



ESCOLA  
SUPERIOR  
DE TECNOLOGIA  
DA SAÚDE  
DE LISBOA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE LISBOA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**FRACIONAMENTO DE KITS DE HMDP PARA MARCAÇÃO COM  
<sup>99m</sup>Tc – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA IDADE DAS  
FRAÇÕES**

Vanessa Sofia Duarte Santos

(nº 436606)

Mestrado em Medicina Nuclear

Área de Especialização: Radiofarmácia

**Orientadores:**

Professor Doutor António Manuel Rocha Paulo

(Instituto Tecnológico e Nuclear)

Mestre Bruno Miguel da Cruz Martins

(Medical Consult, SA – Fundação Champalimaud)

Lisboa, 2013

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**FRACIONAMENTO DE KITS DE HMDP PARA MARCAÇÃO COM  
<sup>99m</sup>Tc – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA IDADE DAS  
FRAÇÕES**

**Vanessa Sofia Duarte Santos**  
(nº 436606)

Mestrado em Medicina Nuclear  
Área de Especialização: Radiofarmácia

**Orientadores:**

Professor Doutor António Manuel Rocha Paulo  
(Instituto Tecnológico e Nuclear)

Mestre Bruno Miguel da Cruz Martins  
(Medical Consult, SA – Fundação Champalimaud)

**Júri:**

Professora Doutora Célia Fernandes  
Professor Doutor Durval Campos Costa

Lisboa, 2013

*“Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time.”*

**Thomas Alva Edison (1847-1931)**

*Este documento foi redigido ao abrigo do novo acordo ortográfico da Língua Portuguesa (2009).*



## Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o final de uma importante etapa da minha vida, assim, é com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento e apreço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que a realização desta dissertação fosse possível.

Ao Doutor António Paulo, investigador do *IST/ITN*, pela forma como orientou este trabalho, pelas recomendações, sugestões e cordialidade com que sempre me recebeu. Pelo acesso aos equipamentos e a todo o material que necessitei ao longo desta dissertação. Sempre que necessário soube aconselhar e esclarecer dúvidas que surgiram.

Ao Mestre Bruno Martins, colega de trabalho e amigo, pela paciência, incentivo, interesse e espírito crítico que sempre manifestou. Por todos os conselhos e sugestões que se mostraram fundamentais, e por constituir um exemplo a seguir.

Ao Doutor Durval Costa, diretor do Serviço de Medicina Nuclear/Radiofarmacologia da *Fundação Champalimaud*, por todo o apoio, acompanhamento e disponibilidade demonstrados durante todo o processo. Por todo o material de apoio fornecido e pela disponibilização das instalações e equipamentos, sem os quais não teria sido possível realizar esta dissertação.

À Maria José Vito, Técnica de Laboratório da *Fundação Champalimaud*, por toda a ajuda, disponibilidade e profissionalismo prestados nos estudos de controlo bacteriológico.

À Doutora Lurdes Gano e à Técnica Elisabete Correia, do *IST/ITN*, pela enorme disponibilidade e preciosa ajuda na realização dos estudos de biodistribuição em modelo animal.

À Doutora Célia Fernandes, investigadora auxiliar do *IST/ITN*, por toda a ajuda, acompanhamento e esclarecimento de dúvidas relativamente ao HPLC.

Às minhas colegas de trabalho e amigas, Ana Canudo, Bárbara Freitas, Diana Dantas, Sandra Chaves e Dra. Carla Oliveira, pelo apoio nos momentos mais críticos e por estarem sempre presentes.

À minha família, em especial à minha mãe e irmão, pelo apoio incondicional, compreensão e amor prestados ao longo desta jornada, assim como em todos os momentos da minha vida. Espero não vos desiludir.

Ao meu namorado, que esteve sempre a meu lado e me incentivou e encorajou perante os desafios e dificuldades que foram surgindo. Pelo seu amor e por tudo o que representa para mim.

A todos os amigos, especialmente à Ana Sofia, pelas longas conversas e por estar sempre presente, apesar da distância.

Muito obrigado!

## Resumo

Dada a atual conjuntura económica e social, torna-se cada vez mais importante rentabilizar os recursos nos serviços de Medicina Nuclear, de modo a reduzir os custos, nomeadamente na gestão dos radiofármacos utilizados. Neste sentido, os procedimentos devem ser otimizados e novas estratégias definidas, sem comprometer a qualidade dos radiofármacos e, conseqüentemente a realização dos exames de diagnóstico e/ou terapia.

Tratando-se de uma prática com pouco suporte bibliográfico, torna-se importante avaliar a sua influência na qualidade do produto final, pois pode ser vantajosa na gestão de recursos por parte dos serviços.

Neste estudo, com o objetivo de contribuir para um melhor aproveitamento e gestão de *kits* para marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ , procedeu-se ao fracionamento de *kits* de Hidroximetileno difosfonato (HMDP - *Osteocis*<sup>®</sup>), cujas frações foram armazenadas no congelador e refrigerador, para posterior utilização.

Após marcação das frações com  $^{99m}\text{Tc}$ , realizou-se o controlo do pH e da pureza radioquímica, de modo a testar se estariam de acordo com as especificações do fabricante e da Farmacopeia. Simultaneamente analisou-se a influência da temperatura de armazenamento e da idade das frações.

Com vista a estudar o padrão de biodistribuição dos radiofármacos obtidos por fracionamento, efetuaram-se medições de atividades nos principais órgãos em murganhos *Balb C*.

Os resultados obtidos foram comparados aos de um frasco de *kit* não fracionado, isto é, seguindo as indicações do fabricante.

Sendo imprescindível realizar todos os procedimentos em assepsia, efetuou-se o controlo bacteriológico da câmara de fluxo laminar e do refrigerador.

Com base nos resultados deste estudo, constatou-se que: 1) o valor de pH (5,5) do frasco padrão e das frações se manteve constante; 2) a gama dos valores de pureza radioquímica das frações variou entre 91% e 98%, não sendo significativa a diferença entre as frações refrigeradas e as frações congeladas, e em relação ao frasco padrão (98%); 3) os perfis de biodistribuição relativos ao frasco padrão e às frações foram semelhantes; 4) as frações podem ser utilizadas até 4 dias após o fracionamento; 5) a câmara de fluxo laminar e o refrigerador utilizados reuniam as condições de assepsia requeridas para o estudo.

**Palavras-chave:**

$^{99m}\text{Tc}$ -HMDP, Osteocis<sup>®</sup>, Fracionamento, Radiofarmácia, Controlo de qualidade.

## Abstract

Given the current economic and social situation, it becomes increasingly important to capitalize the resources of Nuclear Medicine services in order to reduce costs, particularly in the management of the radioactive drugs used. In this sense, the procedures should be optimized and new strategies defined, without compromising the quality of the radiopharmaceuticals obtained, and therefore the achievement of scintigraphic studies or radionuclide therapy.

Being a practice poorly supported by literature, it is important to assess its influence on the quality of the final product, because it may be advantageous in the management of resources by the services.

In this study, in order to maximize the use of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled diphosphonates, the fractionation of HMDP (hydroxymethylene diphosphonate - *Osteocis*<sup>®</sup>) kits was performed, and the resulting fractions were stored in the freezer and refrigerator, for later use.

After labeling the fractions with  $^{99m}\text{Tc}$ , the control of pH and radiochemical purity was performed, in order to test if they satisfy the manufacturer's and Pharmacopoeia's specifications.

Simultaneously, the influence of storage temperature and age of the fractions were analyzed.

In order to study the biodistribution profile of the radiopharmaceutical obtained by fractionation, the activity retained in the major organs was measured in mice *Balb C*.

The results were compared to a non-fractionated vial kit, which was labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  following the manufacturer's instructions.

Being necessary to perform all the procedures under aseptic conditions, a bacteriological control was carried out in the refrigerator, as well as in the laminar flow chamber.

Based on the results of this study, it was found that: 1) the pH value (5.5) remained the same in non-fractionated vial kit and in the fractions; 2) the values of the radiochemical purity of the fractions ranged between 91% e 98%, being not significant differences between fractions stored in the freezer and refrigerator, and if compared to non-fractionated vial kit (98%); 3) the biodistribution profiles of the non-fractionated vial kit and the fractions were similar; 4) fractions can be used until 4 days after the fractionation of the vials; 5) the laminar flow chamber and the refrigerator used had the aseptic condition required for this study.

**Key words:**

<sup>99m</sup>Tc-HMDP, *Osteocis*<sup>®</sup>, Fractionating, Radiopharmacy, Quality control.

# Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xvii
<b>Capítulo I.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Estrutura da dissertação.....	3
<b>Capítulo II.....</b>	<b>5</b>
2. Fundamentos Teóricos.....	5
2.1. Radiofarmacologia.....	5
2.2. Radiofármaco.....	5
2.2.1. Radiofármacos tecneciados.....	6
2.2.2. Radiofármacos tecneciados com aplicações em estudos ósseos.....	7
2.2.3. <i>Kit</i> frio de HMDP ( <i>Osteocis</i> <sup>®</sup> ).....	9
2.2.3.1. Procedimento de marcação do <i>kit</i> frio de HMDP ( <sup>99m</sup> Tc-HMDP).....	9
2.2.3.2. Propriedades farmacocinéticas e biodistribuição.....	10
2.3. Controlo de Qualidade (CQ).....	12
2.3.1. Determinação do pH.....	13
2.3.2. Pureza radioquímica.....	13
2.3.2.1. ITLC e cromatografia em papel.....	15
2.3.2.2. HPLC.....	18
2.3.3. Pureza radionuclídica.....	19
2.3.4. Pureza química.....	19
2.4. Fracionamento de <i>kits</i> de radiofármacos.....	20
2.5. Controlo bacteriológico.....	22
<b>Capítulo III.....</b>	<b>25</b>
3. Metodologia.....	25
3.1. Eluição do gerador de <sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc e CQ do eluído.....	26

