

Baixa recuperação de endotoxinas na indústria farmacêutica: fatores determinantes, métodos analíticos e implicações clínicas

Low Endotoxin Recovery (LER) in the pharmaceutical industry: determining factors, analytical methods and clinical implications

DOI: 10.24933/e-usf.v10i1.508

v. 10 n. 1 (2026)

Giovane Martins Fiorese¹; Fabio de Souza Rodrigues¹; Thaisy Pacheco²

¹ Discentes do Curso de Farmácia pela Universidade São Francisco;

² Professora Doutora do Curso de Farmácia da Universidade São Francisco;

thaisy.santos@usf.edu.br

RESUMO. A presença de endotoxinas em produtos farmacêuticos representa um importante desafio para o controle de qualidade, especialmente em medicamentos estéreis e parenterais, pois essas substâncias podem provocar reações inflamatórias severas e risco clínico. O fenômeno da baixa recuperação de endotoxinas ocorre quando os testes de detecção, como o LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), não identificam adequadamente endotoxinas previamente adicionadas, comprometendo a confiabilidade analítica. O objetivo deste estudo foi compreender os fatores determinantes deste fenômeno, descrever os métodos analíticos empregados e discutir suas implicações clínicas. Trata-se de uma revisão bibliográfica baseada em publicações científicas relevantes como PubMed, utilizando os descritores *Low Endotoxin Recovery* e *Endotoxin Masking*, além dessa fonte foi utilizado a Farmacopeia Brasileira e livros de microbiologia. Foram priorizados estudos dos últimos cinco anos, complementados por referências clássicas relevantes. Os resultados indicaram que o LER é influenciado por interações físico-químicas entre endotoxinas e componentes das formulações, como agentes quelantes, surfactantes e cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}). Os cátions demonstraram papel estabilizador sobre os agregados de lipopolissacarídeos (LPS), enquanto quelantes e surfactantes favoreceram o mascaramento das endotoxinas. Fatores como pH ácido e baixas temperaturas também aumentaram a recuperação nos ensaios. Conclui-se que compreender os mecanismos que afetam o LER é essencial para aprimorar os métodos de detecção, reduzir resultados falso-negativos e assegurar a segurança dos medicamentos, alinhando-se às Boas Práticas de Fabricação e às normas da ANVISA (Agência nacional de vigilância sanitária).

Palavras-chave: Baixa recuperação de endotoxinas; Endotoxinas; LAL; Lipopolissacarídeo; Controle Microbiológico.

ABSTRACT. The presence of endotoxins in pharmaceutical products represents a major challenge for quality control, especially in sterile and parenteral medicines, as these substances can cause severe inflammatory reactions and clinical risks. The Low Endotoxin Recovery (LER) phenomenon occurs when detection tests, such as the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay, fail to adequately identify previously added endotoxins, compromising analytical reliability. This study aimed to understand the determining factors of this phenomenon, describe the analytical methods employed, and discuss their clinical implications. It is a literature review based on relevant scientific publications from databases such as PubMed, using the descriptors *Low Endotoxin Recovery* and *Endotoxin Masking*. Additional sources included the Brazilian Pharmacopeia and microbiology textbooks. Studies from the last five years were prioritized, complemented by relevant classical references. The results indicated that LER is influenced by

physicochemical interactions between endotoxins and formulation components, such as chelating agents, surfactants, and divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}). Divalent cations showed a stabilizing role on lipopolysaccharide (LPS) aggregates, while chelating agents and surfactants promoted endotoxin masking. Acidic pH and low temperatures were also associated with increased recovery in assays. It is concluded that understanding the mechanisms affecting LER is essential to improve detection methods, reduce false-negative results, and ensure drug safety, in compliance with Good Manufacturing Practices (GMP) and ANVISA (National Health Surveillance Agency) regulations.

Keywords: Low endotoxin recovery; Endotoxins; LAL; Lipopolysaccharide; Microbiological Control.

INTRODUÇÃO

Controle Microbiológico em Produtos Farmacêuticos

A ocorrência de microrganismos em produtos farmacêuticos representa um dos maiores desafios para a indústria, pois falhas no controle microbiológico comprometem diretamente a qualidade, eficácia e integridade dos medicamentos (Song *et al.*, 2024). As contaminações microbianas na fabricação de produtos farmacêuticos podem ter múltiplas origens. Entre elas destacam-se: água utilizada no processo, operadores, matérias-primas e os equipamentos utilizados na produção (Burgmaier *et al.*, 2025). Produtos estéreis de alto risco, como injetáveis e oftalmológicos, quando contaminados durante a fabricação ou armazenamento, oferecem sérias ameaças à saúde, podendo inclusive levar a eventos adversos graves ou fatais (Song *et al.*, 2024).

Diante desse cenário a regulamentação sanitária torna-se cada vez mais importante para garantir a qualidade dos medicamentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 658/2022, estabelece diretrizes de Boas Práticas de Fabricação. Entre outros critérios, a norma determina que, em todas as etapas do processo produtivo, os insumos e produtos sejam devidamente protegidos contra contaminações microbianas (Brasil, 2022).

A Farmacopeia Brasileira é o compêndio oficial que estabelece os requisitos mínimos de qualidade para insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para a saúde no Brasil. Ela especifica ensaios e limites para a presença de microrganismos, define métodos analíticos, desde limites para cada tipo de água, produtos que exigem ou não esterilidade, pesquisa de endotoxinas dentre outras análises, conforme estabelecido na 7ª edição publicada em novembro de 2024 (Brasil, 2024). Estudos recentes destacam que a adoção de boas práticas de fabricação é essencial para prevenção de contaminações que possam comprometer a qualidade e segurança dos produtos farmacêuticos (Tyski; Burza; Laudy, 2025).

