



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**



**LÁYSA DUARTE PASSOS RESENDE**

**A EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS PARA DETECÇÃO DE  
PIROGÊNIOS**

**OURO PRETO**

**2025**

LÁYSA DUARTE PASSOS RESENDE

**A EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS PARA DETECÇÃO DE  
PIROGÊNIOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jacqueline de Souza

Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Dias Marques-  
Marinho

OURO PRETO

2025

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R433e Resende, Laysa Duarte Passos.

A evolução dos métodos farmacopeicos para detecção de pirogênios.  
[manuscrito] / Laysa Duarte Passos Resende. - 2025.  
69 f.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza.

Coorientadora: Profa. Dra. Flávia Dias Marques Marinho.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Pirogênios. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Monócitos. 4. Farmacopéia. I.  
Souza, Jacqueline de. II. Marinho, Flávia Dias Marques. III. Universidade  
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.1

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Láysa Duarte Passos Resende**

### **A evolução dos métodos farmacopeicos para detecção de pirogênios**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 04 de setembro de 2025

#### Membros da banca

Dra. Jacqueline de Souza - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Andrea Grabe Guimarães - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Nayara Nascimento Toledo Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Flávia Dias Marques Marinho - Coorientadora - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Profa. Jacqueline de Souza, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 08/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/09/2025, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0975196** e o código CRC **E300545F**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a todos, que de alguma forma, estiveram presentes nesta caminhada.

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos amigos, pela amizade sincera e momentos inesquecíveis.

Às pessoas com quem dividi casa, pelos grandes aprendizados.

Aos que já não estão entre nós, mas que, de alguma maneira, me inspiraram e continuam vivos em minha memória e em minhas conquistas.

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Farmácia, pelo ensino público de qualidade.

À minha orientadora e à minha coorientadora, pelo acolhimento e pela disponibilidade ao longo deste percurso.

Aos funcionários da EFAR, dos estágios e à banca avaliadora, pelas contribuições.

Muito obrigada! Cada um de vocês foi fundamental em minha vida.

*“Sê forte e corajoso!*

*Não temas, nem te apavores, porque o  
Senhor, teu Deus, estará contigo por onde  
quer que vás.”*

*(Josué 1,9)*

## RESUMO

Os pirogênios são substâncias capazes de induzir febre e, por isso, representam risco significativo quando presentes em produtos farmacêuticos administrados por via parenteral ou que entram em contato direto com o sangue. Diante da necessidade de garantir a segurança e qualidade desses produtos, diferentes métodos para detecção de pirogênios foram descritos nas farmacopeias ao longo do tempo, em consonância com a evolução científica e regulatória. Este trabalho teve como objetivo estudar a atualização dos métodos farmacopeicos para detecção de pirogênios, com ênfase na Farmacopeia Brasileira, além de realizar comparações com as Farmacopeias Europeia e Americana, destacando suas similaridades e divergências. O levantamento bibliográfico evidenciou que a Farmacopeia Brasileira incorporou gradativamente os novos métodos, desde a inclusão inicial do teste de pirogênios em coelhos na 3ª edição (1977), até inserção do Teste de Endotoxinas Bacterianas (LAL) na 5ª edição (2010) e, mais recentemente, a introdução do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) na 7ª edição (2024). A comparação entre as farmacopeias demonstrou avanços importantes no processo de harmonização destas, ainda que persistam diferenças metodológicas. Por fim, foi elaborada diretriz para roteiros de aula prática utilizando o método I do MAT, de modo a esclarecer aspectos não detalhados na farmacopeia e simplificar a compreensão sobre a sua aplicabilidade. Em conclusão, a evolução dos métodos reflete o compromisso das farmacopeias com a inovação científica, a ética no uso de animais e a segurança dos pacientes.

**Palavras-chave:** Pirogênios; Endotoxinas Bacterianas; Teste de ativação de monócitos; Farmacopeia Brasileira; Farmacopeia Europeia

## ABSTRACT

Pyrogens are substances capable of inducing fever and, thus, pose a significant risk when present in pharmaceutical products administered parentally or that come into direct contact with blood. Due to the need to ensure safety and quality of these products, different methods to detect pyrogens have been described in pharmacopoeias throughout time, in line with scientific and regulatory evolution. This work aimed to analyze the updating of pharmacopoeial methods for pyrogen detection, with emphasis on the Brazilian Pharmacopoeia, as well as comparing it with the American and European Pharmacopoeias, highlighting their similarities and divergences. The bibliography survey demonstrated that the Brazilian Pharmacopoeia gradually incorporated new methods, from the initial inclusion of the pyrogen test in rabbits in the third edition (1977) to the insertion of the Bacterial Endotoxin Test (LAL) in the fifth edition (2010) and, more recently, the introduction of the Monocyte Activation Test (MAT) in the seventh edition (2024). The comparison between the pharmacopoeias revealed important advances in their harmonization process, although methodological differences persist. Finally, was developed a guideline for practical lesson plan using method I of MAT was proposed in order to clarify aspects not detailed in the pharmacopoeia and simplify the comprehension of its applicability. In conclusion, the evolution of the methods reflects the commitment of pharmacopoeias with scientific innovation, ethics in the use of animals and the safety of the patients.

**Keywords:** Pyrogens; Bacterial Endotoxins; Monocytes Activation Test; Brazilian Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo da Febre.....	14
Figura 2 – Parede celular de bactéria Gram-negativa.....	15
Figura 3 – Fluxograma da metodologia .....	20
Figura 4 – Fotografia das folhas de rosto e do índice do 1º suplemento da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1943).....	21
Figura 5 – Fotografia da folha de rosto e do índice da 2ª Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1959) .....	22
Figura 6 – Fotografia da folha de rosto e do índice da 3ª Farmacopeia Brasileira (1977) .....	24
Figura 7 – Fotografia da capa, da folha de rosto e do conteúdo da 4ª Farmacopeia Brasileira (1988) .....	25
Figura 8 – Fotografias da capa, da folha de rosto e do sumário da 5ª Farmacopeia Brasileira (2010) .....	26
Figura 9 – Fotografia da capa, da folha de rosto e do sumário da 6ª Farmacopeia Brasileira (2019) .....	27
Figura 10 – Fotografia da folha de rosto e do sumário da 7ª Farmacopeia Brasileira (2024) .....	28
Figura 11 - Fontes de reagentes biológicos: Sangue total, PBMC, linhagens monocíticas .....	53
Figura 12 - Sangue criopreservado .....	53
Figura 13 - Preparo curva-padrão de endotoxina.....	54
Figura 14 - Meio de cultura.....	54
Figura 15 - Fonte de monócitos .....	55

Figura 16 - Amostra.....	55
Figura 17 - Concentrações de endotoxina .....	56
Figura 18 - Incubação .....	56
Figura 19 - Transferência do sobrenadante para placa ELISA.....	58
Figura 20 - Remoção do conteúdo de cada poço .....	58
Figura 21 - Lavagem da placa.....	59
Figura 22 - Adição do anticorpo conjugado.....	59
Figura 23 - Remoção do conteúdo de cada poço .....	60
Figura 24 - Adição do substrato cromogênico e incubação (protegida da luz) em temperatura ambiente.....	60
Figura 25 - Adição da solução para finalizar a reação ( <i>STOP</i> ).....	61
Figura 26 - Realização da leitura de placa.....	61
Figura 27 - Construção da curva-padrão .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos testes para determinação de pirogênios descritos nas farmacopeias Brasileira, Europeia e Americana.....	32
Tabela 2 – Etapas do Teste de pirogênios descritas na Farmacopeia Brasileira.....	35
Tabela 3 – Etapas do Teste de pirogênios - Farmacopeia Europeia.....	36
Tabela A – Definições adaptadas da Farmacopeia Brasileira.....	49
Tabela B – Valores de K por via de administração .....	50
Tabela C – Testes Preparatórios para MAT.....	51
Tabela D – Preparo de amostras para Método I do MAT.....	57
Tabela E – Critérios de aprovação do MAT .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	<i>Reduction Refinement And Replacement</i> (Redução, Refinamento e Substituição)
Anvisa	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
BET	<i>Bacterial Endotoxin Test</i> (Teste de Endotoxinas Bacterianas)
BPF	Boas Práticas De Fabricação
ELISA	Ensaio De Imunoabsorção Enzimática
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Europeia)
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (Teste de Lisado De Amébócitos De <i>Limulus</i> )
LPS	Lipopolissacarídeos
MAT	Teste De Ativação De Monócitos
MDV	Máxima Diluição Válida
NEPs	Pirogênios Não-Endotoxina
OVLT	Órgão Vascular Da Lâmina Terminal
PBMC	Células Mononucleares Isoladas Do Sangue
PDG	Grupo De Discussão Farmacopeica
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
Rfc	Fator C Recombinante
RPT	<i>Rabbit Pyrogen Test</i> (Teste de Pirogênios em Coelhos)
TNF-A	Fator De Necrose Tumoral Alfa

USP *United States Pharmacopeia* (Farmacopeia Americana)

WB Ensaio De Sangue Total

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<b>O que é pirogênio e sua presença em medicamentos .....</b>	<b>13</b>
2.2	<b>Riscos da contaminação por pirogênios em produtos farmacêuticos .....</b>	<b>15</b>
2.3	<b>Métodos para determinar pirogênio .....</b>	<b>16</b>
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
3.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1	<b>Levantamento bibliográfico sobre detecção de pirogênios em produtos farmacêuticos contido em todas as edições da Farmacopeia Brasileira.....</b>	<b>19</b>
4.2	<b>Comparação de métodos farmacopeicos relativos à determinação de pirogênios, disponíveis na Farmacopeia Brasileira com os métodos das Farmacopeias Americana e Europeia.....</b>	<b>19</b>
4.3	<b>Redação de uma diretriz para aula prática sobre o teste de ativação de monócitos inserido na 7ª edição da Farmacopeia Brasileira .....</b>	<b>19</b>
5	RESULTADOS .....	20
5.1	<b>Levantamento bibliográfico sobre detecção de pirogênios em produtos farmacêuticos contido em todas as edições da Farmacopeia Brasileira.....</b>	<b>20</b>
5.2	<b>Comparação de métodos farmacopeicos relativos à determinação de pirogênios, disponíveis na Farmacopeia Brasileira com os métodos das Farmacopeias Americana e Europeia.....</b>	<b>28</b>
5.2.1	Conceito .....	29
5.2.2	Métodos .....	34
5.2.3	Aplicações.....	40
5.2.4	Limitações .....	43
5.2.5	Vantagens e desvantagens .....	45
5.3	<b>Redação de uma diretriz para aula prática sobre o teste de ativação de monócitos inserido na 7ª edição da Farmacopeia Brasileira .....</b>	<b>47</b>
5.3.1	Diretriz para aula Prática .....	47
6	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS .....	65

# 1 INTRODUÇÃO

Os pirogênios são todas as substâncias capazes de provocar febre (Pearson, 1985; Schindler et al., 2009 apud Lopes, 2011). Assim, quando em contato com o organismo do hospedeiro, os pirogênios exógenos como os vírus, bactérias e fungos desencadeiam os pirogênios endógenos que irão produzir citocinas responsáveis pela febre (Pinto, Kaneko Pinto, 2015).

Todos os produtos farmacêuticos e médicos devem ser avaliados para atestar que cumprem os requisitos de qualidade por meio de métodos descritos nas farmacopeias (Du et al., 2011 apud Spoladore et al., 2021) Os produtos administrados por via parenteral ou que terão contato com o sangue devem também cumprir com testes específicos para detecção de pirogênios (Freitas, 2008 apud Silva, 2015). Os testes para detecção de pirogênios são descritos em farmacopeias de distintos países e continentes podendo ter pequenas alterações de acordo com a fonte. O teste considerado padrão ouro para detecção de pirogênios *in vivo* existe há mais de 50 anos e é fundamentado na presença ou não de febre em coelhos por meio de experimentos que consistem na injeção venosa da substância em análise (McCLOSKEY et al., 1943 apud Pinto, Kaneko Pinto, 2015; Hoffmann et al., 2005 b apud Lopes, 2011; Farmacopeia Brasileira, 2024). Porém, a implementação de legislações que priorizam a necessidade de diminuir a utilização de animais para experimentos laboratoriais, impactou na busca por alternativas mais sustentáveis.

Dessa forma, o primeiro teste *in vitro* descrito nas farmacopeias foi o teste de endotoxina bacteriana também chamado de Lisado de Amébocitos de *Limulus* (LAL). Este quantifica ou detecta endotoxinas de bactérias Gram-negativas por uma reação enzimática que resulta em coagulação do reagente LAL. Este teste é considerado limitado em relação ao *in vivo* pois não detecta pirogênios não-endotoxina (NEPs) (Farmacopeia Brasileira, 2024). Portanto, apesar de ter diminuído a utilização do teste em coelhos, não o substituiu por completo.

Com o avanço das pesquisas, pôde-se conhecer todo o processo febril do organismo e, com isso, foi possível desenvolver um método *in vitro* baseado nesse processo. O teste de ativação em monócitos (MAT) tem a capacidade de

detectar/quantificar as substâncias pirogênicas que ativam as células monocíticas e desencadeiam as citocinas que culminam em febre. Todo o processo é realizado utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O MAT é mais um teste alternativo em relação ao *in vivo*, com a vantagem de determinar NEPs, além de endotoxinas bacterianas (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; Silva et al., 2018; Kim, 2021).

Diante da evolução dos métodos para detecção de pirogênios descritos nas farmacopeias e das diferenças existentes entre os procedimentos adotados por cada uma delas, o presente trabalho visou revisar, compilar e organizar informações sobre os testes farmacopeicos usualmente utilizados para a identificação de pirogênios em produtos farmacêuticos e médicos, facilitando sua consulta e aplicação. Além disso, buscou produzir material bibliográfico acessível, promovendo a ampliação e equalização do acesso ao conhecimento entre diferentes públicos, contribuindo também para o aprimoramento do monitoramento da contaminação por pirogênios, uma vez que as informações facilitam a condução inequívoca das atividades práticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O que é pirogênio e sua presença em medicamentos

Pirogênio (*Pyrogen*) é a denominação para qualquer substância que tenha a capacidade de induzir aumento da temperatura corporal em animais ou humanos. Esse termo é derivado do grego no qual *pyro* significa “fogo” e *genesis* que significa “criar ou resultar” (Pearson, 1985; Schindler et al., 2009 apud Lopes, 2011).