3.2. Marcação do frasco padrão e otimização das técnicas de CQ.....	27
3.3. Fracionamento I.....	29
3.4. Fracionamento II.....	31
3.4.1. Frações para estudo de estabilidade.....	33
3.4.2. Frações para estudo em modelo animal.....	33
3.5. Estudos de biodistribuição.....	34
3.6. Controlo bacteriológico.....	37
<b>Capítulo IV</b> .....	41
4. Resultados.....	41
4.1. Eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ e CQ do eluído.....	41
4.2. Frasco padrão.....	41
4.3. Fracionamento I.....	44
4.4. Fracionamento II.....	45
4.4.1. Frações para estudo de estabilidade.....	45
4.4.2. Frações para estudo em modelo animal.....	46
4.5. Estudos de biodistribuição.....	48
4.6. Controlo bacteriológico.....	50
<b>Capítulo V</b> .....	53
5. Discussão de Resultados.....	53
<b>Capítulo VI</b> .....	55
6. Considerações Finais.....	55
Referências Bibliográficas.....	57
Anexos.....	61
Anexo I.....	61
Anexo II.....	61
Anexo III.....	62

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Efeitos causados na cintigrafia óssea por deficiente marcação de um <i>kit</i> de HMDP .....	10
<b>Tabela 2.2</b> – Valores de atividade injetada por órgão (% A.I./órgão) e por grama de órgão (% A.I./g), 1 hora após administração de $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP em ratos nos principais órgãos .....	11
<b>Tabela 2.3</b> - Valores de % A.I./g de órgão à 1 e 4 horas após administração de $^{99m}\text{Tc}$ -MDP em murganhos <i>Balb C</i> , e às 3 horas após administração de $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP em ratos <i>Fischer 344</i> .....	12
<b>Tabela 2.4</b> - Sistemas cromatográficos sugeridos pelo fabricante para determinação da pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP.....	17
<b>Tabela 2.5</b> – Custos monetários e montantes economizados associados ao fracionamento e ao não fracionamento de frascos de HMDP ( <i>Osteocis</i> <sup>®</sup> ).....	21
<b>Tabela 3.1</b> – Gradiente utilizado no controlo da pureza radioquímica do frasco padrão de $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP por HPLC .....	28
<b>Tabela 4.1</b> – Resultados dos controlos do ar e superfícies obtidos nas placas A e B referentes à CFL, Refrigerador e Controlos .....	50



## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> – Figura representativa dos componentes de um radiofármaco .....	5
<b>Figura 2.2</b> - Estruturas químicas dos fosfonatos MDP e HMDP, respetivamente. ....	8
<b>Figura 2.3</b> - Frascos de <i>Osteocis</i> <sup>®</sup> - IBA molecular, usados no serviço de MN da <i>Fundação Champalimaud</i> .....	9
<b>Figura 2.4</b> – Padrão normal de imagens de varrimento de corpo inteiro obtidas 3 horas após administração de <sup>99m</sup> Tc-HMDP, projeções anterior e posterior com menor (esq.) e maior (dta.) intensidade .....	11
<b>Figura 2.5</b> - Tira cromatográfica identificada com a origem da tira e frente de solvente .....	15
<b>Figura 2.6</b> - Radiocromatógrafo <i>LB 2723 Berthold</i> existente no <i>IST/ITN</i> .....	16
<b>Figura 2.7</b> - Sistema de HPLC do <i>IST/ITN</i> .....	18
<b>Figura 2.8</b> - <i>Kit</i> utilizado para determinação da pureza química do eluído ( <i>Biodex</i> )....	20
<b>Figura 2.9</b> – Aspeto e densidade das UFC.....	23
<b>Figura 3.1</b> – Esquema representativo dos procedimentos realizados por dia de trabalho.....	25
<b>Figura 3.2</b> – Variação da percentagem das fases móveis ao longo do tempo.....	29
<b>Figura 3.3</b> – Esquema representativo do fracionamento I .....	29
<b>Figura 3.4</b> – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados na determinação da pureza radioquímica das frações de <sup>99m</sup> Tc-HMDP obtidas pela técnica de fracionamento I .....	31
<b>Figura 3.5</b> – Esquema representativo do fracionamento II .....	32
<b>Figura 3.6</b> – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados na determinação da pureza radioquímica das frações de <sup>99m</sup> Tc-HMDP para estudo em modelo animal obtidas pela técnica de fracionamento II, às 4 horas após marcação .	34
<b>Figura 3.7</b> – Representação esquemática das etapas integrantes dos estudos de biodistribuição em modelo animal .....	35
<b>Figura 3.8</b> – Medição da atividade de um murgancho <i>Balb C</i> na câmara de ionização <i>Aloka Curimeter IGC-3</i> do <i>IST/ITN</i> , imediatamente após a administração de <sup>99m</sup> Tc-HMDP .....	36
<b>Figura 3.9</b> – Controlo bacteriológico.....	39
<b>Figura 4.1</b> – Cromatograma do eluído.....	41
<b>Figura 4.2</b> – Cromatogramas do frasco padrão de <sup>99m</sup> Tc-HMDP .....	42
<b>Figura 4.3</b> – Cromatograma de HPLC com <sup>99m</sup> Tc-HMDP .....	43

<b>Figura 4.4</b> - Valores de pureza radioquímica das frações obtidas por fracionamento I ao longo da semana.....	44
<b>Figura 4.5</b> - Percentagens de tecnécio hidrolisado e reduzido das frações obtidas por fracionamento I ao longo da semana.....	45
<b>Figura 4.6</b> - Valores de pureza radioquímica das frações a cada 2 horas - estudo de estabilidade.....	46
<b>Figura 4.7</b> - Cromatogramas da fração congelada de dia 2 (quarta-feira) imediatamente após a marcação.....	46
<b>Figura 4.8</b> - Valores de pureza radioquímica das frações obtidas por fracionamento II ao longo da semana, 4 horas após marcação.....	47
<b>Figura 4.9</b> - Percentagens de tecnécio hidrolisado e reduzido das frações obtidas por fracionamento II ao longo da semana, 4 horas após marcação.....	47
<b>Figura 4.10</b> - Valores de % excreção total relativos ao frasco padrão e frações, 2 horas após administração das amostras .....	48
<b>Figura 4.11</b> - Valores de % A.I./g nos diferentes órgãos relativos ao frasco padrão e às frações, 2 horas após administração das amostras.....	49
<b>Figura 4.12</b> - Valores de razão alvo/fundo relativos ao frasco padrão e frações, 2 horas após administração das amostras.....	50
<b>Figura 4.13</b> - Placa de <i>Petri</i> de controlo de ar do refrigerador com meio TSA apresentado uma colónia de bactérias.....	51
<b>Figura 4.14</b> - Percentagem de placas da CFL e refrigerador com e sem crescimento de UFC.....	52

## Lista de Acrónimos e Abreviaturas

<b>CFL</b>	Câmara de Fluxo Laminar
<b>CQ</b>	Controlo de Qualidade
<b>LEHR</b>	<i>Low Energy High Resolution</i>
<b>HDP</b>	Oxidronato
<b>HEDP</b>	Ácido hidroxietano difosfónico
<b>HEPA</b>	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
<b>HMDP</b>	Hidroximetileno difosfonato
<b>HPLC</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
<b>ITLC</b>	<i>Instant Thin Layer Chromatography</i>
<b>GMP</b>	<i>Good Manufacturing Practices</i>
<b>MDP</b>	Metileno difosfonato
<b>MEK</b>	Metiletilcetona
<b>MN</b>	Medicina Nuclear
<b>PYP</b>	Pirofosfato
<b>R<sub>s</sub></b>	Resolução
<b>SA</b>	Ácido Silicílico
<b>SG</b>	Sílica Gel
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Semivida física
<b>T<sub>b</sub></b>	Semivida biológica
<b>T<sub>e</sub></b>	Semivida efetiva
<b>T<sub>R</sub></b>	Tempo de retenção
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónias
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i>
<b>TSA</b>	Triptona Soya Agar



## Capítulo I

### 1. Introdução

Idealmente, para rentabilização dos recursos utilizados nos serviços de Medicina Nuclear (MN), um frasco de liofilizado para marcação com tecnécio-99-mestastável ( $^{99m}\text{Tc}$ ) deveria ser utilizado para vários pacientes. No entanto, devido à dinâmica de trabalho, frequentemente é utilizado para um número de pacientes inferior ao número máximo possível, o que contribui para o aumento dos custos, tornando-se importante encontrar alternativas a este problema.

É nesta perspetiva que, em muitos serviços de MN, se pretende realizar a técnica de fracionamento de *kits* frios<sup>\*</sup>, ou seja, não marcados, para preparação de radiofármacos. Esta prática pode vir a revelar-se de extrema importância, na medida em que traz vantagens na gestão e otimização de recursos, constituindo assim uma mais-valia. O importante, porém, é perceber se se trabalha em segurança e até que limite de tempo após fracionamento as frações podem ser utilizadas. Empregando os procedimentos de reconstituição apropriados, a estabilidade dos *kits* pode ser mantida por um período que permita maximizar a sua utilização e assim reduzir os custos.

Em Portugal, são realizadas em média, por técnico, 92 cintigrafias ósseas por mês, 23 por semana, ou seja entre 4 a 5 por dia<sup>[2]</sup>. Contudo, como o *Dec. Lei nº180/2002*, de 8 de Agosto refere, por câmara-gama deverá existir, no mínimo, dois técnicos de medicina nuclear, como tal, por serviço são realizadas em média 184 cintigrafias ósseas por mês, 46 por semana, ou seja entre 8 a 10 por dia<sup>[2]</sup>.

Tendo em conta que cada frasco de HMDP (*Osteocis*<sup>®</sup>) tem um custo atual de cerca de 11 euros, é possível economizar algum dinheiro através da técnica de fracionamento. Assim, em termos práticos, se um frasco de HMDP for fracionado e as frações utilizadas por exemplo, ao longo de uma semana, os gastos dos Serviços de MN inerentes à compra destes fármacos reduziriam significativamente, com uma poupança anual de 80% (**Capítulo II – item 2.4**)<sup>[2]</sup>.