Endotoxinas e o Lipopolissacarídeo (LPS)

Nesse contexto, destaca-se a importância do controle microbiológico. Em produtos estéreis, são realizados testes para comprovar a ausência de microrganismos e de pirogênicos, substâncias capazes de induzir febre e provocar reações inflamatórias que podem variar de moderadas a graves (Bu *et al.*, 2021). Estes podem ser classificados em endógenos e exógenos.

Os endógenos são produzidos pelo próprio organismo como resposta ao contato com um pirogênio exógeno, sendo exemplos a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12 ou fator de necrose tumoral (TNF)- α (Shanmugam *et al.*, 2023; Pinto; Kaneko; Pinto, 2015). Já os exógenos têm origem fora do corpo e induzem elevações térmicas quando injetados, podendo ser de natureza química, como fármacos, esteróides, frações do plasma e o adjuvante sintético muramil dipeptídeo, ou de origem microbiana, incluindo diversas bactérias, fungos, e sobretudo, as endotoxinas, componente das bactérias Gram-negativas (Shanmugam *et al.*, 2023; Pinto; Kaneko; Pinto, 2015).

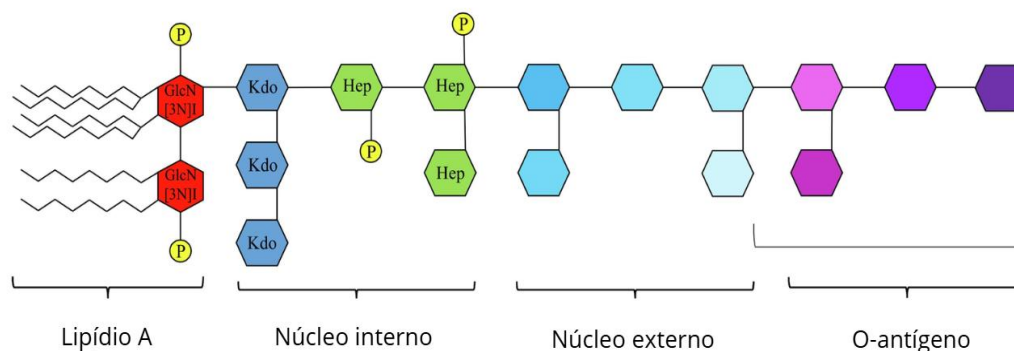
As endotoxinas também conhecidas como Lipopolissacarídeos (LPS), representam as fontes de pirogênios mais preocupantes na indústria farmacêutica, pois desencadeiam intensa resposta imunológica, podendo levar a febre, choque séptico e risco em produtos parenterais, além de apresentarem grande dificuldade de remoção nos processos industriais (Tidswell, 2023).

O lipopolissacarídeo (LPS) constitui o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Sua estrutura é organizada em três regiões: lipídio A, núcleo oligossacarídico e antígeno O. O lipídio A é formado por um dissacarídeo de glucosamina fosforilado ao qual se ligam cadeias de ácidos graxos, sendo responsável pela ancoragem do LPS à membrana e atuando como o principal determinante da atividade endotóxica, capaz de induzir respostas inflamatórias no hospedeiro (Caroff; Novikov, 2020).

O núcleo oligossacarídico conecta o lipídio A ao antígeno O e é constituído por açúcares específicos, como o ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico (KDO) e heptoses, desempenhando papel essencial na estabilidade da membrana externa e na resistência bacteriana a agentes ambientais (Caroff; Novikov, 2020).

O antígeno O, por sua vez, é composto por unidades repetitivas de oligossacarídeos que se projetam para fora da superfície bacteriana, apresentando elevada variabilidade estrutural entre cepas. Essa diversidade confere propriedades distintas às bactérias e contribui para a evasão do sistema imunológico (Caroff; Novikov, 2020; Gorman; Golovanov, 2022). A Figura 1 ilustra a estrutura de um lipopolissacarídeo.

Figura 1 – Estrutura do Lipopolissacarídeo.



Fonte: Adaptado de Gorman; Golovanov, 2022

Assim, a organização do LPS não apenas assegura a integridade estrutural da bactéria, mas também está diretamente relacionada ao fenômeno das endotoxinas, uma vez que a liberação do lipídio A no hospedeiro constitui o principal desencadeador de respostas inflamatórias exacerbadas, incluindo febre, choque séptico e falência orgânica (Gorman; Golovanov., 2022).

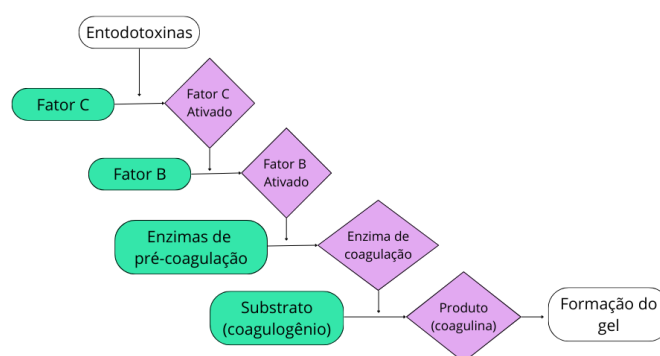
Quando o LPS é reconhecido pelos macrófagos através do receptor Toll-like 4 (TLR4), esse reconhecimento ativa uma cascata de sinalização intracelular que leva à ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kappa-B (NF- κ B), responsável por induzir a produção de mediadores inflamatórios. Como consequência, os macrófagos passam a secretar citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF)- α que têm a função de recrutar e ativar outras células do sistema imune, amplificando a resposta inflamatória (Zhao *et al.*, 2024).