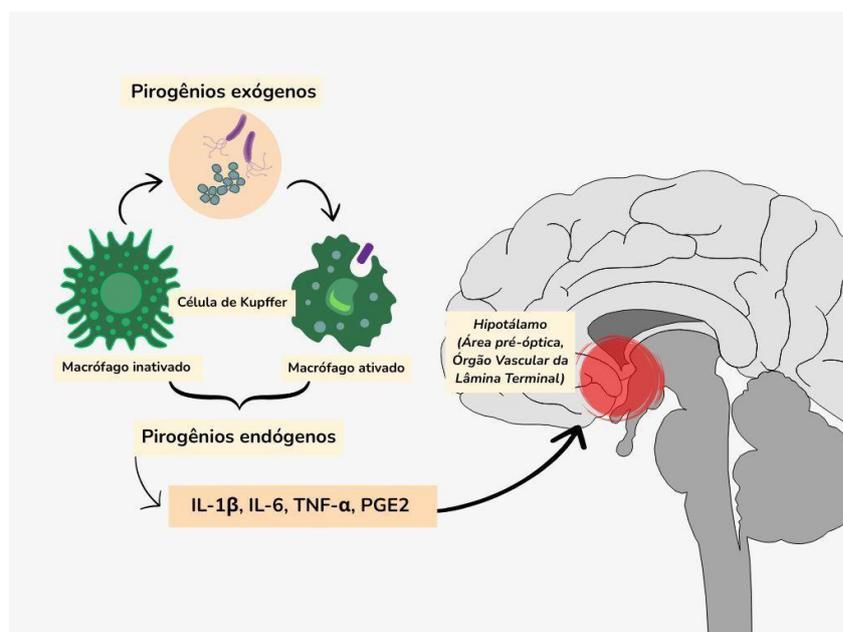
Dessa forma, para se manterem vivos, os animais homeotérmicos, como os mamíferos, têm a capacidade de termorregulação, a qual, por meio da homeostase, regula a temperatura corporal real em um nível preestabelecido (*set point*), cerca de  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O processo de termorregulação se dá da seguinte forma: o aumento da temperatura corporal e o estabelecimento de um novo *set point* com temperaturas mais altas acarreta a diminuição do fluxo sanguíneo cutâneo (frio) seguida pelo calafrio (tremor) e pela produção de calor até se atingir o novo nível preestabelecido.

Por sua vez, ao diminuir a temperatura corporal este limite cai novamente e então resulta na sensação de calor (suor) (Silbernagl, 2016).

Os pirogênios são divididos em duas classes: 1) os exógenos, que se originam fora do hospedeiro e induzem febre quando entram em contato, por exemplo, com vírus, fungos, bactérias e seus componentes, alguns fármacos, esteroides e frações do plasma; 2) os endógenos, que são produzidos internamente quando o hospedeiro entra em contato com os pirogênios exógenos, provocando a liberação das citocinas, sendo as principais interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que produzem febre (Pinto, Kaneko Pinto, 2015).

Quando há infecção causada pelos pirogênios exógenos ocorre alteração no ponto de ajuste (*set point*) que desencadeará alterações fisiológicas. Quando entram no organismo são opsonizados e fagocitados por macrófagos, como as células de Kupffer. Estas células, então, liberam as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> que causam reação febril, pelo hipotálamo na área pré-óptica e no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) por meio da PGE<sub>2</sub> (Figura 1) (Silbernagl, 2016).

Figura 1 – Mecanismo da Febre



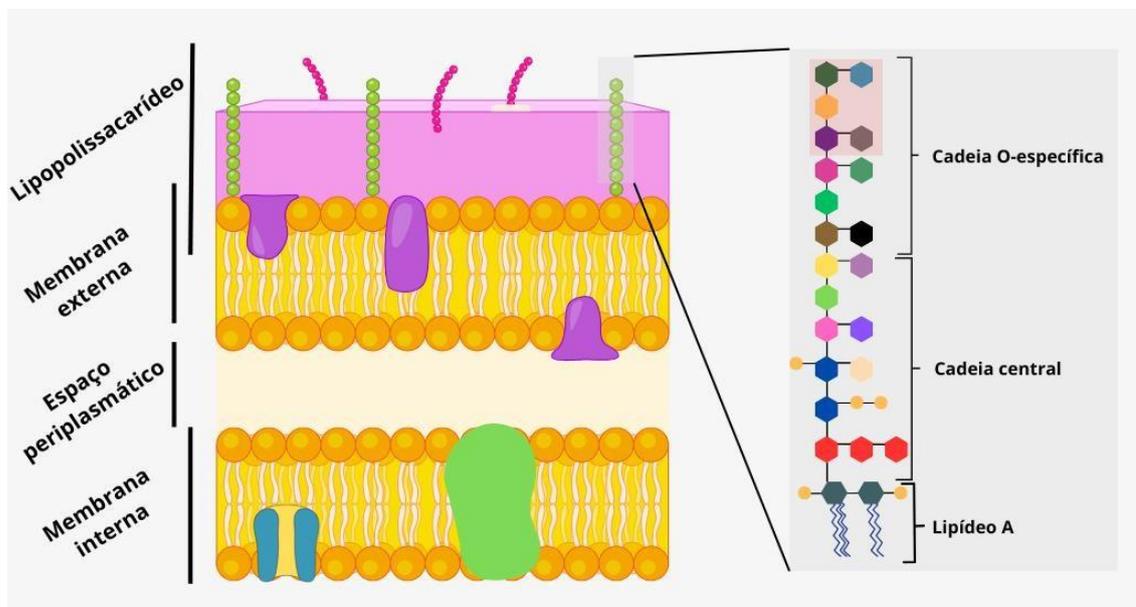
Fonte: Elaboração própria (2025)

## 2.2 Riscos da contaminação por pirogênios em produtos farmacêuticos

A presença de pirogênios em produtos farmacêuticos e médicos pode acarretar respostas inflamatórias desde o estado febril até mesmo morte por choque. Portanto, tais produtos são submetidos a testes de controle de qualidade presentes nas farmacopeias, visando garantir a ausência de pirogênios e assim atestar a segurança do uso do medicamento ou dispositivo médico (Du et al., 2011 apud Spoladore et al., 2021).

As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas são complicadores para a indústria farmacêutica. As endotoxinas são constituídas por uma região hidrofílica polissacarídica central covalentemente ligada a cadeia lateral hidrofóbica O-específica e ao lipídeo A (Figura 2). Mesmo que todo o processo produtivo esteja de acordo com as boas práticas de fabricação (BPF), é de extrema importância processos de controle para que o produto final seja apirogênico (Pinto, Kaneko Pinto, 2015).

Figura 2 — Parede celular de bactéria Gram-negativa



Fonte: Elaboração própria (2025)

Boa parte dos microrganismos podem ser eliminados por meio da esterilização, por exemplo aplicação de calor seco em estufas. Porém, os LPS têm características termoestáveis, sendo eliminados somente por despirogenização (Hartung et al., 2001, Hoffmann et al., 2005, Schindler et al., 2009 apud Lopes, 2011). Esta deverá ser realizada de maneira particular para cada produto, podendo ser por inativação ou remoção das endotoxinas. Cada processo, químico ou físico, a ser utilizado deve ter comprovação de que é eficaz, reprodutível e possível de ser validado (Williams, 2004 apud Pinto, Kaneko Pinto, 2015)

### 2.3 Métodos para determinar pirogênio

Para garantir a ausência dos pirogênios nos produtos injetáveis, são realizados alguns testes descritos na farmacopeia. Têm-se, atualmente, a descrição de três testes: teste de pirogênios (*in vivo*), teste de endotoxinas bacterianas (LAL) e teste de ativação de monócitos (MAT). No entanto, existem distinções entre as técnicas descritas nas farmacopeias. Na Farmacopeia Americana (USP) são descritos os dois primeiros testes, o MAT não foi aderido. Em contrapartida, há 15 anos a Farmacopeia Europeia (EP) indica a utilização do MAT como teste alternativo ao teste de pirogênios *in vivo*. A Farmacopeia Brasileira (FB), por sua vez, introduziu o MAT em sua versão publicada em 2024, a qual permanece vigente (Silva et al., 2018, Farmacopeia Brasileira, 2024).

O teste *in vivo* para detecção pirogênios, também conhecido como RPT (*Rabbit Pyrogen Test*), é considerado padrão ouro e utilizado há mais de 50 anos. A USP foi a pioneira em adotar o teste desde a sua XII edição publicada em 1942, ainda que tenha passado por atualizações em edições posteriores. Esse teste se baseia na reação febril que pode ocorrer ou não quando é realizada injeção intravenosa da solução estéril em análise, na veia da orelha de coelhos. Dentre as três farmacopeias citadas, existem algumas variações nas condições para realização do teste, tais como: o número de animais, as repetições, testes preliminares, critérios de exclusão e interpretação dos resultados (McCLOSKEY et al., 1943 apud Pinto, Kaneko Pinto, 2015, Hoffmann et al., 2005 b apud Lopes, 2011, Farmacopeia Brasileira, 2024). Embora tenha maior abrangência em detectar pirogênios, trata-se de um método menos

sensível do que o método *in vitro*. Como ponto negativo pode-se destacar também a necessidade de utilização de animais de laboratório (muitos coelhos) (Hartung et al., 2001; Nakagawa et al., 2002 apud Silva et al., 2016)

O teste de endotoxina bacteriana (LAL) surgiu devido a busca por métodos que implementassem os 3Rs – Redução, Refinamento e Realocação/substituição (*Reduction, Refinement and Replacement*) – ou seja, reduzir o número de animais utilizados e assim substituir métodos *in vivo* por *in vitro* (Balls, 2009 apud Lopes, 2011). O LAL se baseia na detecção ou quantificação de endotoxinas de bactérias Gram-negativas por meio da reação (coagulação) com o reagente LAL (lisado de amebócitos de *Limulus sp.*) (Farmacopeia Brasileira, 2024). Porém, possui limitações e não pode ser um substituto do teste em coelhos pois não detecta pirogênicos não-endotoxina (NEPs). Também apresenta como interferentes os altos níveis de proteínas, lipídios e glicanas quando contidos nos medicamentos analisados (Schindler, 2009, Spreitzer, 2002 apud Kim, 2021).

O MAT começou a ser desenvolvido no final da década de 1980, baseado em células mononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) e era reconhecido inicialmente como alternativa para detecção de endotoxinas. Em seguida, desenvolveram o ensaio de sangue total (WB) e então foi considerado uma alternativa segura e sensível tanto para endotoxinas quanto para NEPs. Sendo, atualmente, o teste de escolha em produtos de administração parenteral desde que a adequabilidade do teste ao produto específico seja comprovada. O MAT é fundamentado no processo febril do organismo pois detecta ou quantifica substâncias que ativam células monocíticas que, por sua vez, liberam citocinas pró inflamatórias como: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A padronização do método foi possível por meio do uso do WB humano criopreservado que também proporcionou reprodutibilidade. Podendo, assim, detectar a presença de pirogênicos com maior sensibilidade (Schindler et al., 2004; Schindler et al., 2006 apud Silva et al., 2016). Apesar de muito promissor, esse método apresenta uma certa dificuldade de implantação devido a demanda de WB de humanos. Assim, já se tem estudos que buscam alternativas a esse material biológico (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; Silva et al., 2018; Kim, 2021).

A contaminação de medicamentos e insumos voltados a saúde por pirogênicos trata-se de um problema de saúde pública e deve ser sempre prevenida. É de extrema

importância que os fabricantes sigam as diretrizes das BPF, sendo também necessário levar em consideração a qualidade das matérias-primas, o tempo de manipulação e a fase de esterilização do produto uma vez que os LPS são termoestáveis.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar uma revisão bibliográfica dos métodos farmacopeicos de controle de qualidade empregados na detecção de Pirogênios em produtos farmacêuticos nas Farmacopeias Americana, Brasileira e Europeia.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar levantamento bibliográfico sobre os capítulos gerais que descrevem os métodos para detecção de Pirogênios em produtos farmacêuticos em todas as edições da Farmacopeia Brasileira;
- Comparar os métodos farmacopeicos relativos à determinação de pirogênios, disponíveis na Farmacopeia Brasileira com os métodos das Farmacopeias Americana e Europeia;
- Redigir uma diretriz para aula prática sobre o teste de ativação de monócitos inserido na 7ª edição da Farmacopeia Brasileira.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

A seguir serão apresentados os métodos para conduzir o trabalho.

#### **4.1 Levantamento bibliográfico sobre detecção de pirogênios em produtos farmacêuticos contido em todas as edições da Farmacopeia Brasileira**

Para realizar a consulta foram visitados a biblioteca da Escola de Farmácia da UFOP e o museu da Farmácia da UFOP (MPhUFOP) e acessada a página da biblioteca digital da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) disponível em: (<https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/11937>). As consultas foram realizadas utilizando os seguintes termos: “teste de pirogênios, teste de ativação de monócito e teste de endotoxinas bacterianas”.

#### **4.2 Comparação de métodos farmacopeicos relativos à determinação de pirogênios, disponíveis na Farmacopeia Brasileira com os métodos das Farmacopeias Americana e Europeia**

Também foram utilizados os capítulos gerais da Farmacopeia Brasileira 7ª edição, disponível no site da Anvisa, e das farmacopeias Americana (USP 44) e Europeia (EP 11.0), sobre os temas em português (e em língua inglesa): “teste de pirogênios (pyrogens, pyrogen test), teste de endotoxinas bacterianas (bacterial endotoxins test, bacterial endotoxins) e teste de ativação de monócito (monocyte-activation test).

Os métodos farmacopeicos, foram comparados quanto ao conceito, métodos, aplicações, limitações, vantagens e desvantagens acerca dos métodos farmacopeicos descritos.

#### **4.3 Redação de uma diretriz para aula prática sobre o teste de ativação de monócitos inserido na 7ª edição da Farmacopeia Brasileira.**

Para discorrer sobre o teste de ativação de monócitos foram acessadas a página da biblioteca digital da Anvisa e a farmacopeia Europeia EP 11.0. Também foram realizadas buscas bibliográficas por artigos científicos publicados nos últimos

14 anos. Em ambos os casos, utilizou-se os seguintes termos “teste de ativação de monócito, monocyte-activation test”

Foi elaborada uma diretriz para roteiro de aula prática sobre o teste de ativação de monócitos, incluído na sétima edição da farmacopeia Brasileira (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da metodologia



Fonte: Elaboração própria (2025)

## 5 RESULTADOS

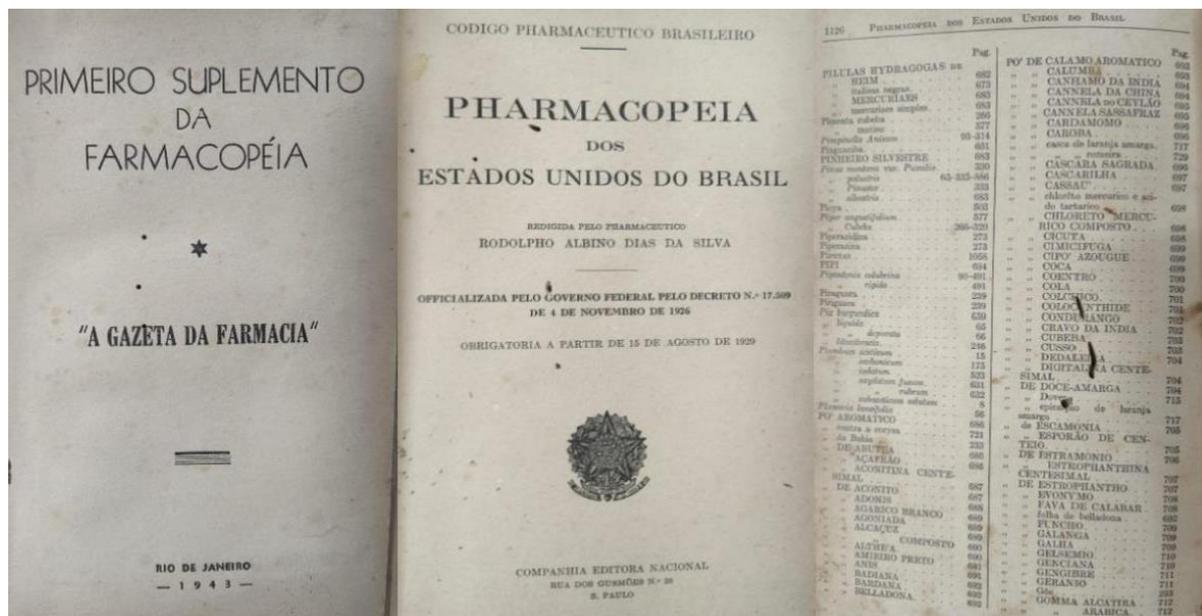
### 5.1 Levantamento bibliográfico sobre detecção de pirogênios em produtos farmacêuticos contido em todas as edições da Farmacopeia Brasileira

A história da Farmacopeia Brasileira iniciou no período colonial quando no Brasil utilizava a Farmacopeia Geral (1794) instituída para o Reino e Domínios de Portugal. Com a Independência, em 1822, e sob outras influências culturais adotou-se a Farmacopeia Francesa como código oficial, do ano de 1851 até 1929. Isto se deu até que se consolidasse um Código Farmacêutico Brasileiro (Farmacopeia Brasileira, 1977).