No estudo descrito nesta dissertação, utilizaram-se 5 frascos de hidroximetileno difosfonato (HMDP – disponível comercialmente na forma de *kit* frio com o nome *Osteocis*<sup>®</sup>), fracionados em consonância com as necessidades previstas para um serviço de MN. Como tal, foram preparadas frações com o objetivo de serem utilizadas

---

<sup>\*</sup> Geralmente na forma de frascos multidose, constituídos pelos componentes não radioativos da preparação radiofarmacêutica<sup>[1]</sup>.

ao longo de uma semana (segunda-feira a sexta-feira), de forma a constatar qual o melhor método de fracionamento e armazenamento para este fármaco.

Assim, neste trabalho, foram realizados dois tipos de fracionamento por reconstituição dos *kits* frios de HMDP com determinados volumes de Cloreto de sódio (NaCl 0,9%), seguindo-se o fracionamento desses volumes em frações [3]. Portanto, foram efetuados dois tipos de fracionamento, o fracionamento I, onde a partir da reconstituição de um único frasco com 5 ml de NaCl (0,9%) se obteve dez frações com volume de 0,5ml, para estudo de frações congeladas e refrigeradas, e o fracionamento II, onde cada frasco se destinou ao estudo de um local de armazenamento (refrigerador ou congelador), após reconstituição com 5ml de NaCl (0,9%), obtendo-se cinco frações de 1ml cada. As frações foram devidamente armazenadas (refrigerador† e congelador) e, diariamente, foram retiradas duas frações (refrigerada e congelada), para marcação com pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) estéril e apirogénio e posterior controlo da pureza radioquímica segundo as indicações do fabricante e da Farmacopeia portuguesa [1][4][5][6][7]. Considerou-se a segunda-feira o dia zero, onde se realizou o fracionamento dos frascos e imediatamente depois, a marcação das primeiras frações com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . A marcação destas frações foi efetuada nos frascos dos respetivos *kits*, não tendo sido sujeitas a alterações de temperatura provenientes do local de armazenamento, refrigerador ou congelador, ao contrário das restantes.

Para cada fração marcada, foi realizado o controlo de pH e determinação da pureza radioquímica por cromatografia ascendente em papel (*Whatman* nº1).

Para servir de referência, efetuou-se o controlo de qualidade de um frasco de HMDP, marcado de acordo com as especificações do fabricante (frasco padrão), ou seja, não fracionado. Foi também estudada a possibilidade de usar a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC do acrónimo inglês *High Pressure Liquid Chromatography*) de algumas amostras do frasco referência, como complemento à determinação da pureza radioquímica por cromatografia em papel.

Para determinadas frações e para o frasco referência foram realizados estudos de biodistribuição em murganhos *Balb C*. Os estudos de biodistribuição envolveram a administração do radiofármaco nos animais, com dissecação dos mesmos e remoção de determinados órgãos para contagem das atividades na câmara de ionização (atividades superiores a 0,074MBq) ou contador gama (atividades inferiores a 0,074MBq). Estes estudos constituem uma mais-valia ao permitir comparar o padrão

---

† Com dispositivo de registo das condições de temperatura (°C) e humidade relativa (%rh), capaz de monitorizar valores de temperatura entre -35 e 80°C e de humidade relativa entre 0 e 100%, com gráfico do período de estudo em anexo (**Anexo I**).

de biodistribuição do radiofármaco após fracionamento, com o do radiofármaco referência.

Procurou-se obter um conjunto de resultados úteis para a avaliação das condições de armazenamento dos *kits* após fracionamento e do próprio fracionamento, permitindo identificar a melhor opção, que não comprometa a eficiência de marcação e, assim, conduzir à rentabilização de *kits*, reduzindo os custos.

## 1.1. Objetivos

O objetivo geral deste estudo consistiu em avaliar a influência das condições de armazenamento de *kits* de HMDP, após fracionamento, na pureza radioquímica e na biodistribuição do radiofármaco em modelo animal, após marcação das frações com  $^{99m}\text{Tc}$ .

A partir do objetivo geral surgiram como objetivos específicos: comparar frações congeladas e refrigeradas com base nos valores de pureza radioquímica e nos resultados dos estudos de biodistribuição em modelo animal; investigar o efeito da idade das frações; identificar a melhor opção, para o fracionamento e armazenamento dos *kits*, que não comprometesse a eficiência de marcação e, assim, conduzisse à rentabilização de *kits*, reduzindo os custos nos serviços de MN.

## 1.2. Estrutura da dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos.

Assim, no **Capítulo I** é efetuada uma contextualização do tema da dissertação, sendo também definidos os principais objetivos.

No **Capítulo II** é feita uma análise crítica da literatura e definidos os principais conceitos subjacentes ao tema em estudo, nomeadamente a nível dos princípios gerais associados à área da radiofarmácia, como marcação de *kits* frios e respetivos testes de controlo de qualidade, transpondo para o caso específico do HMDP.

No **Capítulo III** é feita referência à metodologia utilizada para realizar o trabalho descrito nesta dissertação, mais concretamente, as técnicas de fracionamento utilizadas e testes de controlo de qualidade realizados, nomeadamente determinação de pH e pureza radioquímica, assim como a metodologia utilizada nos testes de biodistribuição em modelo animal. Neste capítulo também é exposto o procedimento de controlo bacteriológico das superfícies e meios de trabalho.

No **Capítulo IV** são apresentados os resultados dos testes de controlo de qualidade do frasco padrão e das frações de HMDP após marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  e do estudo de biodistribuição em modelo animal. São também expostos os resultados obtidos no controlo bacteriológico.

No **Capítulo V** efetua-se uma análise crítica e discussão dos resultados obtidos.

No **Capítulo VI** são tecidas considerações finais e críticas às metodologias implementadas e aos resultados obtidos. Neste capítulo também são referidas perspetivas futuras que conduzam a uma otimização da gestão de recursos em radiofarmácia, tendo em consideração os resultados descritos nesta dissertação.

## Capítulo II

### 2. Fundamentos Teóricos

#### 2.1. Radiofarmacologia

A radiofarmacologia compreende o *design*, a produção, preparação, e controlo de qualidade dos radiofármacos, a relação entre as suas propriedades químicas, físico-químicas, bioquímicas e biológicas, as aplicações clínicas, assim como questões relacionadas com a gestão, armazenamento, seleção, eliminação e utilização adequadas dos mesmos <sup>[8]</sup>.

Na indústria farmacêutica e em muitas especialidades clínicas, observa-se uma demanda por novos radiofármacos, que constituem ferramentas científicas que contribuem para uma melhoria no diagnóstico e tratamento de diversas patologias <sup>[8]</sup>.

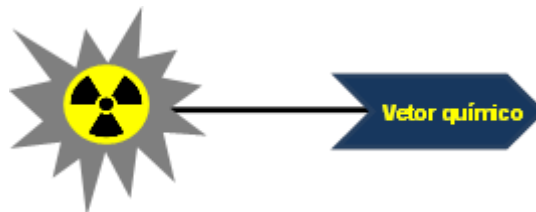
Atualmente, os esforços desenvolvidos focam-se na projeção e síntese de radiofármacos com a biodisponibilidade requerida, e elevada atividade específica, de modo a que não haja comprometimento da captação do radiotraçador no tecido alvo, respeitando as boas práticas de fabrico (GMP <sup>‡</sup> do acrónimo inglês *Good Manufacturing Practices*) <sup>[1][9][10][11]</sup>.

#### 2.2. Radiofármaco

Um radiofármaco consiste numa preparação farmacêutica que apresenta um composto radioativo, sendo usado em MN para fins de diagnóstico ou de terapêutica <sup>[6][8][12]</sup>.

Essa preparação terá de ser estéril, apirogênea, isotónica e não tóxica, de modo a poder ser administrada, em segurança, a humanos <sup>[12]</sup>.

Qualquer radiofármaco apresenta como componentes básicos (**Figura 2.1**):



**Figura 2.1** – Figura representativa dos componentes de um radiofármaco

<sup>‡</sup> Fazem parte da garantia de qualidade, assegurando que os produtos são produzidos e controlados de acordo com os padrões de qualidade apropriados ao uso pretendido.

a) **Radionuclídeo**, que pode emitir partículas  $\beta$  ou  $\alpha$ , elétrons de *Auger*, ou fótons  $\gamma$ . No caso dos fótons  $\gamma$ , estes são detetados no exterior do corpo, fornecendo assim imagens dos órgãos ou tecidos em que se localiza o radiofármaco <sup>[8][12]</sup>;

b) **Vetor químico**, que corresponde à molécula a marcar e permite que ocorra incorporação do radionuclídeo na forma química adequada, determinando a distribuição *in vivo* e o padrão fisiológico do radiofármaco <sup>[8][12]</sup>.

Em qualquer sistema biológico, a eliminação do radiofármaco ocorre devido ao período de semivida do radionuclídeo ( $T_{1/2}$ ) e à eliminação biológica do radiofármaco <sup>[12]</sup>. Cada radiofármaco apresenta uma semivida biológica ( $T_b$ ) característica <sup>[12]</sup>. A semivida efetiva ( $T_e$ ) de um radiofármaco é função da semivida física ( $T_{1/2}$ ) e da semivida biológica ( $T_b$ ) (**Equação 2.1**) <sup>[10][12]</sup>:

$$\frac{1}{T_e} = \frac{1}{T_{1/2}} + \frac{1}{T_b} \quad (2.1)$$

Idealmente, os radiofármacos para diagnóstico devem apresentar um período de semivida efetiva cerca de duas vezes superior à duração do exame diagnóstico, de modo a minimizar a dose de radiação, a maximizar a atividade administrada, e a melhorar a estatística de contagem e, conseqüentemente, a qualidade da imagem <sup>[12]</sup>.

Os radiofármacos devem fixar-se preferencialmente no órgão alvo, apresentando uma elevada razão alvo-fundo <sup>[8]</sup>.

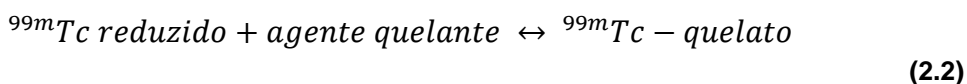
Até se obter um radiofármaco para uso comercial, é necessário atravessar um longo processo legal de licenciamento, passando por estudos pré-clínicos em modelo animal e estudos clínicos em humanos <sup>[12]</sup>.

