U, license No. 709, 2008.

ACCONCI, C. Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes : filtração em membrana. **Dissertação de Mestrado**, São Paulo, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, Edição 104, p. 56.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

BACTERIAL endotoxin test. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville, U.S. Pharmacopeia, 2016. Chapter 85.

BALLS, M.; VAN ZELLER, A-M.; HALDER, M. **Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation**. Amsterdam: Elsevier, 2000.

BOLDEN J. S. et al. Endotoxin recovery using *limulus* amebocyte lysate (LAL) assay, **Biologicals**, USA, v. 44, n. 5, p. 434-40, 2016.

BRAGA, D. S. **Exame físico**: ectoscopia. [Fortaleza], 2015. p. 20. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/davysonsampaio/exame-fsico-ectoscopia>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 15 maio 2017.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

CHEN J.; WHINTHER A. Low endotoxin recovery in common biologics products. In: FDA ANNUAL MEETING, Orlando, 2013. **[Anais...]**. Florida, 2013.

EUROPEAN Pharmacopeia 8.0. Strasburg: Concil of Europe, 2014.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. parte II fascículo 5. São Paulo; Atheneu, 2010.

FLEURY. **Dicionário de doenças.**

<<http://www.fleury.com.br/revista/dicionarios/doencas/Pages/tetano.aspx>>. Acesso em: 11 jul. 2013

FONSECA, A. **Ataque de serpentes no Brasil.** Biologia e Herpetologia, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://biologia-herpetologia.blogspot.com.br/2011/02/ataques-de-serpentes-no-brasil.html>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. U.S. Department of Health and Human Services. 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. USA, 1992.

FRAZÃO, A. **Sintomas do tétano.** Porto: Tua saúde, 2017. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/sintomas-do-tetano/>>. Acesso em: 5 jun. 2017

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Soros produzidos/bulas.** Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/produtoseservicos/produtos-imunologicos/soros-prodUZidos-bulas-1-34k>>. Acesso em: 21 maio 2015

GRANJEIRO, J. M. Métodos alternativos ao uso de animais de experimentação. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 64., São Luís, 2012. **Anais...** Maranhão, 2012.

GUIA de vigilância epidemiológica: normas e manuais técnicos. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

GUILLEN, F. Novo método para tratamento da raiva em humanos é estudado. **ANU USP**, São Paulo, v. 48, n. 69, 2015. Disponível em: <<http://citrus.uspnet.usp.br/aun/exibir?id=6983&ed=1219&f=28>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

INSTITUTO BUTANTAN. **Bulas [online].** Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/htm>>. Acesso em: 25 maio 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.002**: ensaio de Pirogênio. Rev.13. Rio de Janeiro, 2017.

_____. **POP 3330.020**: estufa de despirogenização. Rev. 2. Rio de Janeiro, 2015.

_____. **POP 65.1120.061**: incerteza em medições analíticas. Ver. 5. Rio de Janeiro, 2015.

_____. **Sistema Harpya de Gerenciamento de Amostras**. Rio de Janeiro, 2017. Base de dados.

INSTITUTO VITAL BRAZIL. **Etapas da produção**. Portal do Governo do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/etapas_producao.html>. Acesso em: 21 maio 2015.

LONZA. **Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL®**. Walkersville, USA , 2016

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock's Biology of Microorganisms**. 10. th. [New Jersey]: Prentice Hall, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos**, 2017. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos> >. Acesso em: 20 jun. 2017.

MORALES R. P. Ensayo del lisado de amebócitos del Limulus (LAL). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo: artigo de Revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

RAIVA. [Vitória]: Per Scientia, 2011. Disponível em: <https://albericomarcosbioifes.wordpress.com/tag/raiva/>. Acesso em: 15 maio 2017.

REZENDE, J. M. Providencial coincidência na história do Ofidismo. In: **À sombra do Plátano: crônicas de história da medicina**. São Paulo: Unifesp, 2004.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p.193-204, 2007.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH. R. L. **The principles of humane experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SANTOS, J. V. P; SANTOS, K. G. C.; MEDEIROS, M. A. **Escorpionismo no Brasil**. Barreiras: UNEB, 2014. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgvYUAD/relatorio-escorpionismo?part=2>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

STEPHENS, M. L.; GOLDBERG, A. M.; ROWAN, A. N. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and replacement the use of laboratory animals. In: ROWAN, N. A. **The state of the animals**. Washington: Human Society Press, 2001. Chapter 8.

TIBALI, E. H. C. **Ofidismo e insuficiência renal**. São Paulo, 2013. p. 13. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/eduhenrique73/ofidismo-e-ira>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

TODAR, K. Mechanisms of Bacterial Pathogenecity: endotoxins. In: **TEXTBOOK of Bacteriology**, Wisconsin, 2008

VALIDATION of compendial procedures. In: **THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34**. Rockville, U.S. Pharmacopeia, 2016. v.1, p.734. Chapter 1225.

WAKO CHEMICALS USA, Inc. **Divisão LAL**. Richmond, VA, 2015.

WILLIAMS, K. L. **Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation**. 3 ed. New York: Informa Healthcare, 2007.