No dia 15 de agosto de 1929, passou a vigorar, em todo território nacional, a Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. Foi elaborada durante doze anos pelo farmacêutico Rodolfo Albino Dias da Silva (Farmacopeia Brasileira, 1977).

A versão da 1ª Farmacopeia Brasileira disponível no Museu de Farmácia da UFOP é datada de 1943, corresponde ao primeiro suplemento desta com ajustes, acréscimos e atualizações. Apesar de apresentar atualizações relevantes para a prática farmacêutica, ainda não era descrito acerca dos métodos para detecção de pirogênios, como se pode observar na Figura 4 (Farmacopeia Brasileira, 1977).

Figura 4 – Fotografia das folhas de rosto e do índice do 1º suplemento da Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1943)



## Destaque: Ampliação do índice.

1126 PHARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL			
	Pág.		Pág.
PILLULAS HYDRAGOGAS DE		PO' DE CALAMO AROMATICO	693
HELM	682	CALUMBA	693
italiana nigra	673	CANHAMO DA INDIA	694
MERCURIAES	683	CANNELA DA CHINA	694
mercuriales simples	683	CANNELA DO CEYLÃO	695
Pimenta cubeba	265	CANNELA SASSAFRAZ	695
maline	577	CARDAMOMO	696
Preparação Antiana	93-314	CAROBA	696
Pimenta	651	casca de laranja amarga	717
PINHEIRO SILVESTRE	683	" " rosacea	729
Pissa montana var. Pencilo	330	CASCARA SAGRADA	696
polivitis	65-333-846	CASCARILHA	697
Pissater	333	CASSAU	697
silivris	683	chloro mercurico e acido tartarico	698
Pissa	503	CHLORETO MERCU-	
Piper angustifolium	577		

Fonte: SOARES, L M F. MPhUFOP (2025)

Em 1959, foi aprovada a 2ª edição da FB pelo Decreto Federal nº 45.502, que também estabeleceu revisões periódicas a cada dez anos, incluindo edições intermediárias e suplementos. Para isto, foi formada a primeira comissão de revisão, para atualizar e ampliar o conteúdo técnico. Contudo, essa edição ainda não descrevia qualquer método para detecção de pirogênicos. Na Figura 5, está apresentada uma imagem desta edição (Farmacopeia Brasileira, 1977).

Figura 5 – Fotografia da folha de rosto e do índice da 2ª Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1959)

CÓDIGO FARMACÊUTICO BRASILEIRO		ESTADOS UNIDOS DO BRASIL	
FARMACOPÉIA		1249	
DOS			
ESTADOS UNIDOS DO BRASIL			
2.ª EDIÇÃO			
OFICIALIZADA PELO GOVERNO FEDERAL PELO			
DECRETO N.º 45.502 DE 27 DE FEVEREIRO DE 1959			
ORIGIATÓRIA.			
II			
Perchlorato de ferro	538	Pilhas de aloés e goma-guta	XXXVI
Perda por Dessecação R	1091	Pilhas de aloés e quina	XXXVI
Pernanganato de potássio	9	Pilhas de aloés e ranoliteína	XXXVI
Pernanganato de potássio deci-normal SV	647	Pilhas de asa-fetida	XXXVI
Pernanganato de potássio (0,1 N)	1137	Pilhas de carbonato de ferro compostas	XXXVI, XLV
Peroba	1108	Pilhas de carbonato de ferro	XXXVI
Peroba campense	XXXVI	Pilhas de carbonato ferroso	XXXVI
Persulfato de amônio R	1091	Pilhas de cianeto mercurico	XLV
Persulfato de sódio R	1091	opacicas	XXXVI
Peróxido de hidrogênio SR	1108	Pilhas de colicínide com	XXXVI
Peróxido de magnésio	648	pois	XXXVI
Peróxido de zinco	XLV, 649	Pilhas de crocoto	XXXVI
Peso Especifico	1214	Pilhas de ferro, spirina,	XXXVI, XLV
Peso por Centimetro Cúbico	1214	estrictina e aténica	XXXVI, XLV
Posos e Medidas	13	Pilhas de fístula	XXXVI
Posos Moleculares	11	Pilhas de iodeto ferroso	XXXVI, XLV
Posquia de Colofónia em Oleo	937	Pilhas de iodeto mercurico	XXXVI
Potássio hydrochloridum	289	opacicas	XXXVI
Potródo liquido	631	Pilhas de iodo	XXXVI, XLV
Pez	321	Pilhas de meimendo e valeris na compostas	XXXVI
Pez-de-Borgonha	XXXVI	Pilhas de pedolína belidosa	XXXVI
Pez limpo	321	das	XXXVI
Phenacetinum	451	Pilhas de quercus compostas	XXXVI
Phenazonum	454	Pilhas de rubarbo	XXXVI
Phenidionum	454	Pilhas de rubarbo compostas	XXXVI
Phenobarbitalum	457	Pilhas de terebintina	XXXVI
Phenobarbitalum matricum	457	Pilhas de trinitina	XXXVI
Phenolphthaleinum	460	Pilhas de valerianae	XXXVI
Phenolum	459	quina compostas	XXXVI, XLV
Pientolamini hydrochloridum	266	Pilhas hidragogas de Helm	XXXVI
Piencylphenol hydrochloridum	152	Pilhas siccative	XXXVI
Piencyhydrogari boras	600	Pipem	1114
Piencyhydrogari nitras	702	Pipi	XXXVI
Phenyl salicylas	455	Pirramido	105
Phenytolman	452	Pietro	XXXVI
Phthalylsulfathiazolum	1091	Pistina R	1092
Picrato de taraxolum R	661	Pistina Humano Normal Citratado	1099
Picrotoxina	651	Pitofato de sódio R	1092
Picrotoxinum	601	potofato ferroso	XXXVI
Pilocarpini hydrochloridum	326	Pisogol	1092
Pilocarpini nitras	326	Pisogol R	1092
Pirretro	651	Pingulal abalano SR	1108
Pilulae	NLI, 651	Pisoullito de abelo	375
Pilulas catarticas compostas	XXXVI	Plasma Humano Normal Citratado	652
Pilulas de aloés	XXXVI	Plasma Humano Normal Citratado Congelado	653
Pilulas de aloés compostas	XXXVI	Plasma Humano Normal Citratado Sico	653
Pilulas de aloés e asa-fetida	XXXVI		
Pilulas de aloés e ferro	XXXVI		

## Destaque: Ampliação do índice.

ESTADOS UNIDOS DO BRASIL		1249	
	Pág.	Pág.	
Perclorato de ferro .....	838	Pílulas de aloés e goma-guta ..	XXXVI
Perclorato de potássio R .....	1091	Pílulas de aloés e mirra .....	XXXVI
Perda por Dessecação .....	9	Pílulas de aloés e quina .....	XXXVI
Permanganato de potássio .....	647	Pílulas de alicina e fenoltaleína	XXXVI
Permanganato de potássio deci-		compostas .....	XXXVI
normal SV .....	1137	Pílulas de asa-fétida .....	XXXVI
Permanganato de potássio (0,1 N)	1108	Pílulas de carbonato de ferro	
Peroba .....	XXXVI	compostas .....	XXXVI, XLV
Perobinha campestre .....	XXXVI	Pílulas de carbonato ferroso	XXXVI,
Persulfato de amônio R .....	1091	.....	XLV
Persulfato de sódio R .....	1091	Pílula de cloreto mercúrico	
Peróxido de hidrogênio SR .....	1108	opíacas .....	XXXVI
Peróxido de magnésio .....	648	Pílulas de colochitide com	
Peróxido de manganês .....	XXXVI	postas .....	XXXVI
Peróxido de zinco .....	XLI, 649	Pílulas de cresoto .....	XXXVI
Peso Específico .....	1214	Pílulas de ferro, quinina,	

Fonte: SOARES, L M F. MPhUFOP (2025)

No decorrer dos anos foram formadas mais comissões de revisão, reunindo profissionais de todo o país, em resposta às necessidades (Farmacopeia Brasileira, 1977).

A 3ª edição da FB foi publicada em 1977, após intenso trabalho da comissão de Revisão da época, com a participação do Ministro da Saúde. Essa edição promoveu revisões minuciosas, incorporou novos métodos, reforçou a importância da uniformização baseada nas Farmacopeias Europeia e Internacional e fortaleceu a representatividade regional do país como a flora e recursos locais (Farmacopeia Brasileira, 1977).

Um marco relevante dessa edição foi a inclusão, pela primeira vez, de um método para detecção de pirogênios, um avanço para o controle de qualidade de medicamentos injetáveis. O método foi descrito pelo título “Pirogênio” como se pode observar na Figura 6 (Farmacopeia Brasileira, 1977).

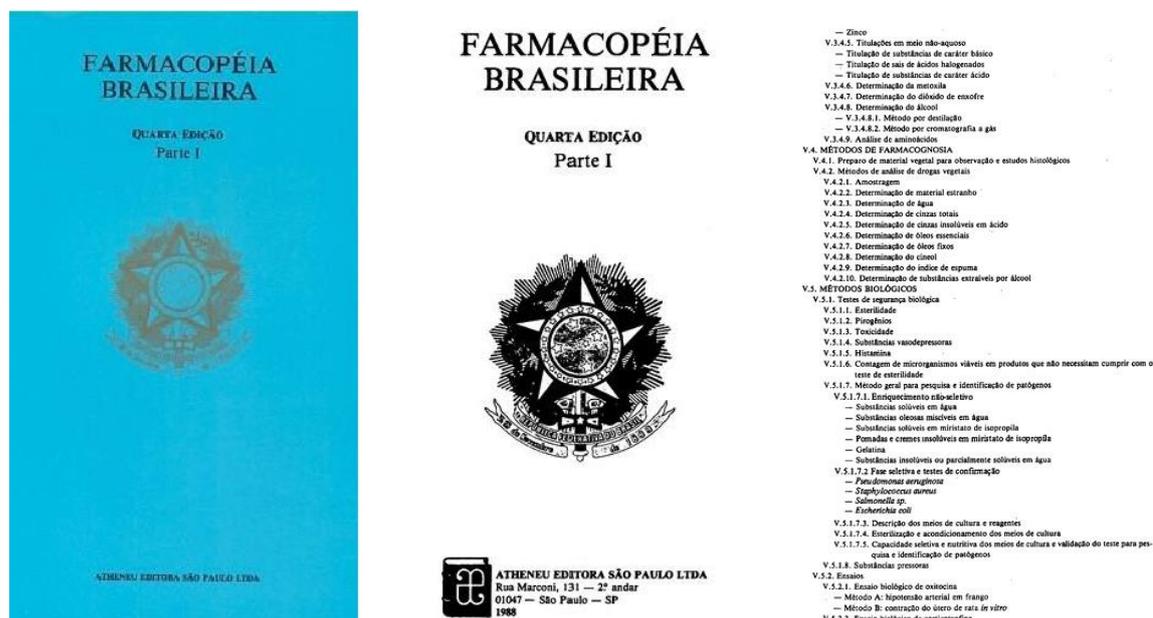
Figura 6 – Fotografia da folha de rosto e do índice da 3ª Farmacopeia Brasileira (1977)



Fonte: Elaboração própria (2025)

A 4ª edição da FB, publicada em 1988, teve um avanço significativo de atualização e modernização. Estes consistiram na subdivisão do compêndio em duas partes, além da ampliação do número de monografias. Na parte I, referente aos métodos gerais e capítulos, manteve e aperfeiçoou o método para detecção de pirogênios, além de descrever outros métodos e ensaios biológicos. Essa edição e posteriores estão disponíveis, por completo, no site da Anvisa (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>) como pode ser visto na Figura 7 (Farmacopeia Brasileira, 1988).

Figura 7 – Fotografia da capa, da folha de rosto e do conteúdo da 4ª Farmacopeia Brasileira (1988)

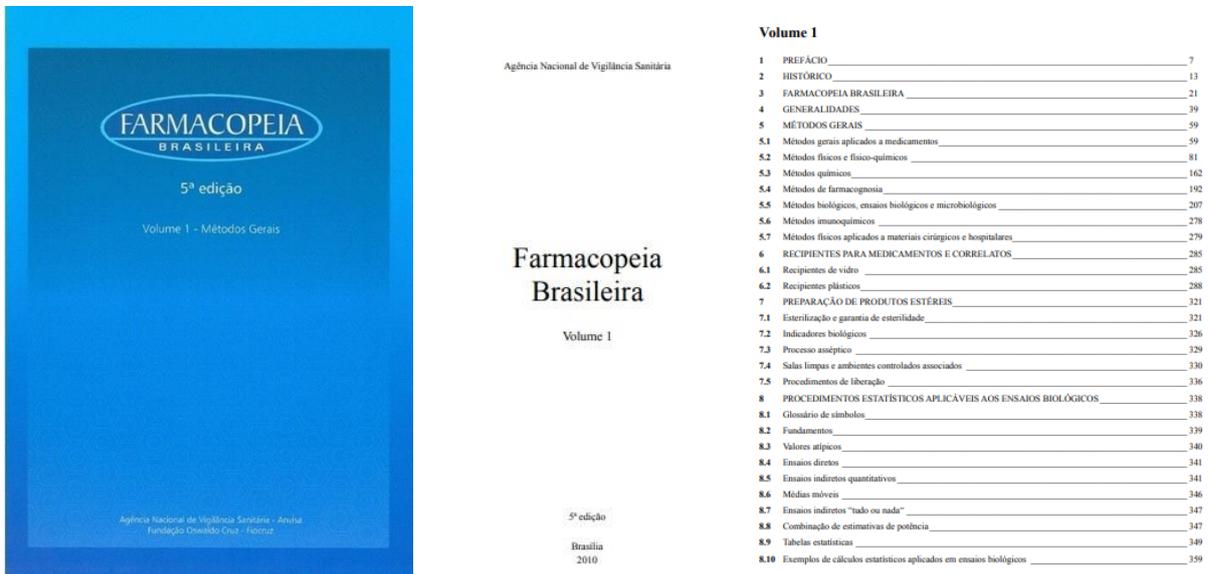


Fonte: Anvisa (2025)

Em 2010, foi publicada a 5ª edição da FB composta por dois volumes: volume 1 contendo métodos gerais e textos normativos e o volume 2 constando monografias, formas farmacêuticas e produtos relacionados. Ainda, foi determinado que todos os insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos sujeitos a vigilância sanitária deverão cumprir com os requisitos da FB (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Nessa edição, houve uma mudança significativa no controle de pirogênios e o teste tradicional realizado em coelhos passou a ser indicado somente quando não fosse possível utilizar métodos alternativos validados. Visto que, juntamente com essa mudança, foi adicionado a FB o Teste de Endotoxinas Bacterianas, também chamado de LAL. Na Figura 8, são apresentadas imagens desta edição (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Figura 8 – Fotografias da capa, da folha de rosto e do sumário da 5ª Farmacopeia Brasileira (2010)



Fonte: Anvisa (2025)

A 6ª edição da FB de 2019 representou uma grande revisão e modernização, em formato 100% digital de acesso gratuito (Farmacopeia Brasileira, 2019). Uma imagem desta edição está apresentada na Figura 9.