Embora os mecanismos de ativação imunológica pelas endotoxinas, incluindo a interação com macrófagos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, sejam bem caracterizados, a detecção precisa dessas toxinas em produtos farmacêuticos ainda enfrenta desafios técnicos. Estudos demonstram que a baixa recuperação de endotoxinas em produtos farmacêuticos e correlatos pode comprometer a identificação adequada dessas substâncias, representando um risco direto à segurança dos pacientes (Wespel *et al.*, 2022).

Métodos de Detecção e o Fenômeno de Baixa Recuperação (LER)

O teste de endotoxinas bacterianas é empregado para detectar ou medir a quantidade de endotoxinas provenientes de bactérias Gram-negativas em amostras (Brasil., 2024). Este procedimento utiliza um extrato aquoso dos amebócitos do caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*, ou do *Tachypleus tridentatus*, que é preparado e classificado como o reagente LAL (Lisado de Amebócitos de Limulus). Quando o teste resulta positivo, ele desencadeia uma sequência de reações nos hemócitos do caranguejo-ferradura devido ao contato com a endotoxina, conforme descrito na Figura 2. Essa reação provoca a coagulação de uma proteína chamada coagulogênio, que resulta na formação de um gel, o nível de gelificação está diretamente ligado à concentração de endotoxinas (Pinto; Kaneko; Pinto., 2015).

Figura 2 – Conversão de coagulogênio em coagulina, evidenciando a presença ou ausência da endotoxina bacteriana.



Fonte: Adaptado de Pinto; Kaneko; Pinto (2015)

No método de coagulação em gel, a presença de endotoxina é confirmada pela formação de um gel no tubo após a reação, sendo os resultados comparados a diluições conhecidas da endotoxina-padrão, expressas em unidades de endotoxina por mililitro (UE/mL). Para garantir a validade do ensaio, são preparados controles que asseguram a reprodutibilidade e a confiabilidade do teste. Cada amostra ou controle é incubado com o reagente LAL a (37°C \pm 1) por uma hora, e o resultado é verificado pela integridade do gel. O ensaio só é aceito se os

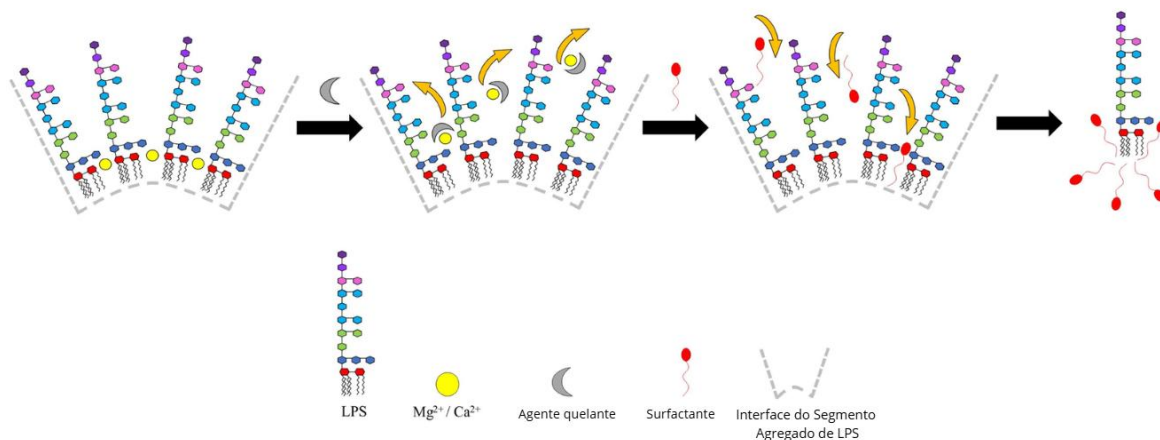
controles positivos formarem gel, e a sensibilidade do reagente estiver dentro da faixa estabelecida (Brasil, 2024).

O fenômeno denominado *Low Endotoxin Recovery* (LER) descreve situações em que ensaios não conseguem detectar endotoxinas em certas formulações, apesar de ter sido previamente adicionada uma quantidade conhecida de LPS, procedimento chamado de ensaio de recuperação ou adição conhecida (em inglês, *spike*). Essa prática serve para verificar se o teste é capaz de recuperar corretamente a endotoxina. Esse fenômeno é atribuído a um efeito de mascaramento gerado por interações entre o LPS e excipientes da formulação, que perturbam a formação supramolecular dos agregados de LPS e reduzem sua detecção (Gorman; Golovanov, 2022). Essa perda de sinal não implica necessariamente destruição química da molécula de LPS, ao contrário, evidencia uma alteração na acessibilidade ou configuração supramolecular da endotoxina que a torna menos capaz de ativar o ensaio LAL ou outros detectores biológicos (Gorman; Golovanov, 2022; Schromm *et al.*, 2024). Estudos demonstram que a baixa recuperação de endotoxinas em produtos farmacêuticos e correlatos pode comprometer a identificação adequada dessas substâncias, representando um risco direto à segurança dos pacientes (Wespel *et al.*, 2022).