### 2.2.1. Radiofármacos tecnecidos

Os *kits* para marcação com <sup>99m</sup>Tc constituem uma mistura reacional para preparação de determinado radiofármaco, encontrando-se geralmente na forma de liofilizado, com reagentes estéreis e de qualidade farmacêutica garantida pelos fabricantes <sup>[11][12]</sup>.

Estes *kits* têm como principais vantagens a elevada disponibilidade, rapidez e facilidade de marcação, esterilidade e apirogenia, elevada estabilidade e reprodutibilidade, longo prazo de validade, e reduzida exposição a radiação durante a sua manipulação e marcação <sup>[12][13]</sup>.

Em geral, este tipo de *kits* contém o ligando a marcar, juntamente com o agente redutor destinado a reduzir o  $^{99m}\text{Tc}$  [10][11][12]. Os agentes redutores utilizados são, geralmente, compostos de estanho [Sn(II)], como fluoreto, citrato, tartarato ou cloreto, e apresentam elevada solubilidade em meio aquoso, baixa toxicidade e estabilidade no liofilizado [12]. Deve ser mantida uma concentração mínima de íão estanhoso de modo a garantir a redução [11]. A necessidade de reduzir o tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) surge porque se trata de uma espécie não reativa em meio aquoso que não marca diretamente os ligandos de interesse, sendo as espécies reduzidas de  $^{99m}\text{Tc}$  quimicamente reativas, combinando-se com diversos agentes quelantes (**Equação 2.2**) [12].



Podem também estar presentes em alguns *kits*, aditivos, que preservam a integridade dos radiofármacos, contribuindo também para uma melhoria da marcação e estabilidade do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$ , entre eles os antioxidantes (ácido ascórbico, ácido gentísico e *p*-ácido aminobenzóico), tampões, catalisadores, solubilizantes e ligandos lábeis, que evitam a degradação da preparação e limitam os processos de radiólise [11][12].

O princípio básico de marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  envolve a redução do  $^{99m}\text{Tc}$ , no estado de oxidação +7, para um estado de oxidação inferior que permita ligar-se aos ligandos de interesse [12][13]. Assim, o metal pode atingir vários estados de oxidação e de coordenação, dando origem a diferentes radiofármacos, a partir da simples reconstituição de diferentes *kits* [14].

### 2.2.2. Radiofármacos tecneciados com aplicações em estudos ósseos

Tanto os fosfonatos como os fosfatos apresentam afeição para o tecido ósseo, sendo marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  para obtenção de imagens do sistema esquelético [12].

Existem dois tipos básicos de derivados de polifosfatos, tais como os fosfatos inorgânicos, que apresentam ligações fósforo-oxigênio (P-O-P), e os fosfatos orgânicos, que apresentam ligações fósforo-carbono (P-C-P) [12]. Os fosfatos inorgânicos constituídos por uma única unidade P-O-P são pirofosfatos, enquanto os que são constituídos por mais que uma unidade P-O-P designam-se polifosfatos [12]. Estes últimos sofrem hidrólise *in vivo* pela fosfatase alcalina, que os transforma na

unidade básica, os pirofosfatos <sup>[12]</sup>. Uma vez que as ligações P-C-P dos fosfatos orgânicos são mais resistentes à hidrólise da fosfatase, estes compostos são mais estáveis *in vivo*, o que resulta numa eliminação sanguínea mais rápida e numa captação óssea mais elevada comparativamente aos fosfatos inorgânicos <sup>[12]</sup>.

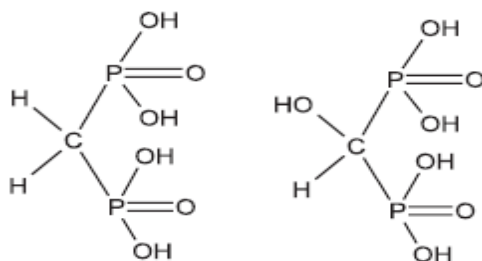
A marcação de fosfatos com <sup>99m</sup>Tc envolve a redução do pertecnetato com um sal estanhoso <sup>[12]</sup>. Uma vez que estes ligandos são relativamente fracos, verifica-se alguma tendência para reoxidação dos complexos a <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>; contudo, este problema é controlado pela adição de antioxidantes como ácido ascórbico ou ácido gentísico e pelo uso de concentrações de estanho [Sn (II)] superiores à do frasco original <sup>[12][15]</sup>.

Os agentes ósseos mais comumente utilizados são fosfonatos, designadamente o metileno difosfonato (MDP) e o oxidronato (HMDP), fornecidos comercialmente por diferentes fabricantes, com composições ligeiramente diferentes como o *Draximage*<sup>®</sup> e o *Technescan*<sup>TM</sup> HDP, respetivamente <sup>[12][16][17]</sup>.

Nesta dissertação é abordado o HMDP (*Osteocis*<sup>®</sup>), uma vez que era o fármaco utilizado no serviço de MN da *Fundação Champalimaud* para aquisição de cintigrafias ósseas.

Saliente-se que a farmacocinética do HMDP é mais rápida que a dos restantes agentes ósseos <sup>[18]</sup>. Trata-se de um agente ósseo com fácil preparação, elevada pureza radioquímica e razões fémur/músculo e fémur/sangue, às 2 horas após administração em ratos, superiores ao MDP, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) e pirofosfato (PYP) <sup>[19]</sup>.

A estrutura química e molecular dos complexos formados com ligandos MDP e HMDP (fosfonatos) não é conhecida, uma vez que não se formam espécies químicas únicas, mas sim misturas poliméricas de cadeia curta e longa <sup>[20]</sup>. Contudo, correspondem provavelmente a misturas de complexos de Tc (III) ou Tc (IV), que se fixam no osso mediante adsorção na fase mineral do mesmo, a hidroxiapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) (**Figura 2.2.**) <sup>[12]</sup>.

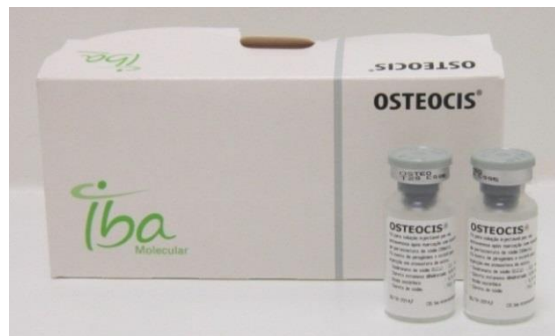


**Figura 2.2** - Estruturas químicas dos fosfonatos MDP e HMDP, respetivamente. Imagem adaptada de Castro L. et al <sup>[21]</sup>

### 2.2.3. *Kit* frio de HMDP (Osteocis®)

O *kit* de Osteocis® é fornecido numa embalagem composta por cinco frascos de vidro, devidamente encapsulados (**Figura 2.3**). Cada frasco contém um liofilizado de cor branca, com a seguinte composição qualitativa e quantitativa<sup>[4][5][22]</sup>:

- **Oxidronato de sódio** (molécula a marcar): 3.0mg
- **Cloreto estanhoso dihidratado** (agente redutor): 0.45mg
- **Ácido ascórbico** (agente estabilizador): 0.75mg
- **Cloreto de sódio** (solubilizante): 10.0mg



**Figura 2.3** - Frascos de Osteocis® - IBA molecular, usados no serviço de MN da Fundação Champalimaud

#### 2.2.3.1. Procedimento de marcação do *kit* frio de HMDP (<sup>99m</sup>Tc-HMDP)

A marcação do *kit* frio de HMDP com <sup>99m</sup>Tc envolve as seguintes etapas<sup>[4][5][10][23]</sup>:

- 1) Eluição do gerador de molibdénio-99/tecnécio-99-metastável (<sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc) e respetivo controlo de qualidade do eluído<sup>§</sup>;
- 2) Inspeção cuidadosa do frasco do *kit*, de modo a verificar a data de validade e o aspeto do liofilizado;
- 3) Remoção da cápsula do frasco e limpeza do septo com material esterilizante;
- 4) Colocação do frasco num contentor de chumbo devidamente identificado;
- 5) Com uma seringa devidamente protegida, remoção de uma atividade entre 0,74 e 11,1GBq (20 e 300mCi) de eluído (<sup>99m</sup>Tc), e perfazer com soro fisiológico até 2 a 10ml. Introdução da atividade no frasco do *kit* e, sem remoção da agulha, remoção de um volume equivalente de azoto;
- 6) Agitação durante 2 minutos, para completa dissolução;
- 7) Incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente.

<sup>§</sup> Abordado no **Capítulo II – item 2.3**.

A marcação inadequada do *kit* pode repercutir-se na biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP, surgindo nas imagens estruturas que usualmente não fazem parte do perfil normal de biodistribuição do radiofármaco (**Tabela 2.1**) [24][25][26][27].

**Tabela 2.1** – Efeitos causados na cintigrafia óssea por deficiente marcação de um *kit* de HMDP

Fator de erro	Efeito no radiofármaco	Efeito na imagem
Presença de ar no frasco	Presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ Baixa pureza radioquímica	Captação aumentada na tireoide (imagens precoces), assim como na mucosa gástrica, trato gastrointestinal e glândulas salivares
Preparações com tempo superior ao aconselhado		
Quantidade insuficiente de ião estanhoso	Formação de coloides Baixa pureza química	Captação hepática difusa e reduzida captação óssea
Presença de iões alumínio	pH aumentado	Captação no fígado, rins, estômago, vesícula biliar e trato gastrointestinal
	pH diminuído Presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Captação no estômago e fígado

Após marcação, este radiofármaco apresenta uma estabilidade de 8 horas e deve ser armazenado a uma temperatura entre 2 a 8°C [4][5][18].

#### 2.2.3.2. Propriedades farmacocinéticas e biodistribuição

O  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP administrado intravenosamente é rapidamente distribuído pelo espaço extracelular, iniciando-se a captação óssea quase imediatamente, cerca de 30 minutos após a injeção, sendo que 10% da dose inicial continua no sangue [4][5]. À 1, 2, 3 e 4 horas após injeção os valores de atividade no sangue vão diminuindo, sendo respetivamente, 5, 3, 1.5 e 1% [4][5].