Figura 9 – Fotografia da capa, da folha de rosto e do sumário da 6ª Farmacopeia Brasileira (2019)



Fonte: Anvisa (2025)

Tanto na FB 6ª (2019) e na FB 7ª (2024) foram mantidos dois volumes: Volume 1 Métodos Gerais e Capítulos e o volume 2 formado pelos Correlatos, Insumos Farmacêuticos e Especialidades, Gases Medicinais, Hemocomponentes e Hemoderivados, Plantas Medicinais, Produtos Biológicos e Radiofármacos. Os testes para detecção de pirogênios em coelhos e LAL foram mantidos. Na 7ª edição passou a constar o Teste de Ativação de Monócitos (MAT). Trata-se de um método alternativo *in vitro*, que tem ampla capacidade de detecção de pirogênios e se alinha aos princípios dos 3Rs (Farmacopeia brasileira 2019; 2024), conforme pode ser visto na Figura 10.

Figura 10 – Fotografia da folha de rosto e do sumário da 7ª Farmacopeia Brasileira (2024)

Farmacopeia Brasileira, 7ª edição	
5.5.2.4 SUBSTÂNCIAS VASOPRESSORAS	MG5.5.2.4-00
5.5.2.5 HISTAMINA	MG5.5.2.5-00
5.5.2.6 SUBSTÂNCIAS VASODEPRESSORAS	MG5.5.2.6-00
5.5.2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE PIROGÊNIOS	MG5.5.2.7-00
5.5.2.7.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS	MG5.5.2.7.1-00
5.5.2.7.2 TESTE DE PIROGÊNIOS EM COELHOS	MG5.5.2.7.2-01
5.5.2.7.3 TESTE DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS	MG5.5.2.7.3-02
5.5.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	MG5.5.3-04
5.5.3.1 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS NÃO ESTÉREIS	MG5.5.3.1-00
5.5.3.1.1 CONDIÇÕES GERAIS	MG5.5.3.1.1-00
5.5.3.1.2 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE MICRO-ORGANISMOS MESOFÍLICOS	MG5.5.3.1.2-01
5.5.3.1.3 PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS	MG5.5.3.1.3-01
5.5.3.1.4 ADEQUAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS	MG5.5.3.1.4-01
5.5.3.1.5 LIMITES MICROBIANOS	MG5.5.3.1.5-02
5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS	MG5.5.3.2-00
5.5.3.2.1 TESTE DE ESTERILIDADE	MG5.5.3.2.1-02
5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	MG5.5.3.3-01
5.5.3.3.1 ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR	MG5.5.3.3.1-00
5.5.3.3.2 ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR TURBIDIMETRIA	MG5.5.3.3.2-00
5.5.3.4 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	MG5.5.3.4-01
5.5.3.5 MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS EM TESTES E ENSAIOS	MG5.5.3.5-01
5.5.3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA PARA USO FARMACÉUTICO	MG5.5.3.6-00
5.5.3.6.1 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS	MG5.5.3.6.1-00
5.5.3.6.2 PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E FECALIS	MG5.5.3.6.2-00
5.5.3.6.3 PESQUISA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MG5.5.3.6.3-01
5.6 MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS	MG5.6-00
5.7 MÉTODOS FÍSICOS APLICADOS A MATERIAIS CIRÚRGICOS E HOSPITALARES	MG5.7-00
5.7.1 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO	MG5.7.1-00
5.7.2 DIÂMETRO DE SUTURAS	MG5.7.2-00
5.7.3 RESISTÊNCIA AO ENCASTOAMENTO DA AGULHA	MG5.7.3-00
5.7.4 DETERMINAÇÃO DE ABSORÇÃO	MG5.7.4-00
5.7.5 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DA FIBRA	MG5.7.5-00
5.8 MÉTODOS GERAIS APLICADOS A CASES MEDICINAIS	MG5.8-00
5.8.1 DETERMINAÇÃO DE GASES	MG5.8.1-00

Fonte: Anvisa (2025)

## 5.2 Comparação de métodos farmacopeicos relativos à determinação de pirogênios, disponíveis na Farmacopeia Brasileira com os métodos das Farmacopeias Americana e Europeia.

Em concordância com o fato de cada Farmacopeia trazer abordagens próprias, salvo algumas harmonizações, torna-se relevante comparar os métodos acerca de detecção de pirogênios descritos nas Farmacopeias Brasileira (FB 7ª ed.), Europeia (EP 11.0) e Americana (USP 44).

Em 1989, foi formado o Grupo de Discussão Farmacopeica (PDG) com o intuito de harmonizar os padrões farmacopeicos em três grandes regiões do mundo, sendo composto inicialmente pelas farmacopeias da Europa, Estados Unidos e Japão. Essa harmonização pode ser completa, capítulo todo, ou por parte, onde somente parte do capítulo é harmonizado. Com isso, a harmonização torna o processo mais simples para os fabricantes por não haver muita variação entre regiões (Pharmacopeial Discussion Group).

### 5.2.1 Conceito

#### Teste de pirogênios

O teste de pirogênios, de acordo com os capítulos gerais da Farmacopeia Brasileira (FB 7<sup>o</sup> ed), é fundamentado na resposta febril indicada pelo aumento da temperatura corporal dos coelhos após receberem uma injeção intravenosa da solução estéril em análise. Visando, assim, verificar a presença de substâncias pirogênicas que comprometam a segurança do produto (Farmacopeia Brasileira, 2024).

De forma semelhante, na Farmacopeia Europeia (EP 11.0) também é definido que o teste de pirogênios consiste em mensurar a elevação da temperatura corporal provocada em coelhos após injeção intravenosa da substância em análise, igualmente com o propósito de detectar pirogênios que possam induzir reação febril (European Pharmacopoeia, 2022).

Já na Farmacopeia Americana (USP 44), embora adote o mesmo princípio experimental, destaca que o teste é projetado para limitar, a um nível aceitável, os riscos das reações febris em pacientes humanos, causadas pela injeção intravenosa do produto em questão. Ou seja, o foco está tanto na detecção quanto na minimização de riscos clínicos, mantendo o mesmo procedimento de observação da resposta térmica em coelhos (United States Pharmacopeia, 2021).

Assim, as três farmacopeias mantêm fundamento técnico semelhante, com ênfase na observação da reação febril em coelhos como indicador da presença de pirogenios, diferenciando-se apenas na forma de apresentação e nos enfoques regulatórios e clínicos.

#### Teste de endotoxinas bacterianas

Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB 7<sup>o</sup> ed.), o teste de endotoxina bacteriana tem como objetivo detectar ou quantificar endotoxinas de bactérias gram-negativas

presentes em amostras para quais o teste é recomendado. O método utiliza o reagente de lisado de amebócitos de *Limulus sp.* (LAL) e apresenta duas técnicas descritas nos capítulos gerais com diferente sensibilidade para este teste: método de coagulação em gel e métodos fotométricos, que se subdividem em turbidimétrico e cromogênico. Ainda, ressalta que se pode realizar qualquer um destes procedimentos, salvo quando indicado um ou outro na monografia do produto (Farmacopeia Brasileira, 2024).

De acordo com a Farmacopeia Europeia (EP 11.0) o procedimento intitulado “Bacterial endotoxins test”, abreviado como BET, também é utilizado para detectar ou quantificar endotoxinas provenientes de bactérias gram-negativas, fazendo uso do lisado de amebócitos do *Limulus polyphemus* (popularmente denominado caranguejo-ferradura) ou do *Tachypleus tridentatus*. No texto da EP, são descritas três técnicas para realizá-lo: técnica do coágulo em gel, técnica turbidimétrica e técnica cromogênica e seis métodos, de A a F, em que, pode-se utilizar qualquer um destes. Em caso dúvida, o método A será o de escolha (European Pharmacopoeia, 2022).

Já a Farmacopeia Americana (USP 44), por estar harmonizada com a EP, adota os mesmos princípios e técnicas descritas pela EP 11.0. Na USP também estão reconhecidas as três abordagens metodológicas (coágulo em gel, turbidimétrica e cromogênica) e reforça que, em caso de dúvida ou controvérsia, a decisão deve se basear no teste de limite com coágulo em gel, salvo indicação contrária na monografia do produto em teste (United States Pharmacopoeia, 2021).

Assim, com o intuito de evitar a contaminação por endotoxinas em produtos farmacêuticos, observa-se uma convergência entre os capítulos das farmacopeias internacionalmente reconhecidas EP e USP. Por outro lado na FB 7ª ed. tem-se um alinhamento parcial onde são utilizados os mesmos princípios, mas com variação na terminologia e número de procedimentos para determinação dos resultados (European Pharmacopoeia, 2022).

## Teste de ativação de monócitos - MAT

O teste de ativação de monócitos (MAT), conforme descrito na FB tem como objetivo determinar a quantidade pirogênios do tipo endotoxina bacteriana e não-endotoxina (NEPs) em produtos de administração parenteral. Essa detecção ocorre por meio de mediadores endógenos, como as citocinas, que são liberadas por monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas em resposta a contato com pirogênios. A aplicação do teste requer a adequação produto-específica, que é demonstrada seguindo as etapas descritas para este fim contidas nos capítulos gerais das farmacopeias (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP, de forma semelhante, é descrito que o método visa detectar ou quantificar substâncias capazes de ativar monócitos humanos ou células monocíticas, resultando na liberação mediadores endógenos, como citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, o que permite inferir a presença de pirogênios na amostra. Também, deve ser realizada a validação específica para o produto. Além disso, amostras contendo pirogênios do tipo não-endotoxina devem ser testadas em diluições variadas, incluindo a diluição mínima, para garantir a sensibilidade (European Pharmacopoeia, 2022).

Por outro lado, o MAT não está descrito nos capítulos gerais da USP, apesar de serem reconhecidos métodos alternativos *in vitro* em contextos específicos. O uso do MAT ainda não está formalmente incorporado como método oficial nos textos principais da USP (United States Pharmacopeia, 2021).

Portanto, observa-se que tanto na FB quanto na EP é reconhecido e regulamentado o uso do MAT como método válido para a detecção de pirogênios em produtos injetáveis, com ênfase na validação produto-específica e na capacidade do método de detectar NEPs.

A seguir a Tabela 1 apresenta um resumo dos métodos, aplicações, limitações, vantagens e desvantagens dos testes para determinação de pirogênio descritos nas Farmacopeias Brasileira, Europeia e americana.

Tabela 1 – Resumo dos testes para determinação de pirogênios descritos nas farmacopeias Brasileira, Europeia e Americana  
(Continua)

Teste	Farmacopeias	Métodos (5.2.2)	Aplicações (5.2.3)	Limitações (5.2.4)	Vantagens (V) e Desvantagens (D) (5.2.5)
Pirogênios	FB	Injeção intravenosa (IV) em coelhos com monitoramento da temperatura	Produtos injetáveis bem tolerados pelos animais.	Uso de animais vivos, inadequação para determinadas amostras e sensibilidade limitada.	V=Detecção pirogênios totais e padronização D= Uso de animais vivos, complexidade operacional
	EP		Substâncias estéreis de administração parenteral.		
	USP		Para produtos injetáveis e dispositivos médicos, bem tolerados pelos		
Ativação de Monócitos (MAT)	FB	São descritos 2 métodos: Semi-quantitativo e Comparação com lote controle.	Produtos de administração parenteral, com validação produto-específica.	Exige adequabilidade produto-específica, probabilidade sofrer interferências entre outras limitações técnicas.	V= Detecção de pirogênios totais totalmente in vitro. D= validação rigorosa e alto custo operacional.
	EP	São descritos 3 métodos: A) Quantitativo (comparação com curva-padrão de endotoxina), B) Semi-quantitativo (comparação com concentrações críticas), C) Comparação com lote referência.			
	USP				

					(Continuação)
Teste	Farmacopeias	Métodos (5.2.2)	Aplicações (5.2.3)	Limitações (5.2.4)	Vantagens (V) e Desvantagens (D) (5.2.5)
<b>Endotoxinas Bacterianas</b>	<b>FB</b>	São descritas 2 técnicas: Coagulação em gel e Fotométricas, que se subdivide em: turbidimétrica e cromogênica.	Produtos parenterais, e produtos que necessitam comprovação do limite de endotoxina.	Não detecta NEPs, alta probabilidade de sofrer interferências.	V= Alta sensibilidade, variedade de métodos. D= validação rigorosa, reagente biológico.
	<b>EP</b>	São descritos 6 métodos: A) Coagulação em gel: teste limite, B) Coagulação em gel: teste quantitativo, C) Turbidimétrico cinético, D) Cromogênico cinético, E) Cromogênico de ponto final, F) Turbidimétrico de ponto final.	Produtos parenterais (biológicos, dispositivos médicos, vacinas).		
	<b>USP</b>	São descritos 3 métodos: Coagulação em gel, Turbidimétrico e cromogênico	Produtos parenterais (antibióticos, biológicos, dispositivos médicos).		

Fonte: Autor (2025)

## 5.2.2 Métodos

### Teste de pirogênios

Na FB, está descrito que para realizar o teste de pirogênios deve-se:

- Selecionar coelhos do mesmo sexo, adultos,  $\geq 1,5$  kg;
- Condicioná-los em gaiolas individuais, com temperatura entre 20-23 °C, livre de perturbações, em até 7 dias;
- Utilizar termômetro clínico calibrado com precisão de  $\pm 0,1$  °C, com profundidade de inserção de 6 cm;
- Não os alimentar nas 2 horas anteriores, água é permitida podendo ser restringida durante o teste;
- Determinar a temperatura controle por 2 leituras, com 30 min intervalo, pelo menos 40 minutos antes;
- Injetar pela veia marginal da orelha de 0,5 a 10 mL/kg (ou conforme monografia) aquecido a  $37 \pm 2$  °C, em até 10 minutos;
- Registrar as temperaturas a cada 30 minutos, durante 3 horas.

Coelhos que tiverem variação  $\geq 0,5$  °C no condicionamento, que apresentem temperatura inicial maior 39,8 °C e/ou que variem, de um para o outro, mais 1,0 °C deverão ser excluídos.