Para a compreensão do mecanismo observado, torna-se essencial considerar o comportamento supramolecular do LPS em solução aquosa. Nessas condições, o LPS não se apresenta como unidades monoméricas isoladas, mas organiza-se em agregados supramoleculares, como micelas, estruturas lamelares e vesículas. A arquitetura desses agregados é fortemente modulada por fatores ambientais, incluindo pH, presença de moléculas anfífilas e, sobretudo, a concentração de íons divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} . Esses íons promovem a neutralização das cargas negativas associadas aos grupos fosfato do lipídio A e do núcleo oligossacarídico, atuando como pontes intermoleculares que estabilizam os agregados e influenciam a exposição de cargas na superfície do LPS, condição determinante para sua interação com reagentes de detecção (Gorman; Golovanov, 2022; Harm *et al.*, 2021).

Conforme representado na Figura 3, os segmentos e agregados de LPS são estabilizados por interações eletrostáticas entre cátions divalentes, como cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) representado pelas esferas amarelas, e regiões carregadas negativamente de LPS (hexágonos vermelhos). Agentes quelantes removem os cátions divalentes, acarretando menor rigidez do agregado (Gorman *et al.*, 2025; Reich *et al.*, 2018). Sua desestabilização permite a intercalação de surfactantes que dispersam os agregados em monômeros de LPS. O LPS monomérico é incapaz de ativar o Fator C, o reagente responsável por iniciar o ensaio de LAL, o que resulta em ensaios de LAL sendo incapazes de detectar adequadamente a presença de LPS (Schromm *et al.*, 2024).

Figura 3 – Representação da Baixa Recuperação de Endotoxinas.



Fonte: Adaptado de Gorman; Golovanov, 2022.

Tal mecanismo descreve situações em que ensaios não detectam de maneira esperada a presença da endotoxina adicionada a uma amostra. Esse efeito é observado em formulações farmacêuticas que contêm surfactantes e tampões fosfatados, que alteram o comportamento supramolecular do LPS e promovem o mascaramento de regiões críticas da molécula (Gorman; Golovanov, 2022). Estudos mostraram que, em água pura, o LPS forma agregados alongados, mas na presença desses excipientes reorganiza-se em uma rede de micelas interligadas, com as cargas dos grupos de cabeça polares ocultas e forte redução do potencial de superfície negativo. Essa reorganização resulta na não acessibilidade da espinha dorsal (backbone) do LPS, isto é, a parte central da molécula que inclui o Lipídeo A e o núcleo polissacarídico, regiões fundamentais para a atividade endotóxica e para o reconhecimento pelo ensaio LAL e pelo sistema imune (Schromm *et al.*, 2024).

A expressão “não acessibilidade da espinha dorsal” refere-se ao fenômeno em que, devido à reorganização supramolecular do LPS em agregados, grupos fosfato e açúcares do lipídeo A e do núcleo polissacarídico permanecem ocultos, reduzindo a interação com as proteínas do ensaio de detecção LAL. Essa condição leva ao chamado LER, no qual a resposta do teste é artificialmente baixa, mesmo na presença de endotoxinas (Schromm *et al.*, 2024). No entanto, esse mascaramento é um problema essencialmente analítico e não reflete, em geral, o que ocorre no organismo.

No sistema imunológico humano, o reconhecimento do LPS depende de proteínas adaptadoras como LBP e CD14, que extraem monômeros de LPS desses agregados e os entregam ao co-receptor MD-2, associado ao TLR4. O MD-2 forma uma cavidade hidrofóbica capaz de acomodar o lipídeo A, e, quando essa ligação ocorre, promove-se a montagem de um par de complexos TLR4/MD-2/LPS que se dimeriza e dispara o sinal inflamatório (Fu *et al.*, 2025). Sem MD-2, TLR4 isoladamente é incapaz de reconhecer o LPS, pois não possui um sítio específico de ligação (Wei *et al.*, 2023). Assim, enquanto o mascaramento supramolecular interfere na detecção laboratorial, no organismo o LPS continua funcionalmente ativo e capaz de acionar macrófagos e desencadear a produção de mediadores pró-inflamatórios. Diante disso, este trabalho buscou compreender e comparar os fatores descritos na literatura que influenciam a recuperação de endotoxinas, bem como os impactos clínicos decorrentes de sua sub detecção, de modo a fortalecer as práticas de controle de qualidade e garantir a eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos.