A taxa de localização de um radiofármaco num determinado órgão está relacionada com a sua taxa de depuração plasmática, a qual se pode obter através da medição da atividade plasmática de amostras sanguíneas recolhidas em diferentes intervalos de tempo após injeção [12].

A excreção de um radiofármaco deve ocorrer o mais rapidamente possível, de modo a reduzir a dose de exposição à radiação [12]. No caso do  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP, a eliminação é efetuada pelos rins, sendo que cerca de 30% da atividade administrada é eliminada na primeira hora, 48% passadas duas horas e 60% passadas seis horas [4][5].

Os estudos de biodistribuição são essenciais para estabelecer a eficácia e utilidade dos radiofármacos, e incluem a distribuição nos tecidos, tendo em conta a depuração plasmática e a excreção <sup>[12][18]</sup>.

O padrão de biodistribuição normal do <sup>99m</sup>Tc-HMDP caracteriza-se pela captação simétrica e homogênea nos ossos do esqueleto, podendo ser visualizados os órgãos excretores, rins e bexiga, assim como incorporação nos tecidos moles (**Figura 2.4**) <sup>[10]</sup>.



**Figura 2.4** – Padrão normal de imagens de varrimento de corpo inteiro obtidas 3 horas após administração de <sup>99m</sup>Tc-HMDP, projeções anterior e posterior com menor (esq.) e maior intensidade (dta.)

Nos estudos de biodistribuição, o radiofármaco é inicialmente administrado em animais como coelhos, ratos ou murganhos, que são sacrificados em diferentes intervalos de tempo, e os seus órgãos removidos <sup>[12][18]</sup>. As atividades dos diferentes órgãos são posteriormente medidas e comparadas, numa câmara de ionização ou contador gama. O padrão típico de biodistribuição de <sup>99m</sup>Tc-HMDP em murganhos, 1 hora após injeção, é marcado por elevada captação óssea (fémur), e excreção hepática e renal (**Tabela 2.2**) <sup>[18]</sup>.

**Tabela 2.2** – Valores de atividade injetada por órgão (% A.I./órgão) e por grama de órgão (% A.I./g), 1 hora após administração de <sup>99m</sup>Tc-HMDP em ratos nos principais órgãos <sup>[18]</sup>

Órgão	% A.I./órgão	% A.I./g
Osso	≥ 50	≥ 2
Fígado	≤ 3	≤ 0,5
Rins	≤ 3	≤ 1

Estudos de biodistribuição em ratos *Fischer 344*, 3 horas após administração dos radiofármacos <sup>99m</sup>Tc-MDP (*Osteolite™*) e <sup>99m</sup>Tc-HMDP (*Osteoscan™*), indicam que ambos apresentam características *in vivo* semelhantes. No entanto, o <sup>99m</sup>Tc-MDP apresenta uma fixação mais elevada no osso comparativamente com o <sup>99m</sup>Tc-HMDP (**Tabela 2.3**) <sup>[28]</sup>.

**Tabela 2.3** - Valores de % A.I./g de órgão à 1 e 4 horas após administração de <sup>99m</sup>Tc-MDP em murganhos *Balb C*, e às 3 horas após administração de <sup>99m</sup>Tc-MDP e <sup>99m</sup>Tc-HMDP em ratos *Fischer 344* <sup>[28][29]</sup>

Órgão	% A.I./g órgão			
	<sup>99m</sup> Tc-MDP	<sup>99m</sup> Tc-MDP	<sup>99m</sup> Tc-MDP	<sup>99m</sup> Tc-HMDP
	<i>GE Healthcare</i>	<i>GE Healthcare</i>	<i>Osteolite™</i>	<i>Osteoscan™</i>
	1 hora (11-15g)	4 horas (11-15g)	3 horas (125-145g)	3 horas (125-145g)
osso (tíbia)	17,1 ± 2,4	19,8 ± 1,5	2,81 ± 0,42	2,54 ± 0,57
osso (fêmur)			2,64 ± 0,44	2,40 ± 0,57
músculo	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,009 ± 0,004	0,008 ± 0,002
sangue	0,4 ± 0,1	0,28 ± 0,02	0,034 ± 0,008	0,032 ± 0,010
rins	2,4 ± 0,4	2,2 ± 0,3	0,97 ± 0,43	0,83 ± 0,15
estômago	1,0 ± 0,7	1,5 ± 0,4	0,048 ± 0,23	0,053 ± 0,014
coração	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,014 ± 0,002	0,022 ± 0,007
intestino	0,24 ± 0,04	0,6 ± 0,1	---	---

Efeitos tóxicos dos radiofármacos, incluindo danos nos tecidos, disfunções na fisiologia dos órgãos e até morte do animal, devem também ser avaliados <sup>[12]</sup>.

### 2.3. Controlo de Qualidade (CQ)

Uma vez que os radiofármacos irão ser administrados a seres humanos, torna-se imperativo que os mesmos sejam submetidos a rigorosos testes de CQ, que envolvam medições específicas de forma a garantir a pureza, segurança e eficácia dos radiofármacos <sup>[8][9][10][11][12][18]</sup>.

Qualquer radiofármaco tecneciado e até mesmo o ião pertecnetato, obtido através da eluição do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ , devem obedecer às especificações exigidas pela Farmacopeia de referência, devendo-se proceder à determinação do pH e pureza radioquímica, e no caso do eluído, também à determinação da pureza radionuclídica e teor em alumínio <sup>[6][11][12]</sup>.

### 2.3.1. Determinação do pH

Todas as preparações radiofarmacêuticas apresentam determinados valores de pH que condicionam a sua estabilidade e integridade <sup>[6][11][12]</sup>.

Por norma, a medição do pH é efetuada qualitativamente com recurso a papel indicador de pH e envolve as seguintes operações:

- a) Colocação de uma alíquota do radiofármaco sobre a tira de papel indicador de pH;
- b) Comparação da coloração obtida na tira com a escala de cores padrão.

O valor de pH é variável consoante o radiofármaco, sendo que alterações significativas podem conduzir à formação de espécies radioquímicas diferentes, degradar a estabilidade *in vitro* e conseqüentemente alterar o seu comportamento *in vivo* e a sua biodistribuição <sup>[25]</sup>.

No caso do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP o valor de pH deve encontrar-se entre 5,0 e 7,0, enquanto o referente ao eluído deve encontrar-se entre 4,0 e 8,0 <sup>[4][5][6][7][11][30]</sup>.

### 2.3.2. Pureza radioquímica

A pureza radioquímica é definida como a proporção entre a radioatividade do radionuclídeo sob dada forma química e a radioatividade total devida a esse radionuclídeo <sup>[7][8][10][11][12][25][31][32]</sup>.

A presença de impurezas radioquímicas pode resultar de problemas aquando da marcação, tais como pH desadequado, presença de oxigénio ou temperaturas inadequadas, processos de radiólise devido ao uso de atividades específicas e concentrações radioativas não recomendadas <sup>[11][12][25]</sup>.

Elevadas quantidades de impurezas radioquímicas na preparação radiofarmacêutica conduzem a alterações da biodistribuição e a uma redução da qualidade das imagens obtidas, podendo interferir com o diagnóstico <sup>[8][25][27]</sup>.

O tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) ou o tecnécio hidrolisado ou reduzido ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) são exemplos de eventuais impurezas radioquímicas em radiofármacos tecneciados [10][11][12].

O  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  pode surgir devido à não redução do  $^{99m}\text{Tc}$  pelo estanho durante o processo de marcação, devido à presença de oxigénio no frasco do *kit*, principalmente antes da adição de  $^{99m}\text{Tc}$ , que pode oxidar o ião estanhoso [10][11][12]. Na sequência de processos de radiólise da água ou outros produtos presentes na preparação, a presença de oxigénio no frasco pode potenciar a produção de radicais livres que levam à formação de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  [10][11][12]. Esta espécie radioquímica gera artefactos nas imagens obtidas, nomeadamente visualização não desejada de glândulas salivares, tireoide e mucosa gástrica [12][27].

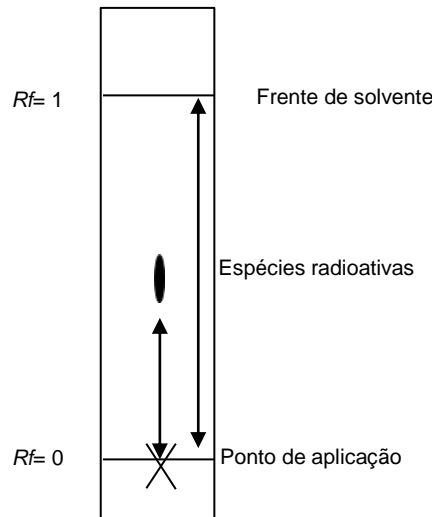
O  $^{99m}\text{TcO}_2$  encontra-se na forma de partículas coloidais que são fagocitadas pelas células endoteliais do sistema retículo endotelial, fixando-se no fígado, baço e medula óssea [27].

A determinação da pureza radioquímica requer a separação das diferentes espécies químicas existentes na preparação radiofarmacêutica e é efetuada usualmente através de métodos cromatográficos, por cromatografia planar (cromatografia em papel; cromatografia em camada fina: TLC (do acrónimo inglês *Thin Layer Chromatography*); ITLC (do acrónimo inglês *Instant Thin Layer Chromatography*); eletroforese, ou por cromatografia em coluna (permeação gel; permuta iónica; HPLC) [7][8][12]. Recorre-se a métodos de cromatografia líquida em que os diferentes componentes são separados com base na diferença das suas interações, utilizando-se uma fase estacionária ou móvel [12]. A fase estacionária pode ser sólida (TLC ou ITLC) ou líquida (na maior parte dos sistemas de HPLC), sendo que a fase móvel é sempre líquida [12].

Os métodos mais utilizados na radiofarmácia hospitalar são a cromatografia em papel e a ITLC, que apresenta a vantagem de ser mais rápida que a cromatografia em papel [7][12]. Dos diversos suportes disponíveis comercialmente, as placas ITLC com fibra de vidro impregnada com Sílica Gel (ITLC-SG) ou com ácido silicílico (ITLC-SA) são as mais comuns [7][12].