Para realizar o teste, proceder conforme a Tabela 2:

Tabela 2 – Etapas do Teste de pirogênios descritas na Farmacopeia Brasileira

Teste	Número de coelhos	Temperatura (°C)	Resultado
1º	3	Nenhum coelho com aumento individual $\geq 0,5$ °C	Produto Aprovado
		Pelo menos 1 coelho com aumento individual $\geq 0,5$ °C	Repetir o teste
2º	+5 (total = 8)	No máximo 3 coelhos com aumento individual $\geq 0,5$ °C e/ou somatório $\leq 3,3$ °C	Produto Aprovado
		Mais de 3 coelhos com aumento individual $\geq 0,5$ °C e/ou somatório $> 3,3$ °C	Produto Reprovado

Fonte: Elaboração própria (2025)

Na EP, apresenta semelhanças com a FB, como temperatura controle e volume a ser injetado, e diferenças no procedimento do teste:

- Inserir dispositivo de medição com profundidade de 5 cm.
- Não os alimentar na noite anterior até o fim do teste
- Não dar água durante o teste.

E, ainda, exige realização de pré-teste, como descrito abaixo:

- Injetar 10 mL/kg salina apirogênica, aquecida a  $\sim 38,5$  °C;
- Excluir animal se a variação  $> 0,6$  °C;
- A injeção deve ser realizada em até 4 minutos ou conforme monografia;
- Registrar temperaturas, a cada 30 minutos, em até 3 horas após e começar 90 minutos antes do teste.

Os coelhos selecionados não podem ter sido utilizados em teste com substância pirogênica nas últimas 3 semanas e nem utilizados há 3 dias. Condicionar pelo menos 18 horas antes.

Coelhos que tiverem variação  $> 0,2$  °C em 2 leituras sucessivas e temperatura inicial superior a  $39,8$ °C ou inferior a  $38,0$ °C deverão ser excluídos (European Pharmacopoeia, 2022).

O teste deve ser realizado, conforme a Tabela 3:

Tabela 3 – Etapas do Teste de pirogênicos - Farmacopeia Europeia

Teste	Número de coelhos	Faixa de temperatura (°C)	Resultado
1º	3	$\leq 1,15$ °C	Produto Aprovado
		$> 1,15$ e $\leq 2,65$	Repetir o teste
		$> 2,65$ °C	Produto Reprovado
2º	+3	$\leq 2,80$ °C	Produto Aprovado
		$> 2,80$ e $\leq 4,30$	Repetir o teste
		$> 4,30$	Produto Reprovado
3º	+3	$\leq 4,45$	Produto Aprovado
		$> 4,45$ e $\leq 5,95$	Repetir o teste
		$> 5,95$	Produto Reprovado
4º	+3 (total = 12 animais)	$\leq 6,60$	Produto Aprovado
		$> 6,60$	Produto Reprovado

Fonte: Adaptado de EP (2023)

Na USP, por sua vez, o texto assemelha-se mais com a FB quanto a seleção dos animais, condicionamento, preparo, variação de temperatura durante o teste e interpretação dos resultados. No entanto, difere em:

- Inserir o dispositivo de medição de temperatura até 7,5 cm;
- Medir a controle (temperatura basal) em até 30 minutos anteriores ao teste;
- Injetar 10 mL/ kg (ou conforme monografia)

- Registrar temperatura em intervalos de 30 minutos de 1 a 3 horas após injeção.

Se for a primeira vez que coelho é utilizado, é necessário condicioná-lo com teste simulado (exceto a injeção) por 7 dias anteriores;

Coelhos utilizados com frequência superior a 1x a cada 48 horas e/ou que tiverem aumento de  $\geq 0,6$  °C ou recebido amostra pirogênica em menos de 2 semanas, devem ser excluídos do teste (United States Pharmacopeia, 2021).

### Teste de endotoxinas bacterianas

Na FB, há duas técnicas para este teste:

- **Técnica de coagulação em gel**

É baseado na formação de um coágulo visível (gel firme) quando o reagente LAL reage com endotoxinas. Ocorre por meio da ativação da cascata enzimática do lisado dos amebócitos. Esse teste objetiva identificar e quantificar endotoxina por meio de diluições (semi-quantitativo), pela formação de gel em cada uma.

Assim, é necessário garantir a precisão e validação do teste, mediante a confirmação da sensibilidade do LAL e a realização do teste de interferências pelo método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização). Ambos, devem apresentar resultados entre  $\geq 0,5 \lambda$  e  $\leq 2 \lambda$ , para serem válidos.

O teste limite por coagulação em gel visa determinar se a amostra contém endotoxinas abaixo do limite especificado, quando indicado na monografia.

- **As técnicas fotométricas quantitativas para determinação do coágulo são:**

- **Turbidimétrica:** Quando o reagente LAL entra em contato com a endotoxina, ocasiona a formação de partículas coaguladas que aumentam a turbidez. Dessa forma, quanto mais turvo estiver maior a quantidade de endotoxina.

- **Cromogênica:** Quando o reagente LAL é ativado pela endotoxina, gera a liberação de um cromóforo (mudança de cor).

As formas de leitura podem ser subdivididas em:

- **Ponto final (*endpoint*)** em que a absorbância é medida ao final da reação e;
- **Cinética** na qual a absorbância é medida durante o desenvolvimento da turbidez ou cor, baseada no tempo de reação ou na velocidade de formação.

Contudo, devem ser realizados os testes preparatórios: Critérios para curva padrão que deverá resultar no coeficiente de correlação linear  $\geq 0,98$  e o teste para fatores de interferência para as técnicas fotométricas, cujo resultado, deverá estar na faixa entre 50% e 200% de recuperação (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP, são descritos os mesmos princípios gerais, diferenciando os métodos de A a F:

**A) Coagulação em gel (Gel-clot): teste limite**, baseada na formação de gel, visa verificar se amostra está abaixo ou acima do limite permitido de endotoxina;

**B) Coagulação em gel (Gel-clot): teste quantitativo**, seguindo o mesmo princípio e diferentemente do anterior, serve para estimar a concentração de endotoxinas na amostra;

**C) Turbidimétrico cinético**, mede a turbidez por leitura fotométrica, ocasionada pela reação entre a endotoxina e o LAL durante o teste;

**D) Cromogênico cinético**, mede o tempo necessário para a mistura da reação atingir a taxa de desenvolvimento de cor;

**E) Cromogênico de ponto final**, é baseado na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a quantidade de cromóforo liberado no final;

**F) Turbidimétrico de ponto final**, também mede a turbidez por leitura fotométrica, porém, diferentemente do cinético é realizada após finalizar do teste.

Assim, como na FB, para realizar os testes acima são necessários teste preliminares para confirmar a sensibilidade e verificar a existência de interferentes na amostra, com mesmas exigências (European Pharmacopoeia, 2022).

Na USP, são apresentados 3 métodos (coagulação em gel, turbidimétrico e cromogênico), sendo realizados todos os testes descritos na EP. Isto ocorre por que

seguem o mesmo princípio técnico e científico devido a harmonização das farmacopeias Europeia e Americana. (European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopoeia, 2021).

Os textos das farmacopeias descritas são muito semelhantes. No mais, utilizam o método de coagulação em gel como método referência ou decisivo, em caso de dúvida.

#### Teste de ativação de monócitos - MAT

Na FB, são apresentados dois métodos:

- **Método I – Teste semi-quantitativo**, é utilizada uma curva dose-resposta do padrão de endotoxina de referência para verificar se a amostra está de acordo (abaixo ou acima do padrão).
- **Método II – Teste por comparação com lote controle\***, é realizado por comparação da amostra com um lote controle, previamente validado.

\* “Caracteriza-se como lote controle aquele que se mostrou seguro e eficaz por meio de estudo clínico ou um lote representativo desse, previamente aprovado em todos os testes de liberação” BRASIL (2024, p. 536).

De forma simplificada, seguem as etapas do procedimento geral:

- Preparar a fonte de monócitos;
- Preparar as soluções da amostra e os controles;
- Inocular;
- Realizar as leituras e analisá-las de acordo com o método I ou II.

No entanto, antes de aplicar o método de escolha deve-se realizar testes preparatórios (descritos para cada) visando garantir a adequabilidade produto-específica (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP (2022), são descritos os 3 métodos abaixo:

**A. Quantitativo**, envolve comparação da preparação de amostra examinada com uma curva dose-resposta de endotoxina padrão. Tem intuito de saber quanta endotoxina há na amostra.

**B. Semi-quantitativo**, é utilizado para comparar a amostra com a endotoxina padrão.

**C. Comparação com lote referência**, é realizado por comparação da amostra com um lote de referência validado.

Na USP, o MAT não está descrito em seus capítulos gerais (United States Pharmacopeia, 2021).

### 5.2.3 Aplicações

#### Teste de pirogênios

Na FB, o teste de pirogênios pode ser realizado para produtos injetáveis bem tolerados pelos animais, no qual a substituição por métodos *in vitro* não seja viável. Para produtos que exijam condições especiais, deve-se seguir o que está especificado nas respectivas monografias (Farmacopeia Brasileira, 2024).

O teste de pirogênios é citado com mais frequência em monografias de produtos que constam no volume II, seções de Hemocomponentes e Hemoderivados (n= 10); Insumos Farmacêuticos e Especialidades (n= 7) e Produtos Biológicos (n= 7). Em alguns casos, na monografia está definido o volume da amostra utilizada no teste. Por exemplo, na monografia da solução injetável de cloranfenicol, o teste em coelhos é permitido com a injeção de 2,5 mL/kg utilizando uma solução a 2 mg/mL (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Por outro lado, não há menção direta ao teste nas monografias de produtos contidos na seção de Dispositivos Médicos. No entanto, segundo Freitas, além dos injetáveis, dispositivos médicos utilizados em procedimentos como seringas, agulhas e bolsas de sangue também devem ser analisados quanto à presença de pirogênios (Freitas, 2008 apud Silva, 2015).

Na EP está estabelecido que o teste é aplicável a substâncias estéreis de administração parenteral, também restringe como última escolha de teste (European Pharmacopoeia, 2022).

Em coerência com as demais, na USP, o método é aplicável em produtos injetáveis, com boa tolerabilidade pelos animais. Especificamente no caso de antibióticos e produtos biológicos, o uso do método deve ser realizado de forma complementar, conforme os regulamentos federais aplicáveis (United States Pharmacopeia, 2021).

Um diferencial da USP em relação a FB e a EP é a inclusão explícita de dispositivos médicos e conjuntos de injeção entre os produtos testáveis. Para esses casos, a testagem deve ser feita por meio da análise de água de lavagens ou de enxágues das superfícies do dispositivo que estarão em contato com soluções parenterais ou tecidos internos (United States Pharmacopeia, 2021).

Em suma, as três farmacopeias reconhecem o teste de pirogênios como método válido, mas adotam enfoques distintos quanto à sua aplicação. Na FB apresenta uma abordagem mais objetiva e, em casos específicos, admite o uso de farmacopeias estrangeiras. No entanto, não é detalha a aplicação do teste em dispositivos médicos, sendo necessário recorrer à literatura complementar (Freitas, 2008 apud Silva, 2015). Já na EP, tem-se enfoque na parte técnica do teste. O texto da USP é mais abrangente, combinando rigor técnico com orientações sobre a aplicação do teste, incluindo produtos injetáveis, biológicos, antibióticos e dispositivos médicos.

#### Teste de endotoxinas bacterianas

De acordo com os métodos gerais da FB, o teste de endotoxinas bacterianas pode substituir o teste de pirogênios, desde que haja comprovação da ausência de NEPs e validação produto-específica. Ou seja, é indicado para avaliação da presença de endotoxinas (LPS) em qualquer produto de administração parenteral (Farmacopeia Brasileira, 2024).

O teste de endotoxinas bacterianas é citado com mais frequência em monografias de produtos que constam no volume II, seções de Insumos Farmacêuticos e Especialidades (n= 67); Produtos Biológicos (n= 25) e

Radiofármacos (n=6). Em alguns casos, na monografia está definido o volume da amostra utilizada no teste (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP, o BET é indicado para substâncias administradas por via parenteral para evitar contaminação por endotoxinas, incluindo produtos biológicos, vacinas, dispositivos médicos e produtos derivados de sangue, sempre que as monografias estabeleçam limites específicos. Também, incentiva o uso de reagentes recombinantes, como o Fator C (rFC) como alternativa ao LAL, visando à redução do impacto ambiental e à adesão aos princípios dos 3Rs (European Pharmacopoeia, 2022).

Por sua vez, na USP, também está descrito que o teste de endotoxinas bacterianas é aplicável em produtos injetáveis, incluindo antibióticos, soluções intravenosas, produtos biológicos, hemoderivados e dispositivos médicos. A aplicação do teste está condicionada a sua indicação na monografia e deve ser acompanhada de validação da ausência de interferentes e verificação da sensibilidade do sistema (United States Pharmacopeia, 2021).

Em síntese, nos capítulos gerais das três farmacopeias são descritos os procedimentos a serem utilizados. No caso de dúvida ou disputa, o procedimento de coagulação em gel será o método de escolha.

#### Teste de ativação de monócitos - MAT

O teste de ativação de monócitos (MAT) é descrito na FB como método alternativo e oficial para detecção de pirogênios totais em produtos de administração parenteral. Sendo reconhecido como substituto ao teste de pirogênios, desde que devidamente validado, aplicável a produtos farmacêuticos administrados por via parenteral (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP, é igualmente reconhecido como substituto oficial ao teste de pirogênios, sendo aplicável a todos os produtos farmacêuticos de uso parenteral. Além disso, recomenda que seja considerado o método de escolha para novos produtos parenterais (European Pharmacopoeia, 2022).

Já na USP (2021)., o MAT ainda não foi incorporado em seus capítulos oficiais, o que limita sua aplicabilidade. No entanto, segundo o método é reconhecido pela

Food and Drug Administration (FDA) como método alternativo ao teste de pirogênios desde que seja validado conforme o produto, o que permite sua aplicação prática (European Pharmacopoeia, 2022; FDA, 2012 apud Spoladore, 2021).

Em suma, a FB e a EP já incorporaram o teste de ativação de monócitos como método oficial, apresentando variações em relação a metodologia de aplicação. Embora a USP adote posição mais conservadora, há uma brecha regulatória devido ao reconhecimento do teste pela FDA.

#### 5.2.4 Limitações

##### Teste de pirogênios

O teste de pirogênios em todas as farmacopeias (FB, EP e USP) apresenta consideráveis limitações técnicas e metodológicas que restringem sua aplicação. Pelo uso de animais vivos, sabe-se que há variabilidade biológica e, mesmo com controles rigorosos, coelhos diferentes podem reagir de forma distinta a mesma amostra, que compromete a reprodutibilidade (Williams, 2007 apud Silva, 2018).

Outra limitação está na inadequação para testar algumas classes de medicamentos como anti-inflamatórios, analgésicos e antitérmicos que podem mascarar a resposta febril e resultar falso-negativo (Williams, 2007 apud Silva, 2018). Além disso, a sensibilidade também é limitada no teste uma vez que, quantidades muito pequenas de pirogênios podem não provocar aumento de temperatura suficiente para detecção (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopoeia, 2021).