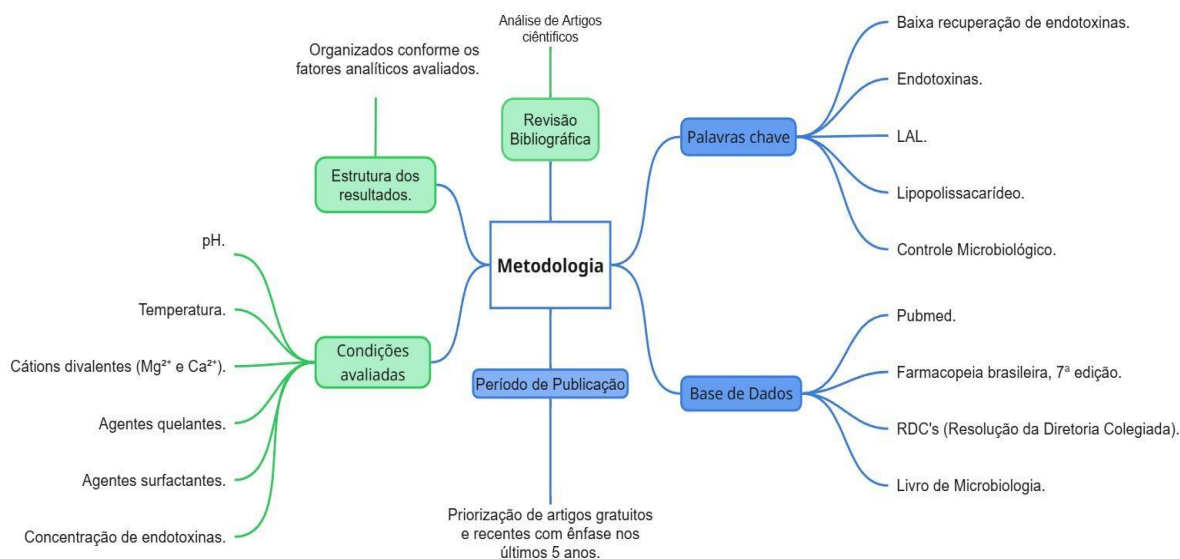
METODOLOGIA

Este estudo consiste em uma revisão bibliográfica baseada em livros de microbiologia, na Farmacopeia Brasileira, em resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDCs) e em artigos científicos indexados na base de dados PubMed (*National Institutes of Health*). A escolha dessa base deve-se à sua ampla cobertura e relevância internacional.

A busca bibliográfica foi realizada utilizando os descritores, em inglês, *Low Endotoxin Recovery* e *Endotoxin Masking*, aplicados de forma isolada e combinada, com o objetivo de identificar estudos relacionados à baixa recuperação e ao mascaramento de endotoxinas. Foram priorizadas publicações de acesso gratuito e estudos recentes, com ênfase nos últimos cinco anos, embora trabalhos anteriores tenham sido incluídos quando apresentaram relevância conceitual ou experimental.

Foram considerados estudos experimentais, revisões e artigos teóricos, permitindo a contextualização dos aspectos microbiológicos e farmacotécnicos que influenciam o comportamento das endotoxinas. O processo de identificação, seleção e avaliação das fontes está representado no fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma da metodologia.



Fonte: Elaborado pelos Autores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na indústria farmacêutica, o controle rigoroso de contaminações microbiológicas, como a presença de pirogênios, é fundamental para garantir a segurança dos produtos, sobretudo, estéreis e de alto risco, como os medicamentos injetáveis. A presença de endotoxinas, nas formulações farmacêuticas é uma das principais preocupações, pois essas substâncias podem desencadear reações inflamatórias severas, incluindo febre, choque séptico e falência orgânica, comprometendo a saúde dos pacientes (Shanmugam et al., 2023).

A literatura demonstra que o fenômeno LER pode resultar em falhas no controle de qualidade, uma vez que os testes convencionais de detecção, como o LAL, não conseguem identificar adequadamente o LPS em formulações contendo certos excipientes. Os impactos clínicos do mascaramento de endotoxinas são preocupantes, pois a baixa recuperação pode ocultar a presença de pirogênicos em produtos farmacêuticos, comprometendo a segurança do paciente (Wespe *et al.*, 2022).

O estudo de Tsuchiya, 2017, investigou o impacto de matrizes contendo agentes quelantes, surfactantes e cátions divalentes na atividade da endotoxina. O autor preparou soluções contendo agentes quelantes capazes de remover o Mg^{2+} e Ca^{2+} do meio e analisou a atividade da endotoxina por meio de ensaio cinético cromogênico (KCA/LAL). O resultado demonstrou que matrizes contendo agentes quelantes e surfactantes promoveram a remoção de cátions divalentes reduzindo o tamanho dos agregados e conseqüentemente a meia-vida da atividade da endotoxina, provocando uma perda de estabilidade do LPS.

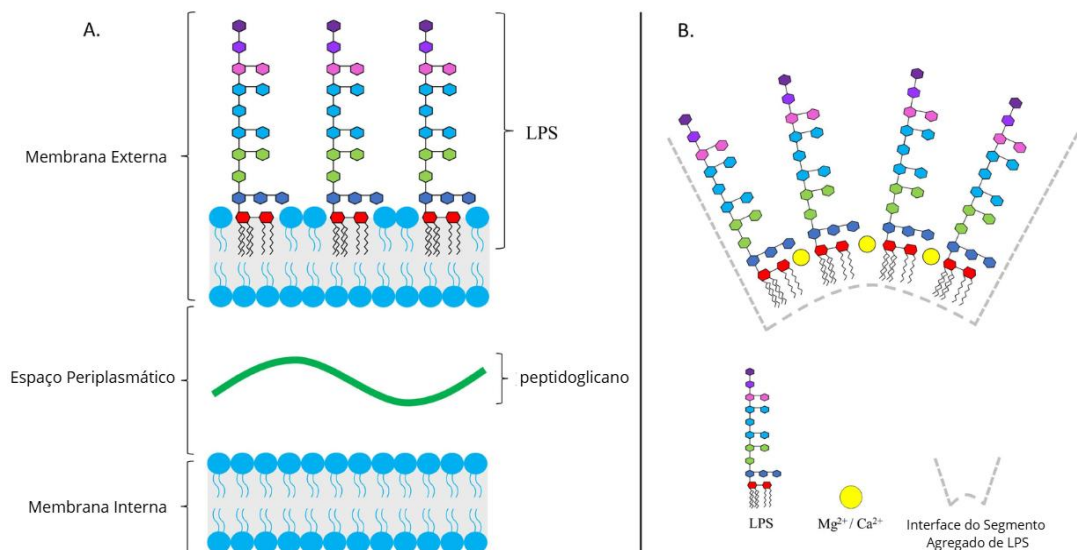
Reich *et al.*, 2019, analisaram a cinética e o mecanismo do mascaramento da endotoxina em produtos biofarmacêuticos contendo Citrato de Sódio e Polissorbato 20, ambos reconhecidos como fatores indutores do fenômeno LER. Reich e colaboradores conduziram o experimento com a adição controlada de endotoxina padrão (*E.coli* 055:B5) em soluções não diluídas, observando a redução da recuperação. Para estudar a influência dos cátions divalentes, foi adicionado diferentes concentrações de cloreto de magnésio às soluções. A presença do Mg^{2+} retardou o mascaramento, confirmando o que foi descrito por Tsuchiya, 2017, que os cátions divalentes atuam como estabilizadores dos agregados de LPS.