#### 2.3.2.1. ITLC e cromatografia em papel

Tanto na cromatografia em papel como na ITLC, é colocada uma alíquota da preparação radiofarmacêutica no ponto de aplicação ou origem da tira ( $R_f=0$ ), seguida da imersão da mesma num solvente apropriado, até ser atingida a frente de solvente ( $R_f=1$ ) (**Figura 2.5**) [8][10].



**Figura 2.5** - Tira cromatográfica identificada com a origem da tira e frente de solvente

Os solventes mais frequentemente utilizados são metanol/água (85% v/v), metiletilcetona (MEK) e NaCl 0,9% <sup>[9][11][12]</sup>.

Na radiocromatografia, o *Rf* de um composto é definido como a medida da distância de migração (**Equação 2.3**) <sup>[8][11]</sup>:

$$Rf = \frac{\text{Distância do centro da mancha à origem}}{\text{Distância do solvente à origem}} \quad (2.3)$$

Quando o *Rf* corresponde a um, significa que o componente migrou até atingir a frente de solvente, mas quando o *Rf* é igual a zero, mostra que o componente permaneceu no ponto de aplicação (origem) <sup>[9][12]</sup>.

Posto isto, para determinação da pureza radioquímica de um radiofármaco, devem-se seguir as seguintes etapas <sup>[11]</sup>:

- 1) Preparação do(s) solvente(s) adequado(s) na(s) respetiva(s) tina(s) cromatográfica(s) que devem ser mantida(s) fechada(s) para saturação da atmosfera;
- 2) Marcação da(s) tira(s) cromatográfica(s) em *Rf*=0, *Rf*=1 e na(s) zona(s) de corte;
- 3) Aplicação da gota do radiofármaco a estudar na linha de partida da(s) tira(s);
- 4) Desenvolvimento da cromatografia na(s) respetivas(s) tina(s) por cromatografia ascendente;
- 5) Após ser atingida a frente de solvente, remoção da(s) tira(s).

Terminada a cromatografia, as tiras são removidas do recipiente que contém o solvente, deixadas secar e são contadas numa câmara de ionização ou lida a distribuição de radioatividade ao longo da tira num radiocromatógrafo (**Figura 2.6**) <sup>[7][8]</sup>.



**Figura 2.6** - Radiocromatógrafo LB 2723 Berthold existente no IST/ITN

Em radiocromatografia podem surgir artefactos devido a diversos fatores, nomeadamente ao uso de fase móvel incorreta, uso da fase móvel correta mas contaminada, contaminação da tira fora do ponto de aplicação, contacto das tiras com as paredes húmidas da tina cromatográfica ou de outro recipiente de cromatografia, contaminação com outros radiofármacos aquando da aplicação da alíquota, incorreta aplicação da alíquota, volume insuficiente ou excessivo de fase móvel, mistura insuficiente dos componentes da fase móvel, contaminação das pinças ou tesouras utilizadas na manipulação das tiras cromatográficas <sup>[12]</sup>.

A quantificação da pureza radioquímica (%) é baseada na seguinte equação (**Equação 2.4**) <sup>[8]</sup>:

$$\% \text{ pureza radioquímica} = \frac{\text{atividade na forma química pretendida}}{\text{atividade total}} \times 100 \quad (2.4)$$

No caso do eluído, a pureza radioquímica deve ser igual ou superior a 95%, sendo utilizado um único sistema cromatográfico constituído por fase móvel de metanol/água (80/20) e papel *Whatman* nº1 como fase estacionária <sup>[6][7][11]</sup>. Neste sistema, o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  apresenta  $Rf=0,6$  <sup>[11]</sup>. As eventuais impurezas radioquímicas correspondem a espécies reduzidas de tecnécio hidrolisado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) que ficam na origem da tira, com  $Rf=0$  <sup>[11]</sup>. Porém, a separação de diferentes espécies radioquímicas através de um único sistema cromatográfico pode não ser possível, sendo necessário conjugar dois sistemas, como é o caso do  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  (*Osteocis*®) em que o fornecedor sugere dois

sistemas cromatográficos para determinação da pureza radioquímica (**Tabela 2.4**) [4][5][12][33].

**Tabela 2.4** - Sistemas cromatográficos sugeridos pelo fabricante para determinação da pureza radioquímica do  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  [4][5][18]

	Método I		Método II	
	Sistema A	Sistema B	Sistema A	Sistema B
<b>Fase estacionária</b> (adsorvente)	ITLC-SG GELMAN	ITLC-SG GELMAN ou <i>Whatman</i> nº1	<i>Whatman</i> 17 Chr	<i>Whatman</i> 17 Chr
	Zona de corte		Zona de corte	
	$R_f = 0,1$	$R_f = 0,9$	$R_f = 0,15$	$R_f = 0,4$
<b>Fase móvel</b> (solvente)	NaCl 0,9%	Acetona-Metanol (1/1)	NaCl 0,9%	Metanol-Água (85/15 V/V)
$^{99m}\text{TcO}_2$	$R_f = 0 - 0,1$	$R_f = 0 - 0,9$	$R_f = 0$	$R_f = 0$
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$R_f = 0,1 - 1$	$R_f = 0,9 - 1$	$R_f = 0,6$	$R_f = 0,8$
$^{99m}\text{Tc-HMDP}$	$R_f = 0,1 - 1$	$R_f = 0$	$R_f = 1$	$R_f = 0$

Para o  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ , as percentagens de tecnécio hidrolisado e de tecnécio livre são calculadas a partir dos resultados obtidos com os sistemas A e B, respetivamente, através das equações (**Equação 2.5 e Equação 2.6**) [4][5]:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc hidrolisado} = \frac{(\text{inicio da tira})^{**}}{(\text{Atividade total da tira A})} \times 100 \quad (2.5)$$

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc livre} = \frac{(\text{final da tira})^{\dagger\dagger}}{(\text{Atividade total da tira B})} \times 100 \quad (2.6)$$

A percentagem de complexo (pureza radioquímica) é calculada através da equação (**Equação 2.7**) [4][5]:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc HMDP} = 100\% - (\% \text{ } ^{99m}\text{Tc hidrolisado} + \% \text{ } ^{99m}\text{Tc livre}) \quad (2.7)$$

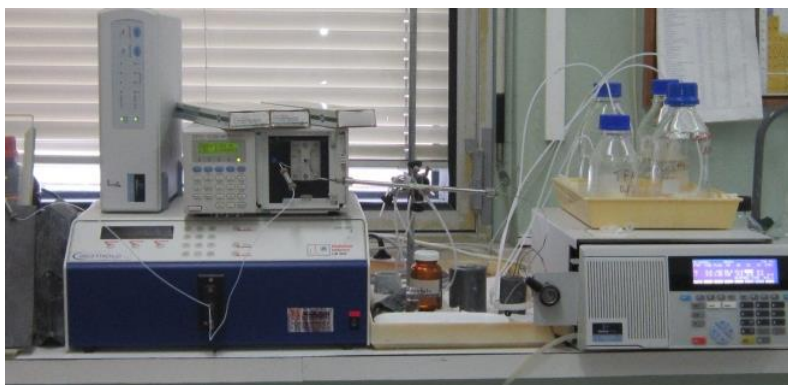
A percentagem de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  (pureza radioquímica) deverá ser superior a 95%, e a percentagem total de  $^{99m}\text{Tc}$  hidrolisado e de  $^{99m}\text{Tc}$  livre deverá ser inferior a 5% [4][5][18].

\*\* Se ITLC-SG ( $R_f = 0 - 0,1$ ), se *Whatman* 17 Chr ( $R_f = 0 - 0,15$ ).

†† Se ITLC-SG ( $R_f = 0,9 - 1$ ), se *Whatman* 17 Chr ( $R_f = 0,4 - 1$ ).

### 2.3.2.2. HPLC

O HPLC apresenta elevada resolução, sendo muito útil no desenvolvimento de radiofármacos, uma vez que permite separar e identificar praticamente todas as eventuais impurezas radioquímicas da amostra (**Figura 2.7**) <sup>[12][30]</sup>.



**Figura 2.7** - Sistema de HPLC do IST/ITN

A reduzida dimensão das partículas faz com que a área superficial disponível para a permuta seja elevada, o que conduz a uma maior resolução <sup>[11][12]</sup>.

A amostra é injetada através de uma seringa e, de seguida, o eluente arrasta-a para o sistema de HPLC, a pressão controlada assegurada por uma bomba. Existe um detetor gama que monitoriza os diferentes tempos a que os vários componentes radioativos da amostra saem da coluna, sendo identificados pelo correspondente tempo de retenção ( $t_R$ ), que corresponde ao intervalo de tempo entre a injeção e a sua deteção pelo detetor <sup>[18][30]</sup>.

A maior vantagem do HPLC está relacionada com a sua elevada resolução ( $R_s$ ), isto é, com o grau de separação entre dois picos adjacentes <sup>[12][30]</sup>.

A principal limitação do HPLC é a retenção de  $^{99m}\text{Tc}$  hidrolisado no topo da coluna, não sendo contabilizado como impureza, o que leva a uma sobrevalorização da pureza radioquímica, sendo muito importante o controlo da atividade injetada e da atividade eluída. Pode também ocorrer retenção de Sn (II) na coluna, o que faz com que, nas análises seguintes, possa haver redução adicional do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , obtendo-se assim uma pureza radioquímica sobrevalorizada <sup>[12][30]</sup>.

No sistema de HPLC utilizam-se colunas com partículas de sílica de pequenas dimensões (5-10 $\mu\text{m}$ ) revestidas com a fase estacionária <sup>[1][12]</sup>. Geralmente as colunas de HPLC são de tubo de aço, com 2-5mm de diâmetro e 15-30cm de comprimento, que contém o enchimento <sup>[12]</sup>.

Um dos métodos de HPLC mais usuais é o HPLC de fase reversa, em que são utilizadas colunas com uma fase estacionária apolar, que são cadeias alquílicas com átomos de carbono, ligadas quimicamente à sílica, sendo as mais comuns a C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> [12]. No HPLC de fase reversa, utiliza-se como eluente uma solução tampão em meio aquoso e um solvente orgânico designado por modificador (acetonitrilo, metanol), em pequena percentagem [11][12].