Por fim, as farmacopeias desatacam que o método não deve ser utilizado quando existirem alternativas validadas, como LAL ou MAT. Com isso, tem-se notícia que a EP removerá o teste de pirogênios de suas monografias, visando reduzir o uso de animais em testes farmacopeicos (Eckford, 2024). No mais, a FB também recomenda a substituição, sempre que possível e a USP, por sua vez, recomenda a substituição do teste pelos *in vitro* desde que também sejam validados (Farmacopeia Brasileira, 2024; United States Pharmacopoeia, 2021).

## Teste de endotoxinas bacterianas

A principal limitação do teste de endotoxinas bacterianas, em todas as farmacopeias, é em relação a sua capacidade, restrita a endotoxinas bacterianas Gram-negativas, ou seja, não detecta outros tipos de pirogênios (Gram-positivas, vírus, fungos, ou componentes celulares) (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopoeia, 2021). Com isso, pode ocasionar a aprovação de um produto contaminado com NEPs.

Outra limitação, é a possibilidade de interferência causada pelo processo de fabricação e pelos componentes do produto testado (solventes, sais, excipientes) (Spoladore, 2021). Visto que podem apresentar características que têm interação com o reagente ou método, prejudicando a eficácia do teste e gerar falsos negativos (inibe a reação) ou falsos positivos (ativação não específica) (Schindler, 2009; Spreitzer, 2002 apud Kim, 2021).

## Teste de ativação de monócitos - MAT

Na FB, são descritas limitações para aplicação do teste de ativação de monócitos (MAT). Entre elas, destaca-se a necessidade de validação produto-específica, ou seja, o método deve ser demonstrado como adequado para cada tipo de produto a ser testado. Além disso, a presença de fatores interferentes pode comprometer resultados, exigindo avaliação criteriosa. Um aspecto relevante é a inadequação do método para produtos que ativam monócitos, por si próprios, e para certos produtos, devido a limitações técnicas de compatibilidade com o ensaio. Também, descreve sobre a necessidade de diluições específicas, para garantir a sensibilidade em relação aos NEPs (Farmacopeia Brasileira, 2024).

Na EP, também são abordadas limitações do MAT sendo a validação produto-específica um dos principais requisitos, sendo requisito indispensável para a aplicação do método. Ainda, discorre acerca da não indicação do teste para produtos que intrinsecamente estimulam a liberação de citocina ou estão contaminados com ela. A

EP também reconhece a possibilidade de interferência na resposta devido a variabilidade de doadores, o que justifica a exigência do teste de comparação com o lote referência. Semelhante a FB, apresenta a limitação das linhagens celulares contínuas, especialmente para detecção de NEPs, além de ressaltar a importância de empregar diferentes diluições da amostra para garantir a detecção precisa desses contaminantes (European Pharmacopoeia, 2022).

Na USP, o MAT não está descrito em seus capítulos gerais (United States Pharmacopeia, 2021).

### 5.2.5 Vantagens e desvantagens

#### Teste de pirogênios

Nas três farmacopeias, têm-se a confirmação de que o teste de pirogênios é vantajoso principalmente por sua capacidade de detectar todos os tipos de pirogênios, incluindo NEPs. Com isso, é aplicável a produtos que não podem ser avaliados por métodos *in vitro* (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopeia, 2021; Kim, 2021).

No mais, a longa história de confiabilidade e padronização do método, também são destaques. Além disso, na USP descreve que pode ser aplicado em lavagens de dispositivos médicos e formulações com partículas ou radionuclídeo (United States Pharmacopeia, 2021).

Em contrapartida, desvantagens significativas são destacadas sendo, a principal, em relação ao uso de animais (*in vivo*). Isto, impacta diretamente em questões éticas e regulatórias (princípio dos 3Rs) visto que o processo envolve administração intravenosa, jejum, monitoramento retal por 3 horas (Hartung, et al, 2001; Presgrave, 2003 apud Silva, 2015; Farmacopeia Brasileira, 2024).

Além disso, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2024) a complexidade operacional, pode ser uma desvantagem significativa. Visto que exige instalações específicas, controle ambiental, profissionais preparados com o manejo dos animais e sistema de aferição de temperatura preciso. Com isso, o método tem uma logística

complexa, cara e demorada. Ainda que, seja um método amplamente utilizado as desvantagens e inclusão de novos métodos o tornam menos atrativo e justificam sua substituição (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopeia).

#### Teste de endotoxinas bacterianas

Nas três farmacopeias, as principais vantagens reconhecidas são: a alta sensibilidade e a especificidade em detectar LPS de bactérias Gram-negativas. Além disso, a possibilidade de escolha dentre os diferentes métodos que podem ser aplicados e por não ter uso de animais de forma direta, é um avanço em questões éticas (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; United States Pharmacopeia, 2021).

O método também apresenta desvantagens significativas como a necessidade de validação rigorosa do método para cada produto testado, incluindo testes de sensibilidade do reagente LAL, curva-padrão, verificação de fatores interferentes, cálculo da máxima diluição válida (MDV) e adequabilidade. Isso torna o processo mais oneroso, demorado e complexo (Hartung et al., 2001; Shindler et al, 2009 apud Lopes 2011). Além disso, o teste depende de um reagente de origem biológica, o LAL, cuja extração impacta ambientalmente e trata-se de uma limitação de sustentabilidade e disponibilidade a longo prazo (Hoffmann et al., 2005 a; Schindler et al., 2009; Bachinski et al., 2010 apud Lopes, 2011).

#### Teste de ativação de monócitos - MAT

A principal vantagem do MAT, reconhecida tanto pela FB quanto pela EP, é a capacidade de detecção de pirogênios totais, ou seja, o método *in vitro* pode substituir totalmente o teste de pirogênios, eliminando o uso de animais. Inclusive, é recomendado que o MAT seja teste de escolha sempre que possível e com validação produto-específica. Ainda, por simular a resposta fisiológica da febre, tem maior

similaridade com a resposta humana (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022).

Por outro lado, a complexidade da validação do método, custos operacionais, possível variabilidade de resposta (sangue fresco), são desvantagens reconhecidas pelas farmacopeias (Farmacopeia Brasileira, 2024; European Pharmacopoeia, 2022; Silva, 2015).

### **5.3 Redação de uma diretriz para aula prática sobre o teste de ativação de monócitos inserido na 7ª edição da Farmacopeia Brasileira.**

O conceito sobre o teste de ativação de monócitos foi apresentado no item 4.2.1 e com base nas informações contidas nos capítulos gerais de Farmacopeia Brasileira 7ª edição foi proposta diretriz para roteiro para aula prática empregando o MAT.

#### **5.3.1 Diretriz para aula Prática**

Teste de ativação de Monócitos ( MAT) – Farmacopeia Brasileira (FB) 7ª edição

**Objetivo:** determinar a quantidade de pirogênios do tipo endotoxina bacteriana e não-endotoxina (NEPs).

**Aplicação:** produtos de administração parenteral (vacinas, soros hiperimunes, medicamentos e outras soluções injetáveis, além de soluções para conservação de órgãos, diálise peritoneal, dispositivos médicos, produtos veterinários, entre outros).

**Fundamentação:** essa detecção se baseia na liberação de mediadores endógenos, como as citocinas pró-inflamatórias – especificamente, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6).

**Reagente biológico (RB):** monócitos humanos

**Fonte RB:** sangue total\*, células mononucleares do sangue periférico (PBMC)\*, linhagem monocíticas.

\* Qualificação de doadores — Os doadores de sangue devem satisfazer critérios de qualificação, e outros requisitos em vigor que se relacionem com consentimento, saúde e segurança e considerações éticas, devendo os responsáveis pela utilização do referido método cumprirem todos os requisitos estabelecidos pela autoridade regulatória responsável pelo tema. BRASIL (2024, p. 532) e no caso de excedentes transfusionais atender a NOTA TÉCNICA Nº 10/2025-CGSH/DAET/SAES/MS

**Métodos:**

- I - Teste semiquantitativo;
- II - Teste por comparação com lote controle.

**Definições:** Tabela A

Tabela A – Definições adaptadas da Farmacopeia Brasileira

Teste	Sigla	Conceito	Fórmula
Concentração limite de contaminantes	CLC	Maior concentração de pirogênios permitida em um produto, expressa como equivalente de endotoxina (EE) por mg ou mL ou Unidade.	$CLC = \frac{K}{M}$ <p>Onde,  M = máxima dose do produto por kg de peso em 1 h;  K = dose limite humana de endotoxina por kg de massa corporal (Tabela B).</p>
Sensibilidade do teste	$\lambda$	Menor concentração de endotoxina detectável, expressa em EE/mL.	<p><b>Valor de corte = <math>\bar{x} + 3s</math></b></p> <p>Onde,  <math>\bar{x}</math> = média das 4 réplicas do branco;  s = desvio padrão das 4 réplicas.</p>
Máxima diluição válida	MDV	Maior diluição da amostra que ainda permite detectar endotoxinas dentro do limite aceitável.	<p>- Se a CLC expressa em EE/mL:  <math display="block">MDV = \frac{CLC}{\lambda}</math></p> <p>- Se expressa em EE/mg ou EE/Unidade:  <math display="block">MDV = \frac{CLC \times C}{\lambda}</math></p>

Fonte: Adaptado de FB (2024)

Tabela B – Valores de K por via de administração

<b>Via de administração</b>	<b>Valor de K</b>
Intravenosa, intramuscular e subcutânea	5,0 EE por kg de massa corporal
Intravenosa para radiofármacos	2,5 EE por kg de massa corporal
Intratecal	0,2 EE por kg de massa corporal
Formulações parenterais administradas por metro quadrado da superfície corporal	100 EE/m <sup>2</sup>

Fonte: Adaptado de FB 7ª ed. (2024)

**Testes preparatórios:** Tabela C

Tabela C – Testes Preparatórios para MAT

Teste	Finalidade	Método	Critério
<i>Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina</i>	Verificar a capacidade da endotoxina em ativar o receptor TLR4 das células monocíticas e garantir boa relação dose-resposta.	Curva padrão: - Linear $\geq 4$ concentrações (pontos); - Não linear 4PL $\geq 5$ pontos e 5PL $\geq 6$ pontos. - Cada ponto $\geq 4$ réplicas	- $r^2 \geq 0,975$ + análise de resíduos; - Coeficientes $\neq 0$ ; Gráfico de resíduos; - Nível de significância de 0,05
<i>Teste de fatores interferentes</i>	Demonstrar que a amostra não interfere na detecção de endotoxina	Diluir a amostra em séries geométricas e realizar o teste (com e sem adição de endotoxina), 4 réplicas	Recuperação entre 50-200%
<i>Interferência no sistema de detecção</i>	Garantir que a amostra não interfira na detecção dos mediadores endógenos. (ex.: ELISA)	Diluições em série do padrão do mediador de escolha (com e sem amostra em sua diluição ótima)	Concordância entre leituras (com e sem amostra) $\pm 20\%$
<i>Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina (NEPs)</i>	Demonstrar que o método detecta pirogênios além das endotoxinas bacterianas	Testar resposta celular a $\geq 2$ NEPs e construir curvas dose-resposta	- Recuperação $\geq 1$ NEP entre 50-200% - Detectar TLR4 + $\geq 2$ outros ligantes - Reprovar lotes contaminados - Sinergismo: recuperação média $> 50\%$

Fonte: Adaptado de FB 7ª ed (2024)

Nota: PL = Parâmetros Logísticos.

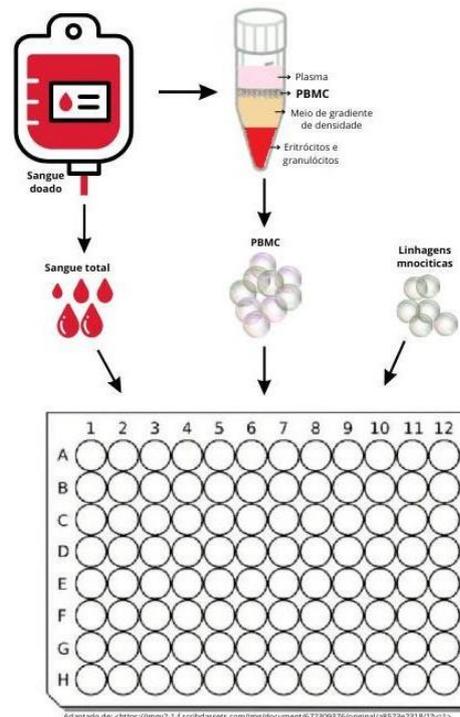
**Materiais e Equipamentos:**

- Água apirogênica
- Anticorpo conjugado (ex.: anti-IL-1 $\beta$ -HRP)
- Banho-maria
- Cabine de segurança biológica
- Fonte de monócitos humanos
- Leitor de ELISA
- Freezer - 80°C
- Meio de cultura celular
- Padrão de Endotoxina
- Padrão do anticorpo para o mediador endógeno de escolha (ex.: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6)
- Pipetas ajustáveis
- Placa de 96 poços
- Placa de cultura celular (96 poços)
- Placas de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para o mediador endógeno de escolha (ex.: anti-IL-1 $\beta$ )
- Pontas para pipetas apirogênicas
- Reagentes de cor A e B, que juntos formam um substrato cromogênico
- Solução para finalizar a reação (solução de ácido sulfúrico diluído)
- Solução salina apirogênica
- Tampão de lavagem do kit
- Tampões de incubação do kit
- Tubos de vidro apirogênicos
- Vórtex

**Procedimento:****Preparo da fonte de monócitos**

Células frescas: usar em até quatro horas após coleta (Figura 11).

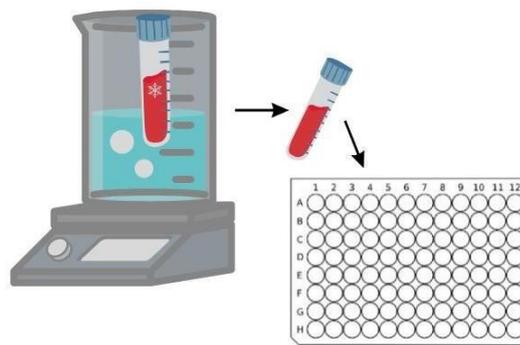
Figura 11 - Fontes de reagentes biológicos: Sangue total, PBMC, linhagens monocíticas



Fonte: Autor (2025)

Sangue (total, PBMC) criopreservado: usar imediatamente após descongelamento (Figura 12)

Figura 12 - Sangue criopreservado

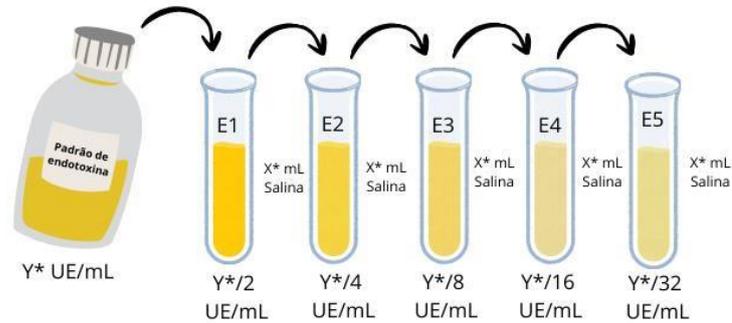


Fonte: Autor (2025)

### Preparo das curva-padrão de endotoxina

- Realizar diluições de endotoxina em meio (ex.: solução salina), conforme indicado pelo kit (Figura 13)
- Utilizar o ponto médio para comparação.