Bu e seus colaboradores compararam diferentes condições físico-químicas (pH, temperatura e íons divalentes, na recuperação de endotoxinas. As amostras foram preparadas contendo 0,02 % (m/v) de Tween-20 e 0,8% (m/v) de citrato de sódio. Endotoxina padrão de referência foi adicionada às amostras que foram incubadas em diferentes condições, com e sem a adição de cátions divalentes. A atividade das endotoxinas foi quantificada por meio do LAL e o tamanho das partículas foram avaliadas por DLS (*Dynamic Light Scattering*). Os resultados mostraram que a adição moderada de Mg^{2+} ou Ca^{2+} aumenta a recuperação da endotoxina e retarda o aparecimento do LER, especialmente em pH 5,0 e temperatura entre 2-8 °C. o estudo também demonstrou que concentrações excessivas desses íons podem reduzir novamente a recuperação, indicando que há um equilíbrio entre a estabilização e a interferência iônica.

Gorman *et al.*, 2025, realizaram o estudo com DLS e SAXS (*Small-Angle X-ray Scattering*) para examinar o impacto dos agentes quelantes, surfactantes e cátions sobre o tamanho e a forma dos agregados de LPS. As amostras foram preparadas utilizando uma endotoxina padrão de *Escherichia coli* (O55:B5) com a adição de agentes quelantes, surfactantes e adição em algumas formulações de 10 mM de Cloreto de magnésio para avaliar o papel estabilizador desses cátions. Os resultados mostraram que a adição de cátions divalentes nas formulações reduziu a fragmentação dos agregados, preservando a sua estrutura e diminuindo a ocorrência do LER.

Todos os estudos analisados demonstram que a presença de cátions divalentes contribuem de forma significativa para a redução ou inibição do LER. Esses Cátions (Mg^{2+} e Ca^{2+}) se ligam ao fosfato do Lipídio “A” promovendo a formação de pontes salinas e fornecendo uma certa rigidez e estabilidade aos agregados de endotoxinas, com isso diminuindo ou inibindo os efeitos do LER, A representação esquemática desse mecanismo pode ser observada na Figura 5, que ilustra a função estabilizadora dos cátions na organização tridimensional do LPS (Tsuchiya,2017, Reich *et al.*,2018; Bu *et al.*,2021; Gorman *et al.*, 2025).

Figura 5 - Cátions divalentes formando pontes salinas.



Fonte: Adaptado de Gorman; Golovanov, 2022.

Enquanto os Cátions Divalentes atuam promovendo a estabilidade estrutural do LPS e diminuindo o mascaramento, como já mencionado, outros compostos como agentes quelantes e surfactantes, podem exercer o efeito contrário. Segundo Tsuchiya, 2017; Reich *et al.*, 2018, Bu *et al.*, 2021, os agentes quelantes demonstraram reduzir significativamente a atividade das endotoxinas, favorecendo o LER, esses agentes se ligam aos íons metálicos, formando os quelatos, resultando na desestabilização dos agregados do LPS e conseqüentemente na perda da atividade detectável. Em contrapartida, o estudo de Gorman e seus colaboradores demonstraram que os agentes quelantes e surfactantes isoladamente provocam apenas uma pequena redução do tamanho dos agregados, porém em combinação podem causar uma redução significativa do tamanho dos agregados favorecendo a ocorrência do LER. Da mesma forma, os estudos de Tsuchiya, 2017; Reich *et al.*, 2018, relatam que apesar dos surfactantes isoladamente não serem capazes de induzir o LER, eles também exercem um efeito negativo sobre a recuperação de endotoxinas, estes compostos, promovem uma desestabilização dos agregados do LPS alterando sua organização supramolecular e quando em combinação com os agentes quelantes que sequestram os cátions divalentes responsáveis por estabilizar os agregados, há uma intensificação do fenômeno de LER.

Outro fator observado foi em relação à temperatura e ao pH, de acordo com Tsuchiya, 2017 e Bu *et al.*, 2021 temperaturas mais baixas retardam a perda da atividade das endotoxinas, reduzindo, desta forma, a velocidade de mascaramento e preservando sua detectabilidade. Isto indica que condições de armazenamento e processamento das amostras têm um impacto direto na recuperação das endotoxinas nos ensaios de LAL. já no que se refere ao pH, os estudos apontam que condições mais ácidas favorecem a preservação da atividade das endotoxinas, indicando uma melhor estabilização dos agregados de LPS em solução e favorecendo uma melhor recuperação. Os resultados desses estudos estão apresentados de forma direcionada no quadro 1 apresentado abaixo.