### 2.3.3. Pureza radionuclídica

A pureza radionuclídica é definida como a proporção entre a radioatividade devida ao radionuclídeo em causa e a radioatividade total da amostra [7][10][12][31][32]. Como tal, a determinação da pureza radionuclídica requer determinação da identidade e quantidade de todos os radionuclídeos presentes [1][7][12][25].

As impurezas radionuclídicas podem ter efeitos significativos na dose de radiação total do paciente e na qualidade das imagens obtidas, daí a extrema importância do controlo rigoroso dos níveis de impurezas radionuclídicas dos radiofármacos [12][32].

No caso do <sup>99m</sup>Tc, a principal impureza radionuclídica é o <sup>99</sup>Mo devido à eventual eluição de pequenas quantidades de <sup>99</sup>Mo juntamente com <sup>99m</sup>Tc [10][12].

O <sup>99</sup>Mo é determinado por atenuação  $\gamma$ , numa câmara de ionização, sendo que a determinação se baseia nas diferentes energias do <sup>99</sup>Mo (740keV) e do <sup>99m</sup>Tc (140keV) [12][31]. Assim, usando uma blindagem de chumbo (cerca de 6mm de espessura), a radiação do <sup>99m</sup>Tc é completamente absorvida, enquanto a radiação devida ao <sup>99</sup>Mo é detetada [12][31]. A contaminação por <sup>99</sup>Mo deve ser inferior a 0,1% da radioatividade total da amostra, e é dada através da expressão (**Equação 2.8**) [6][7][31]:

$$\%^{99}Mo = \frac{\text{Atividade medida com proteção}}{\text{Atividade medida sem proteção}} \times 100 \quad (2.8)$$

### 2.3.4. Pureza química

A contaminação do eluído por alumínio pode dever-se à degradação da coluna de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) do gerador, por aquecimento excessivo ou por tratamento com soluções fortemente ácidas [10][11][12].

O teor em alumínio determina-se através de métodos colorimétricos, com recurso a *kits* disponíveis comercialmente [8][10][31]. Cada *kit* fornece tiras que contêm o agente complexante do alumínio (*Aluminon*) e uma solução padrão de alumínio (Al<sup>3+</sup>) (**Figura 2.8**) [10][11].



Figura 2.8 - Kit utilizado para determinação da pureza química do eluído (Biorex) [34]

Ao aplicar-se uma alíquota de eluído e uma alíquota de solução padrão de  $\text{Al}^{3+}$  numa tira, compara-se a intensidade de cor das manchas resultantes. Se a cor da mancha do eluído for mais intensa que a da solução padrão, significa que apresenta uma quantidade excessiva de alumínio, e como tal não deverá ser utilizado [8][10][14][32].

A presença de alumínio pode interferir com a preparação de diferentes radiofármacos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , uma vez que pode competir na ligação química com os ligandos presentes nos kits a marcar com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  [12]. No caso dos difosfonatos, pode ocorrer formação de radiocoloides, o que leva à captação hepática e esplénica [14]. Elevados níveis deste elemento podem ser tóxicos para os pacientes [31].

O teor de alumínio deverá ser inferior a  $10\mu\text{g Al/ml}$  de eluído [10][11][32].

## 2.4. Fracionamento de kits de radiofármacos

Esta prática consiste na reconstituição de um kit liofilizado de um fármaco com um determinado volume de água destilada ou  $\text{NaCl}$  0,9%, segundo as indicações técnicas recomendadas pelo fabricante, e fracionamento desse volume em diversas frações, que serão posteriormente armazenadas a temperaturas entre  $-10$  e  $-70^\circ\text{C}$ , para utilização futura [14][35][36].

A vantagem deste procedimento reside no facto de permitir maximizar o uso do liofilizado, uma vez que possibilita a marcação das frações de um dado kit, em diferentes momentos, ao invés de se utilizar um frasco de kit para um só dia, reduzindo assim os custos.

No caso do HMDP (*Osteocis*®), a utilização de frações pode levar a reduções significativas nos gastos dos serviços de MN (Tabela 2.5) [2].

**Tabela 2.5** – Custos monetários e montantes economizados associados ao fracionamento e ao não fracionamento de frascos de HMDP (*Osteocis*<sup>®</sup>)

	Sem fracionamento	Com fracionamento	Montante economizado
Custo semanal	53,50 €	10,70 €	42,80 €
Custo mensal	214 €	171,20 €	171,20 €
Custo anual	2782 €	556,40 €	2225,60 €

Após marcação com  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , estéril e apirogénio, deve ser efetuado o controlo da pureza radioquímica e pH, que deverão estar de acordo com as especificações dos respetivos fabricantes. Valores de pureza radioquímica desadequados podem dever-se a problemas no fracionamento dos *kits* frios (presença de ar que provoca a oxidação do estanho e conseqüentemente a não redução do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , reduzida massa de molécula a marcar que conduz a uma marcação pouco eficiente), problemas no armazenamento (temperatura e duração), e/ou problemas na marcação da fração. Esta é uma prática não recomendada pelos fornecedores, uma vez que altera as formulações originais dos *kits*, podendo ocorrer degradação do agente redutor e diminuição da eficiência de marcação [14].

Segundo *William K. Fleming et al* (1992), fracionando frascos de *Sestamibi* em 4 frações de 0,5ml, verifica-se uma excelente estabilidade, após marcação com 740MBq de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , mesmo com cinco dias de congelamento, com obtenção de valores de pureza radioquímica entre 90 e 96% [35].

De acordo com *Vijay Kumar* (1997), aquando do fracionamento de *kits* frios idealmente devem-se utilizar volumes reduzidos de NaCl 0,9% (0,1 a 1ml) para reconstituição do *kit*, armazenar as frações em frascos com atmosfera de azoto e a temperaturas inferiores a -20°C e quando necessário aumentar a quantidade de agente estanhoso. Para este autor, o fator predominante na estabilidade das frações é a preservação de uma quantidade adequada de estanho [37].

Segundo *Bayomi T. et al* (2009), é possível fracionar frascos de MDP em 10 frações de 0,5ml e obter valores de pureza radioquímica superiores a 95% até três meses após o fracionamento. As frações podem ser armazenadas nas condições: sem oxigénio e congelação (-20 a -28°C); sem oxigénio e refrigeração (0 a 4°C); e com oxigénio e congelação (-20 a -28°C). O mesmo se verifica com frações de HMDP, quando fracionadas em 8 frações de 0,5ml, à exceção de quando são armazenadas

na presença de oxigénio e congelação (-20 a -28°C), propondo o aumento da concentração de ião estanhoso, como solução <sup>[3]</sup>.

Conforme Santos L. (2011), é possível fracionar frascos de Tetrofosmina (*Myoview*<sup>TM</sup>) em 6 frações de 1ml, que podem ser marcadas com atividades de 11.100MBq de <sup>99m</sup>Tc, obtendo-se imagens de boa qualidade <sup>[38]</sup>. Já de acordo com Faria D. et al (2005), os frascos de *Myoview*<sup>TM</sup> devem ser fracionados em 4 frações de 0,5ml, que após marcação com uma atividade máxima de 18.500MBq, apresentam valores de pureza radioquímica elevados e comportamento biológico idêntico ao do frasco não fracionado, após armazenamento durante 40 dias à temperatura de -20°C <sup>[39]</sup>.

Com base na publicação de estudos que remetem para a eficácia da técnica de fracionamento de *kits* de diversos fármacos (MDP, HMDP, Tetrofosmina, Sestamibi, entre outros) e que fornecem suporte metodológico a este trabalho, procurou-se estudar esta prática com *kits* de HMDP, utilizados na aquisição de cintigrafias ósseas.

## 2.5. Controlo bacteriológico

Na preparação de radiofármacos e em especial no fracionamento de *kits*, é imperativo trabalhar-se em condições de assepsia, de forma a assegurar a esterilidade das preparações obtidas, pelo que se torna importante avaliar a qualidade do ar e as superfícies de trabalho onde estas práticas são realizadas.

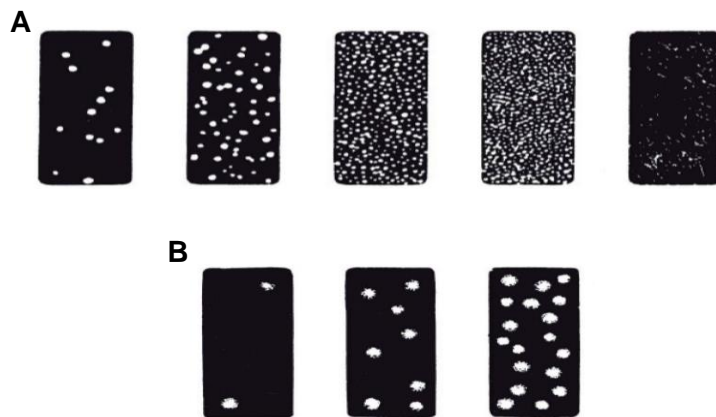
A Câmara de Fluxo Laminar (CFL) constitui um dos locais mais críticos, uma vez que é onde se realiza o processo de fracionamento e os procedimentos de marcação dos *kits* e respetivas frações com <sup>99m</sup>Tc, tal como os locais de armazenamento das frações e dos fármacos (refrigerador/congelador).

Este tipo de controlo pode ser efetuado com recurso a placas de *Petri* contendo um determinado meio de cultura. A Triptona Soya Agar (TSA) constitui um dos mais populares meios de cultura, é rico em carboidratos e proteínas, permitindo o crescimento de uma vasta gama de microrganismos, aeróbios e anaeróbios, a várias temperaturas <sup>[40]</sup>. Este meio tem a vantagem de ter uma fácil preparação (**Capítulo III – item 3.6**) e preço razoável.

Após um período de incubação específico, procede-se à contagem macroscópica das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) visíveis em cada placa.

O aspeto das colónias é variável consoante o tipo de micro-organismo (bactéria ou fungo), as colónias de bactérias apresentam um aspeto geralmente viscoso e

configuração circular, enquanto as de fungos exibem um aspeto irregular (**Figura 2.9**). A concentração de bactérias no ar é calculada dividindo o volume de ar do local da amostra pelo número de colónias de micro-organismos visíveis macroscopicamente. Geralmente, o resultado da contagem de bactérias totais é definido como UFC/m<sup>3</sup> de ar <sup>[41]</sup>.