Figura 13 - Preparo curva-padrão de endotoxina



Fonte: Autor (2025)

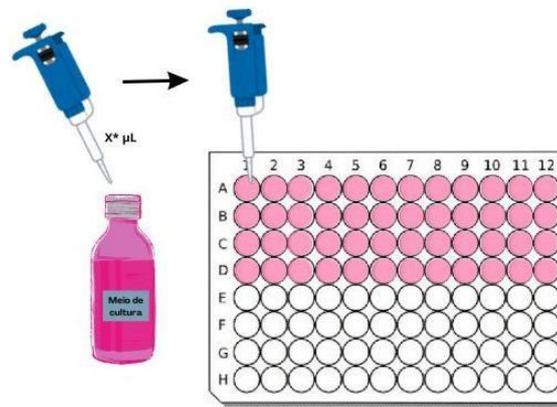
$Y^*$ : concentração informada do kit do fabricante

### Incubação com a fonte de monócitos

Em microplaca 96 poços:

- Adicionar  $X^*$   $\mu$ L do meio de cultura em cada poço (Figura 14)

Figura 14 - Meio de cultura

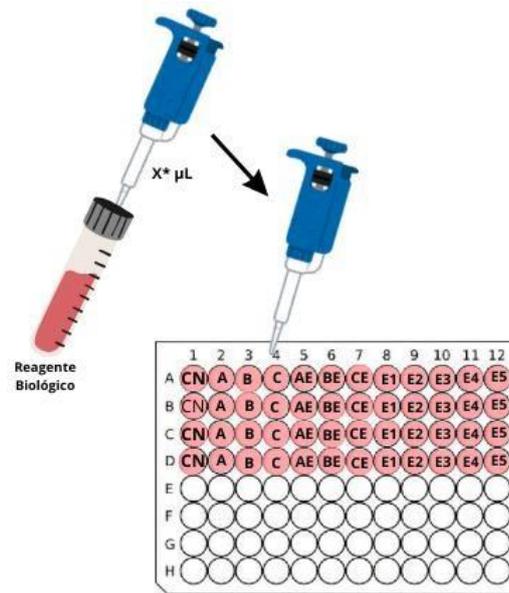


Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

- Adicionar  $X^*$   $\mu$ L da fonte de monócitos (Figura 15)

Figura 155 - Fonte de monócitos

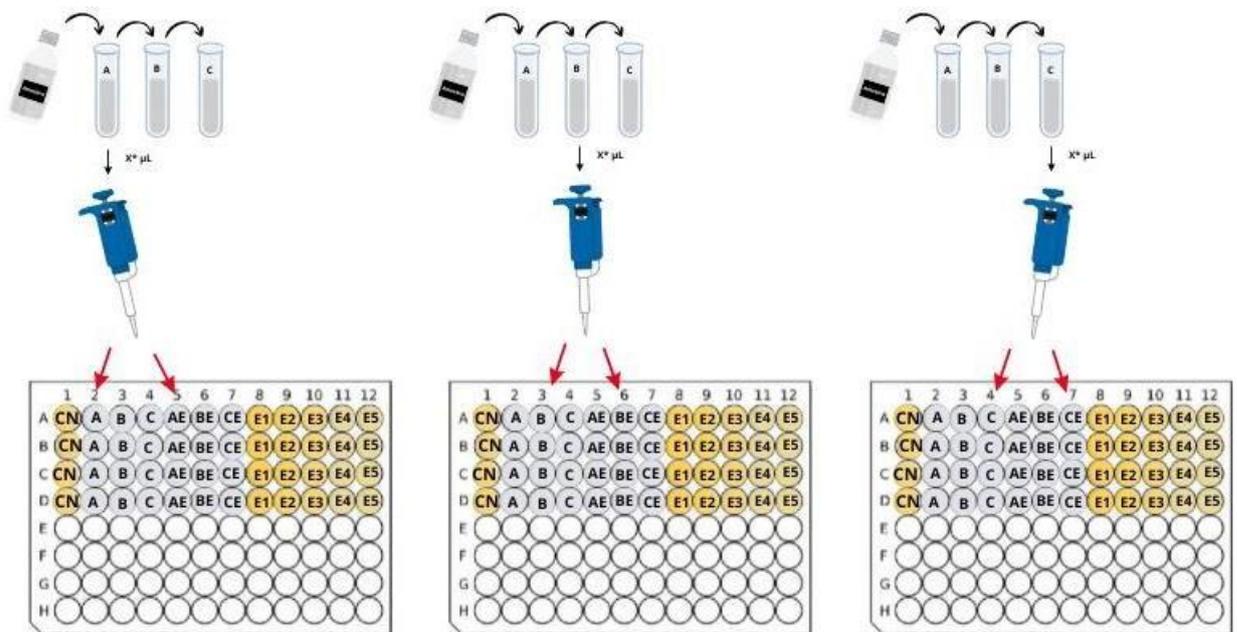


Fonte: Autor (2025)

X\*: Volume informado pelo fabricante.

- Adicionar X\* µL de cada diluições amostra em cada poço para os respectivos poços da placa (Tabela D) (Figura 16)

Figura 16 - Amostra

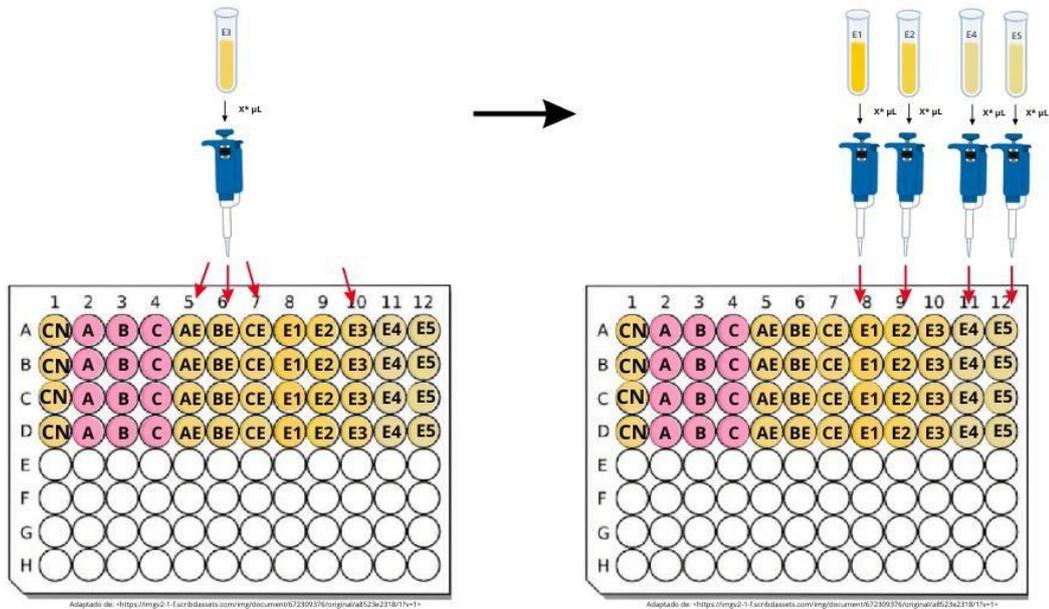


Fonte: Autor (2025)

X\*: Volume informado pelo fabricante.

- Adicionar  $X^*$   $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de endotoxina para os respectivos poços da placa (Tabela D) (Figura 17)

Figura 177 - Concentrações de endotoxina

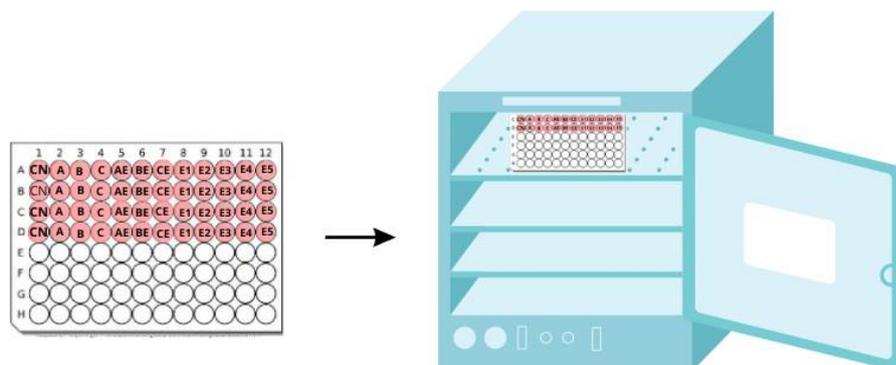


Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

- Incubar a placa  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por  $Z^*$  horas (ex.: 24h) (Figura 18)

Figura 18 - Incubação



Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

$Z^*$ : Tempo informado pelo fabricante.

Tabela D – Preparo de amostras para Método I do MAT

Solução	Fator de diluição	Adição de Endotoxina	Número de Réplicas	Finalidade
A	$f$	-	4	Amostra com menor diluição válida
B	$f_1$	-	4	Amostra com diluição intermediária
C	$f_2$	-	4	Amostra com maior diluição válida
AE	$f$	Mesma concentração do ponto médio da curva	4	Testar recuperação de endotoxina na A
BE	$f_1$	Mesma concentração do ponto médio da curva	4	Testar recuperação de endotoxina na B
CE	$f_2$	Mesma concentração do ponto médio da curva	4	Testar recuperação de endotoxina na C
CN	-	-	4	Verificar ausência de ativação sem estímulo
CURVA PADRÃO	-	Mínimo 4 concentrações (regressão linear)	4 para cada concentração	Curva-dose previamente construída

Fonte: Adaptado de Farmacopeia Brasileira 7ª edição.

Notas: **A, B e C**= amostras com respectivos fatores de diluição:

$f$  = Menor fator de diluição da amostra definida no Teste de fatores interferentes

$f_2$  = Entre  $f$  e  $f_2$ , por exemplo 0,5 x MDV

$f_3$ = diluição máxima permitida, por exemplo 1 x MDV

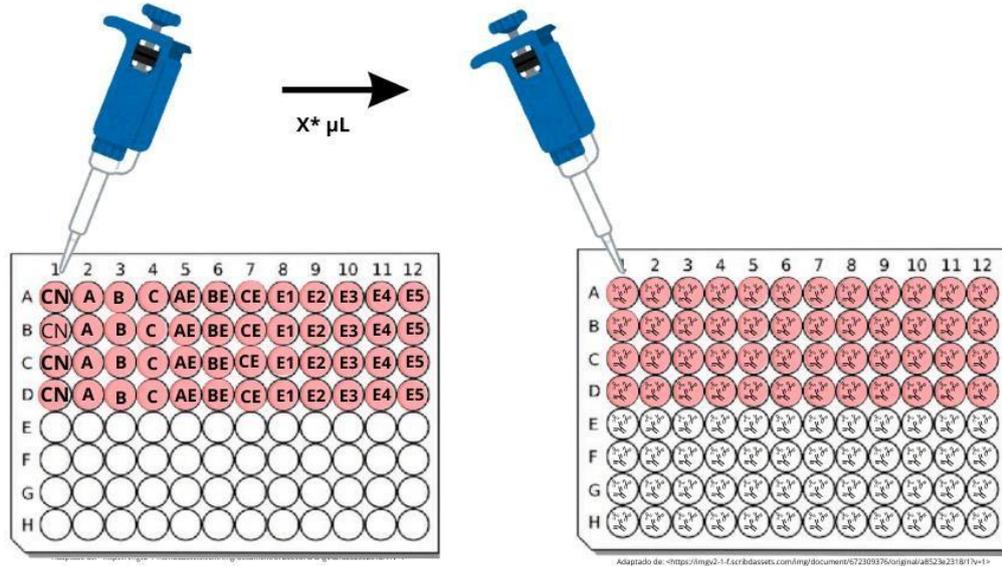
**AE, BE, CE**= mesmas amostras A, B e C com adição de uma quantidade conhecida de endotoxina (utilizada para teste de recuperação)

**CN (Controle Negativo)** = meio ou água para injetáveis (API), sem endotoxina, para verificar resposta basal.

## Detecção de interleucina por ELISA

- Pipetar  $X^*$   $\mu\text{L}$  do conteúdo de cada poço da microplaca para a placa ELISA (Figura 19)

Figura 19 - Transferência do sobrenadante para placa ELISA

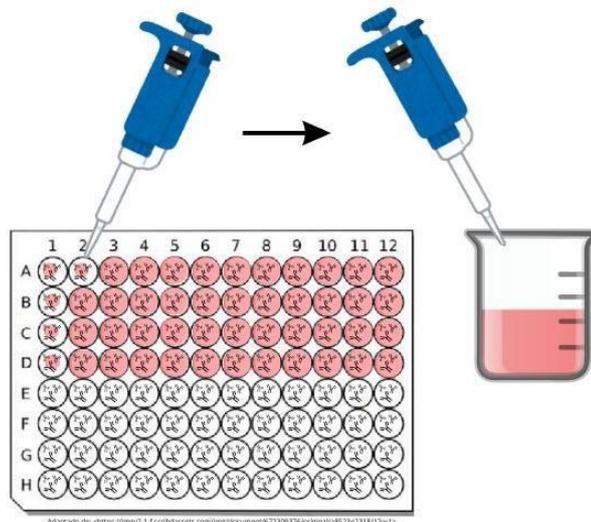


Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

- Manter por  $Z^*$  horas em temperatura ambiente
- Aspirar o conteúdo de cada poço da placa (Figura 20)

Figura 20 - Remoção do conteúdo de cada poço

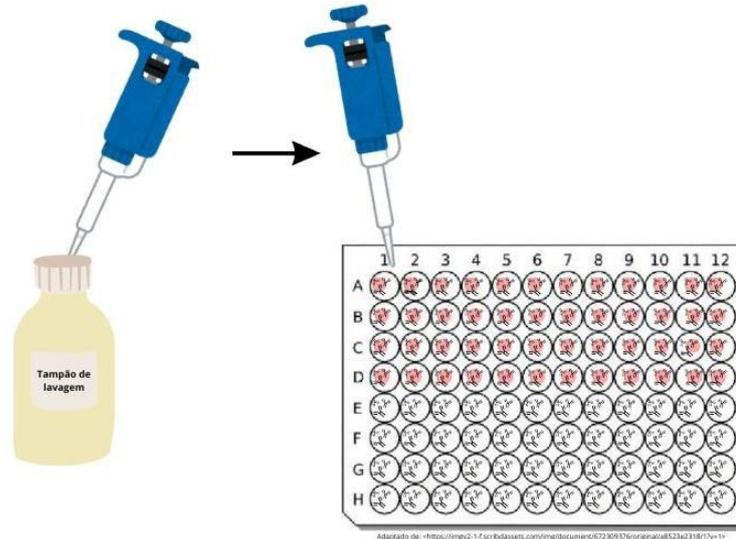


Fonte: Autor (2025)

$Z^*$ : Tempo informado pelo fabricante.