Por fim, todos indicam que a concentração inicial de endotoxinas, se faz pouco relevante no fenômeno LER. Os estudos mostraram que diferentes concentrações de endotoxinas não influenciam de forma significativa o LER, sugerindo desta forma que, os mecanismos envolvidos estão mais relacionados à interação físico-química entre o LPS e os constituintes da formulação do que a quantidade de endotoxinas presentes (Tsuchiya, 2017; Reich *et al.*, 2018; Bu *et al.*, 2021; Gorman *et al.*, 2025).

Com base nos estudos descritos, o Quadro 1 apresenta um resumo comparativo dos principais fatores que influenciam o fenômeno LER.

Quadro 1 - Comparação dos fatores que influenciam o LER.

Referência	Fatores Analisados	Resultados
Tsuchiya, 2017	Cations divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+})	Remoção de Mg^{2+}/Ca^{2+} reduz a meia-vida da atividade; cátions estabilizam LPS.
	Agentes quelantes	Reduziu a atividade das endotoxinas, favorecendo o mascaramento.
	Agentes surfactantes	Provocam redução no tamanho dos agregados, mas não causam o LER. porém em combinação com agentes quelantes intensifica o fenômeno do LER.
	Temperatura	Temperaturas mais baixas retardam a perda de detectabilidade das endotoxinas.
	pH	O pH ácido mostrou melhor preservação da atividade das endotoxinas.
	Concentração de endotoxinas	Não influencia o LER.
Reich <i>et al.</i> , 2018	Cátions divalentes	retarda ou evita o LER.
	Agentes quelantes	Quelante aumenta a cinética da reação, acelerando o mascaramento da endotoxina.
	Agentes surfactantes	Surfactantes isolados não induzem o LER, em presença com agentes quelantes pode induzir ao LER.
	Concentração de endotoxinas	Não influencia o LER.
Bu <i>et al.</i> , 2021	Cátions divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+})	Adição de Mg^{2+} , Ca^{2+} aumenta a recuperação; excesso diminui.
	Agentes quelantes	Agentes quelantes sequestram os cátions presentes acelerando o mascaramento (recuperação baixa).
	Temperatura 2-8°C	Temperatura mais baixas mantém a endotoxinas ativa por mais tempo, retarda o mascaramento e preserva agregados de endotoxinas
	pH	pH ácido aumenta a preservação da atividade das endotoxinas mantendo uma alta recuperação.
	Concentração de endotoxinas	Não influencia o LER.
Gorman <i>et al.</i> , 2025	Cátions divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+})	A presença de cátions divalentes inibe a redução do tamanho dos agregados e mantém a integridade do LPS.
	Agentes Quelantes	Pequena redução dos tamanhos dos agregados.
	Agentes surfactantes	Reduzem o tamanho dos agregados, mas não causam o LER.
	Agentes Quelantes + Agentes surfactantes	Em combinação causam redução significativa dos agregados, ocasionando o LER.
	Concentração de endotoxinas	Não influencia o LER.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Em síntese, os resultados apresentados evidenciam que o fenômeno LER resulta de uma interação multifatorial entre componentes físico-químicos da formulação, sendo essencial compreender esses mecanismos para aprimorar os métodos de detecção e garantir a segurança dos produtos farmacêuticos

CONCLUSÃO

O fenômeno de baixa recuperação de endotoxinas (LER) configura-se como um desafio crítico para o controle de qualidade na indústria farmacêutica, uma vez que pode levar à subdetecção de LPS em formulações, comprometendo a confiabilidade dos ensaios e a segurança dos pacientes. Os resultados desta revisão evidenciam que o LER é um processo multifatorial, determinado por interações físico-químicas complexas entre os constituintes das formulações, especialmente cátions divalentes, agentes quelantes e surfactantes, que afetam a estabilidade e a organização supramolecular dos agregados de LPS.

Constatou-se que os cátions divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} , exercem papel estabilizador fundamental sobre os agregados de LPS, reduzindo a ocorrência do mascaramento, enquanto a presença de agentes quelantes e surfactantes, isoladamente ou em combinação, intensifica a desestabilização desses agregados e, conseqüentemente, o fenômeno de LER. Adicionalmente, parâmetros como pH e temperatura influenciam significativamente a atividade e a detecção das endotoxinas, condições mais ácidas e temperaturas reduzidas favorecem a preservação da atividade biológica e a confiabilidade analítica dos ensaios.

Do ponto de vista clínico, o mascaramento de endotoxinas representa risco potencial à saúde, sobretudo em medicamentos parenterais, cuja administração inadvertida de pirogênios pode desencadear reações inflamatórias graves. Dessa forma, compreender os fatores que modulam o LER é essencial para aprimorar as metodologias de detecção, ajustar as condições experimentais e fortalecer as práticas de controle de qualidade preconizadas pela ANVISA e pelas Boas Práticas de Fabricação.

Conclui-se, portanto, que para evitar possíveis resultados falso-negativos nos testes de pirogênio, é fundamental realizar o monitoramento em diferentes etapas do processo produtivo. Essa abordagem assegura a detecção precoce de qualquer contaminação, garantindo a ausência de pirogênios no produto final. Ao adotar essa medida, não só se reforça a eficácia dos medicamentos, mas também se garante sua segurança para o uso humano, contribuindo para a confiança dos profissionais da saúde e consumidores quanto à qualidade dos produtos farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Diretoria colegiada. Resolução RDC N° 658, DE 12 DE MAIO DE 2022. Dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-658-de-30-de-marco-de-2022-389846242>. Acesso em: 28 Ago. 2025.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Farmacopeia Brasileira. 7. Ed. Volumes 1 e 2. Brasília: ANVISA, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 28 Ago. 2025.

BURGMAYER, L.; PÖLT, S.; AVCI-ADALI, M.; REICH, J. The impact of LPS mutants on endotoxin masking in different detection systems. **Biologicals**, v. 89, p. 101808, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2024.101808>. Acesso em: 15 set. 2025.

BU, R.; DENG, X.; CAO, Y.; JIN, J.; MAI, B.; MENG, K.; LIU, X.; CHI, J. C.; ZHANG, Y.; QIU, F. Effect of different sample treatment methods on Low Endotoxin Recovery phenomenon. **Journal of Microbiological Methods**, v. 186, p. 106241, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106241>. Acesso em: 15 Ago. 2025.

CAROFF, M.; NOVIKOV, A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications. **OCL**, v. 27, p. 31, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/ocl/2020025>. Acesso em: 15 Ago. 2025.

FU, Y.; KIM, H.; LEE, D. S.; HAN, A. R.; HEINE, H.; ZAMYATINA, A.; KIM, H. M. Structural insight into TLR4/MD-2 activation by synthetic LPS mimetics with distinct binding modes. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 4164, may. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59550-3>. Acesso em: 2 out. 2025.

GORMAN, A.; GOLOVANOV, A. P. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 180, p. 289-307, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>. Acesso em: 15 Ago. 2025.

GORMAN, A.; BECKER, M.; BALDOCK, C.; MOORE, S.; GOLOVANOV, A. P. Investigating the effects of chelating agents, surfactants and magnesium cations on the size of LPS aggregates in formulations causing low endotoxin recovery in limulus amebocyte lysate assays. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, set. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114861>. Acesso em: 2 out. 2025.

HARM, S.; SCHILDBÖCK, C.; STROBL, K.; HARTMANN, J. An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the Limulus amebocyte lysate test. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4192, 18 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33603020/>. Acesso em: 2 out. 2025.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2015.

REICH, J.; TAMURA, H.; NAGAOKA, I.; MOTSCHMANN, H. Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products. **Biologicals**, v. 53, p. 1-9, may. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.04.001>. Acesso em: 2 out. 2025.

SCHROMM, A. B.; CORREA, W.; GISCH, N.; STEINIGER, F.; RICHTER, W.; TEJADA, G. M.; BRANDENBURG, K.; WINTZINGERODE, V. F. Supramolecular assembly of micellar aggregates is the basis of low endotoxin recovery (LER) in a drug formulation that can be resolved by a whole blood assay. **Biomed Pharmacother**, v. 173, p. 116286, abr.

2024. Disponível em: [10.1016/j.biopha.2024.116286](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116286). Acesso em: 28 Set. 2025.

SHANMUGAM, P. S. T.; SAMPATH, T.; JAGADEESWARAN, I.; THAMIZHARASAN, S.; FATHIMA, S. Material-mediated pyrogenicity. In: SHANMUGAM, P. S. T.; SAMPATH, T.; JAGADEESWARAN, I. (ED). **Biocompatibility Protocols for Medical Devices and Materials**. Academic Press, 2023. p. 55-66. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91952-4.00009-X>. Acesso em: 16 Ago. 2025.

SONG, M.; LI, Q.; LIU, C.; WANG, P.; QIN, F.; ZHANG, L.; FAN, Y.; SHAO, H.; CHEN, G.; YANG, M. A comprehensive technology strategy for microbial identification and contamination investigation in the sterile drug manufacturing facility—a case study. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1327175, 12 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1327175>. Acesso em: 15 set. 2025.

TIDSWELL, E. C. A nontrivial analysis of patient safety risk from parenteral drug- and medical device-borne endotoxin. **Drugs in R&D**, v. 23, p. 65–76, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40268-023-00412-y>. Acesso em: 22 Ago. 2025.

TYSKI, S.; BURZA, M.; LAUDY, A. E. Microbiological contamination of medicinal products – is it a significant problem? **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 18, n. 7, p. 946, 23 Jun. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph18070946>. Acesso em: 15 Ago. 2025.

TSUCHIYA, M. Factors affecting reduction of reference endotoxin standard activity caused by chelating agent/detergent matrices: kinetic analysis of low endotoxin recovery. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 71, n. 6, p. 478-487, nov/dec. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2017.008086>. Acesso em: 2 out. 2025.

WESPEL, M.; GEISS, M.; NÄGELE, M.; COMBÉ, S.; REICH, J.; STUDTS, J.; STOLZENBERGER, J. The impact of endotoxin masking on the removal of endotoxin during manufacturing of a biopharmaceutical drug product. **Journal of Chromatography A**, v. 1671, p. 462995, 24 maio de 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462995>. Acesso em: 15 Ago. 2025.

WEI, J.; ZHANG, Y.; LI, H.; WANG, F.; YAO, S. Toll-like receptor 4: A potential therapeutic target for multiple human diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, p. 115338, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115338>. Acesso em: 2 out. 2025.

ZHAO, X.; WANG, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; TANG, H.; YUE, H.; ZHANG, L.; SONG, D. Macrophages in the inflammatory response to endotoxic shock. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 12, n. 10, e70027, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iid3.70027>. Acesso em: 22 Ago. 2025.

Recebido em: 29/01/2026

Publicado em: 19/05/2026