- Lavar a placa  $W^*$  vezes com  $X^*$   $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (incolor) (Figura 21)

Figura 21 - Lavagem da placa



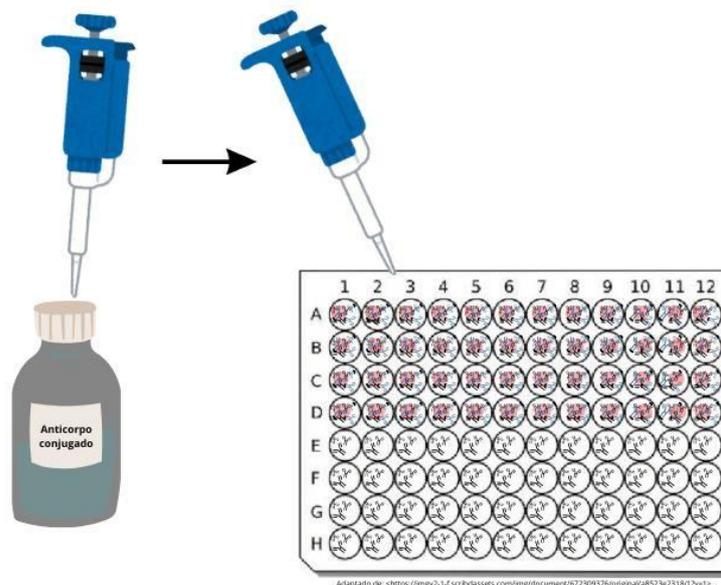
Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

$W^*$ : número de repetições informada pelo fabricante.

- Adicionar  $X^*$   $\mu\text{L}$  de anticorpo conjugado em cada poço (Figura 22)

Figura 22 - Adição do anticorpo conjugado

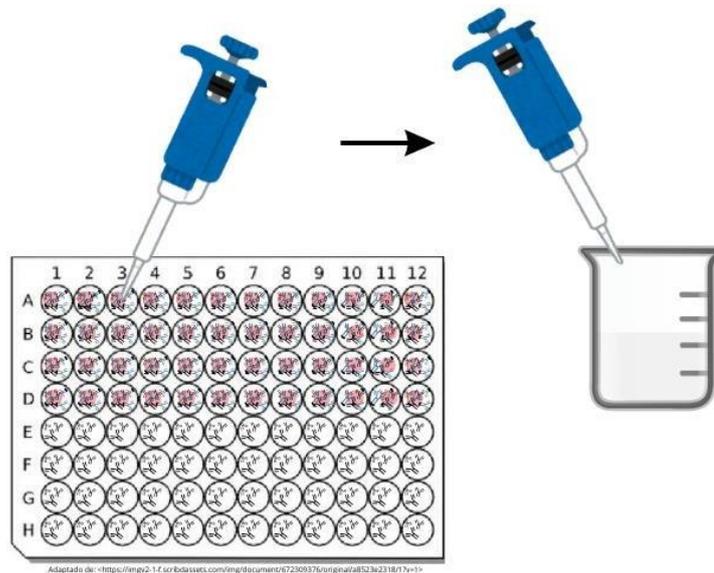


Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante.

- Manter por Z\* horas em temperatura ambiente
- Aspirar o conteúdo de cada poço da placa (Figura 23)

Figura 23 - Remoção do conteúdo de cada poço

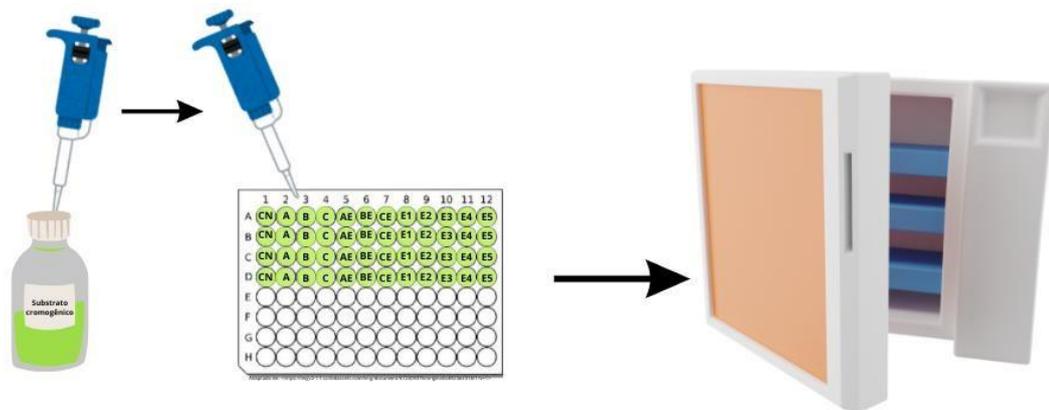


Fonte: Autor (2025)

Y\*: Tempo informado pelo fabricante.

- Adicionar X\*  $\mu$ L dos reagentes de cor conforme Kit utilizado
- Incubar por Z\* minutos em local sem luz e temperatura ambiente (Figura 24)

Figura 24 - Adição do substrato cromogênico e incubação (protegida da luz) em temperatura ambiente



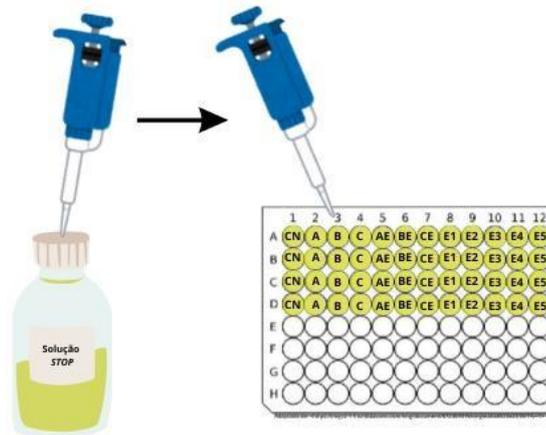
Fonte: Autor (2025)

X\*: Volume informado pelo fabricante.

Z\*: Tempo informado pelo fabricante.

- Adicionar  $X^*$   $\mu\text{L}$  de solução para finalizar a reação (ex.: solução de ácido sulfúrico diluído) (Figura 25)

Figura 25 - Adição da solução para finalizar a reação (*STOP*)



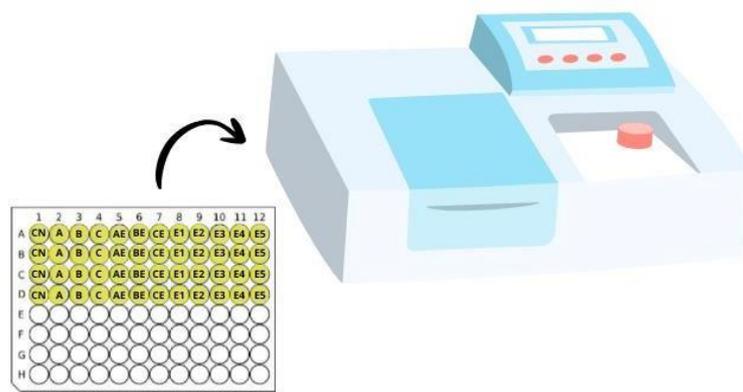
Fonte: Autor (2025)

$X^*$ : Volume informado pelo fabricante

### Leitura e análise

- Selecionar comprimento de onda adequado (conforme especificação do kit)
- Ler os resultados em até  $Z^*$  minutos (Figura 26)

Figura 26 - Realização da leitura de placa



Fonte: Autor (2025)

$Z^*$ : Tempo informado pelo fabricante.

- Construir curva-padrão (Figura 27)

Figura 27 - Construção da curva-padrão



Fonte: Autor (2025)

- Determinar a concentração de endotoxinas usando Software ou planilha de análise.

### Interpretação

- Analisar e interpolar os dados obtidos com a curva-padrão (Tabela E).

Tabela E – Critérios de aprovação do MAT

<b>Situação da Amostra</b>	<b>Condição</b>	<b>Classificação</b>
Aprovada	Concentração calculada < CLC (Concentração Limite de Contaminantes).	Amostra sem presença significativa de contaminantes pirogênicos
Reprovada	Concentração calculada > CLC	Amostra apresenta contaminantes pirogênicos acima do limite permitido

Fonte: Autor (2025)

## Bibliografia

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 7. ed. Brasília: ANVISA; 2024. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/11937>>. Acesso em: 11 fev 2025.

MERCK MILLIPORE. **PyroDtect System: Monocyte-Activation Test (MAT) User Manual**. Darmstadt: Germany. 2017. Disponível em: <[https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de\\_DE/-/EUR/ShowDocument-Pronet?id=201207.136](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-Pronet?id=201207.136)> Acesso em: 15 Ago 2025.

MONTEIRO, Victor Hugo Miranda. **Teste De Ativação De Monócitos para detecção de pirogênios: alternativa do uso de animais em controle de qualidade na produção de soros hiperimunes**. 2023. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2023.

OLIVEIRA, Raquel Amorim. **Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos (MAAT) para a detecção de pirógenos em Vacina Zika Inativada experimental**. 2019. Monografia (Especialização Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

VIDEOSAÚDE, Distribuidora da Fiocruz. **Workshop - Teste de Ativação de Monócitos: A Substituição Para o Teste de Pirogênio em Coelhos**. YouTube, 21 junho de 2022. 1h37min50s. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=hiWENOCUBUE>>. Acesso em: 26 jul 2025.

Animal-Free Safety Assessment Collaboration. **Monocyte Activation Test: The experience of the Italian Institute of Health**. YouTube, 26 de maio de 2023. 58min06s. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=jxy7FsMOfNo>. Acesso em: 22 ago 2025.

## 6 CONCLUSÃO

O levantamento histórico realizado nas sete edições da FB, possibilitou compreender e acompanhar a evolução, atualizações e aprimoramentos dos métodos destinados a detecção de pirogênios. Assim, o primeiro método denominado “Pirogênio” foi descrito na 3ª edição, 1977. Após alguns anos, em 2010, foi incorporado à farmacopeia o Teste de Endotoxinas Bacterianas (LAL), como método alternativo de escolha frente ao uso de animais. Em 2024, foi incluído na FB o Teste de Ativação de Monócitos (MAT), como método mais alinhado aos princípios éticos e sustentáveis. Com isso, observa-se o esforço contínuo em garantir maior segurança nos processos de controle de qualidade junto as demandas regulatórias.

A comparação entre os métodos descritos nas Farmacopeias Brasileira, Europeia e Americana permitiu identificar semelhanças e diferenças quanto aos procedimentos descritos.

Por fim, foi proposta diretriz para roteiro de aula prática utilizando o MAT. O texto buscou ser objetivo e didático, esclarecendo pontos que não estão detalhados na FB. Para isso, foram consultadas outras referências bibliográficas, buscando complementar as lacunas e fornecer com clareza, tanto os conceitos quanto os procedimentos do método.

## REFERÊNCIAS

Animal-Free Safety Assessment Collaboration. **Monocyte Activation Test: The experience of the Italian Institute of Health**. YouTube, 26 de maio de 2023. 58min06s. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=jxy7FsMOfNo>. Acesso em: 22 ago 2025.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 7. ed. Brasília: ANVISA; 2024. Disponível em: <https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/11937>. Acesso em: 11 fev 2025.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/volume-1-fb6-1.pdf/view>. Acesso em: 15 mai 2025.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8000json-file-1>. Acesso em: 4 jun 2025.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 1988. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8036json-file-1> Acesso em: 7 jul 2025.

BRASIL. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n], 1959.

BRASIL. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 1. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929. Suplemento: Rio de Janeiro: A Gazeta da Farmácia, 1943.

ECKFORD, Catherine. European Pharmacopoeia makes milestone pyrogen testing commitment. **European Pharmaceutical Review**. Disponível em: [https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/231496/european-pharmacopoeia-makes-milestone-pyrogen-testing-commitment/?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/231496/european-pharmacopoeia-makes-milestone-pyrogen-testing-commitment/?utm_source=chatgpt.com). Acesso 29 jul 25.

**EUROPEAN PHARMACOPOEIA**, 11th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2022. v. 1.

KIM, Ji-Hye et al. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products. **Biologicals**, v. 71, p. 20-30, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.04.003>. Acesso em: 12 fev 2025.

LOPES, Izabela Gimenes. **Comparação Dos Métodos De Pirogênio In Vivo Descritos Nas Farmacopeias Brasileira E Europeia: Interferência Na Interpretação Dos Resultados**. 2011. Dissertação (Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

MERCK MILLIPORE. **PyroDtect System: Monocyte-Activation Test (MAT) User Manual**. Darmstadt: Germany. 2017. Disponível em: [https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de\\_DE/-/EUR/ShowDocument-Pronet?id=201207.136](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-Pronet?id=201207.136) Acesso em: 15 Ago 2025.

MONTEIRO, Victor Hugo Miranda. **Teste De Ativação De Monócitos para detecção de pirogênios: alternativa do uso de animais em controle de qualidade na produção de soros hiperimunes**. 2023. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2023.

OLIVEIRA, Raquel Amorim. **Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos (MAAT) para a detecção de pirógenos em Vacina Zika Inativada experimental**. 2019. Monografia (Especialização Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

**PHARMACOPEIAL DISCUSSION GROUP (PDG).** Disponível em:

[https://www.usp.org/harmonized-](https://www.usp.org/harmonized-standards/pdg#:~:text=In%201989%2C%20the%20Pharmacopeial%20Discussion%20Group%20%28PDG%29%20was,the%20Ministry%20of%20Health%2C%20Labour%20and%20Welfare%20%28MHLW%29)

[standards/pdg#:~:text=In%201989%2C%20the%20Pharmacopeial%20Discussion%20Group%20%28PDG%29%20was,the%20Ministry%20of%20Health%2C%20Labour%20and%20Welfare%20%28MHLW%29](https://www.usp.org/harmonized-standards/pdg#:~:text=In%201989%2C%20the%20Pharmacopeial%20Discussion%20Group%20%28PDG%29%20was,the%20Ministry%20of%20Health%2C%20Labour%20and%20Welfare%20%28MHLW%29). Acesso 15 jul. 2025.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary.; PINTO, Antonio F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. Barueri (SP): Manole, 2015. 416 p.

SILBERNAGL, Stefan; LANG, Florian. **Fisiopatologia: Texto e atlas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SILVA, Cristiane Caldeira da. **Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: comparação dos métodos *in vitro* e *in vivo* aplicados ao controle da qualidade**. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/38982>. Acesso em 29 maio 2025.

SILVA, Cristiane, et al. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). **Toxicology in Vitro**. Rio de Janeiro, v. 32, p. 70-75, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.004>.

SILVA, Cristiane, et al. Métodos alternativos para a detecção de pirogênios em produtos e ambientes sujeitos a Vigilância Sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do Teste de Ativação de Monócitos. **Vigilância Sanitária em Debate**. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 6, n. 1, p. 137-149, 2018. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01082>.

SPOLADORE, Janaína et al. Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit Pyrogen testing (RPT): A scoping review. **Toxicology in vitro**, Niterói, v. 74, p. 105160, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105160>. Acesso 11 fev 2025.

**UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION.** USP 44 - NF 39: United States Pharmacopeia – National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2021.

VIDEOSAÚDE, Distribuidora da Fiocruz. **Workshop - Teste de Ativação de Monócitos: A Substituição Para o Teste de Pirogênio em Coelhos.** YouTube, 21 junho de 2022. 1h37min50s. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=hiWENOCUBUE>. Acesso em: 26 jul 2025.