**Figura 2.9** – Aspeto e densidade das UFC: **A** - bactérias e **B** – fungos <sup>[42]</sup>

Em Portugal, o Decreto-Lei que regulamenta os níveis de concentração máxima de micro-organismos é o *Dec. Lei nº79/2006*, de 4 de Abril, que estipula um máximo de 500UFC/m<sup>3</sup> para bactérias e fungos <sup>[43]</sup>. Valores abaixo deste limite não implicam perigo para a saúde, ou seja, não se pode considerar que haja contaminação, nem propagação de doenças, assegurando-se assim o controlo das infeções <sup>[44]</sup>.

Relativamente às superfícies de trabalho, em meio hospitalar e farmacêutico, o número de bactérias e fungos não deve exceder as 5UFC/cm<sup>2</sup> <sup>[41]</sup>.

Os micro-organismos podem ser classificados de acordo com a temperatura de multiplicação em psicrófilos, psicrotróficos, mesófilos e termófilos. Assim, os micro-organismos psicrófilos apresentam uma temperatura de multiplicação entre 0 e 20°C e os psicrotróficos entre os 0 e os 7°C, sendo que ambientes refrigerados são propícios à multiplicação de ambos. Os micro-organismos mesófilos têm uma temperatura ótima de multiplicação entre 25 e 40°C e os termófilos entre 45 e 65°C <sup>[45]</sup>.



## Capítulo III

### 3. Metodologia

Os estudos efetuados no âmbito desta dissertação envolveram duas partes distintas. Numa primeira parte realizaram-se estudos com o objetivo de avaliar qual a melhor metodologia a adotar para fracionamento de *kits* frios de HMDP. Para tal, analisaram-se os resultados de pureza radioquímica de frações obtidas por duas formas de fracionamento diferentes (I e II), após marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ . O fracionamento I consistiu na reconstituição de um único frasco de HMDP com 5ml de NaCl (0,9%) obtendo-se dez frações com um volume de 0,5ml, para estudo simultâneo de frações refrigeradas e congeladas. Já o fracionamento II compreendeu a utilização de dois frascos em paralelo, um para estudo de frações refrigeradas e outro para estudo das frações congeladas, tendo sido cada frasco reconstituído com 5 ml de NaCl (0,9%) de forma a obter-se cinco frações com 1ml cada.

Todos os fracionamentos foram realizados em segundas-feiras, de forma a avaliar o comportamento das frações marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  diariamente ao longo da semana (Figura 3.1).

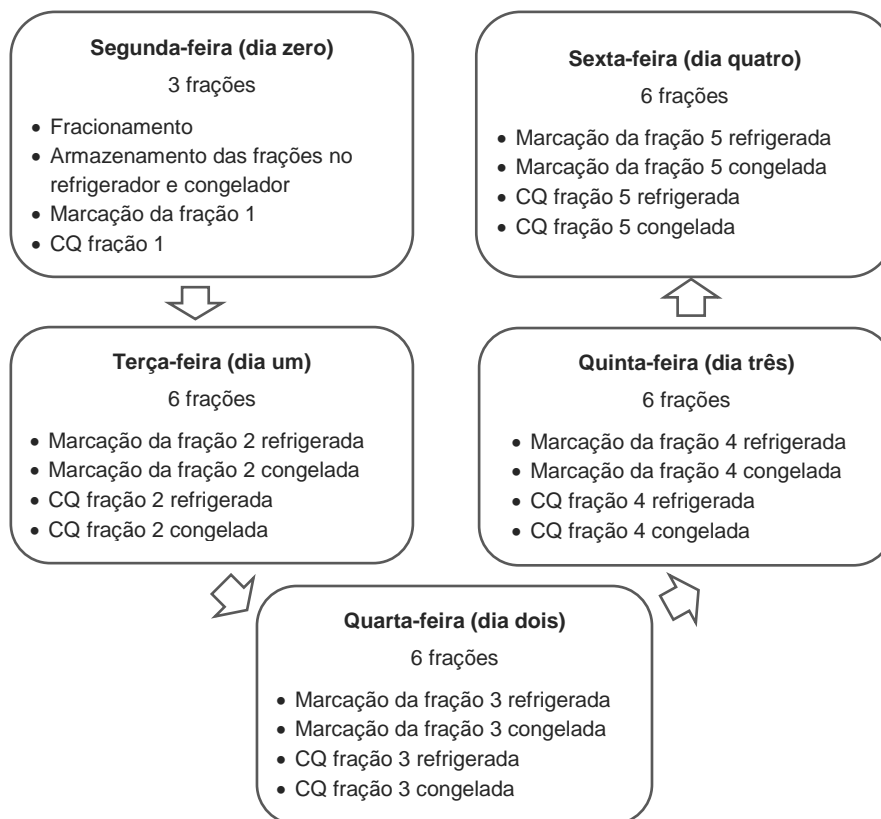


Figura 3.1 – Esquema representativo dos procedimentos realizados por dia de trabalho

No dia zero estudaram-se três frações, uma proveniente do frasco correspondente ao fracionamento I, e duas dos frascos com a técnica de fracionamento II (estudo de estabilidade e estudo em modelo animal). Nos restantes dias estudaram-se seis frações, uma refrigerada e uma congelada, obtidas a partir do frasco com a técnica de fracionamento I, e quatro, uma refrigerada e uma congelada de cada frasco com a técnica de fracionamento II (estudo de estabilidade e estudo em modelo animal).

Na segunda parte do trabalho realizaram-se estudos de biodistribuição em modelo animal, após administração de amostras de determinadas frações de HMDP marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  em murganhos *Balb C*.

Como controlo, foi marcado um frasco de acordo com as especificações do fabricante, isto é, sem fracionamento, designado “frasco padrão”.

De forma a controlar os locais mais expostos a eventuais contaminações bacteriológicas, procedeu-se ao controlo bacteriológico da CFL e do refrigerador.

A marcação das frações foi realizada diariamente, à mesma hora, e com atividades e volumes de marcação o mais semelhantes possível, de forma a uniformizar o procedimento.

Os frascos de *Osteocis*<sup>®</sup> utilizados pertenciam ao mesmo lote (*C005B*), tendo validade até 22 de Março de 2013.

### 3.1. Eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ e CQ do eluído

O eluído usado para marcação do frasco padrão e das frações de HMDP foi obtido a partir de um gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  *Elumatic-III IBA* de coluna húmida, cujas eluições foram efetuadas de acordo com as indicações do fabricante <sup>[46]</sup>.

O controlo da pureza química realizou-se com recurso a um *kit* de alumina *Biodex* e a determinação do pH com papel indicador *MERCK*, de acordo com o procedimento recomendado <sup>[8][10][12][14][31][32]</sup>.

Para controlo da pureza radionuclídica utilizou-se o método de atenuação gama, de acordo com o qual se realizaram medições das atividades do frasco de eluído, numa câmara de ionização *Carpintec Inc CRC-25R*, com e sem suporte de 6mm de chumbo, de forma a que apenas a energia do  $^{99}\text{Mo}$  (740keV) fosse detetada <sup>[12][31]</sup>.

Em relação à determinação da pureza radioquímica, a mesma foi efetuada com recurso ao sistema cromatográfico recomendado na Farmacopeia portuguesa, composto por fase móvel de metanol/água (80/20) e a fase estacionária de *Whatman n°1* <sup>[6][7][11]</sup>.

Em todas as marcações utilizou-se eluído fresco, com valores de pH, pureza química e radioquímica em consonância com a Farmacopeia portuguesa e as especificações do fabricante <sup>[10][13][14][15]</sup>.

### 3.2. Marcação do frasco padrão e otimização das técnicas de CQ

Como frasco padrão, marcou-se um frasco de HMDP com <sup>99m</sup>Tc (5030MBq e 3ml) de acordo com as recomendações do fabricante, ou seja, sem ser fracionado.

Imediatamente após a marcação foram realizados os testes de CQ, nomeadamente a determinação do pH e da pureza radioquímica.

Para determinação da pureza radioquímica, e uma vez que o mesmo fornecedor sugere dois métodos diferentes (I e II), foram realizados dois procedimentos distintos, de forma a testar qual o mais eficaz, tendo em conta os recursos materiais disponíveis <sup>[4][5]</sup>.

- Método I: constituído por dois sistemas cromatográficos, o sistema A com fase estacionária de ITLC-SG e com fase móvel de NaCl 0,9%, e o sistema B, também com fase estacionária de ITLC-SG e com fase móvel de acetona/metanol (1/1).

É de salientar que devido à descontinuação no mercado das tiras ITLC-SG GELMAN, propostas pelo fornecedor, as mesmas foram substituídas por tiras ITLC-SG *Varian*.

- Método II: constituído por dois sistemas cromatográficos, o sistema A com papel *Whatman* 17 Chr como fase estacionária e com fase móvel de NaCl 0,9%, e o sistema B, também com papel *Whatman* 17 Chr como fase estacionária e com fase móvel de metanol/água (85/15 V/V).

Apesar de o fornecedor sugerir como fase estacionária papel *Whatman* 17 Chr, foi utilizado papel *Whatman* nº1. O papel *Whatman* 17 Chr apresenta uma espessura superior à do papel *Whatman* nº1 (0,92 e 0,18mm, respetivamente), é altamente absorvente, e a sua velocidade de eluição é superior (190mm/30min), comparativamente ao papel *Whatman* nº1 (130mm/30min) <sup>[47]</sup>. Esta substituição ocorreu devido à impossibilidade de adquirir papel *Whatman* 17 Chr em tempo útil.

Com base nos radiocromatogramas obtidos com os dois métodos cromatográficos (**Capítulo IV – item 4.2**), as cromatografias das frações marcadas passaram a realizar-se de acordo com o método II.

Como complemento do controlo da pureza radioquímica do  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP, procedeu-se ao estudo de diversas amostras do frasco padrão por HPLC. O sistema de HPLC utilizado era constituído por uma bomba *Perkin–Elmer LC200*, detetores *UV-Vis LC290 tunable* e *Berthold LB-507A* radiométrico [48].

Porém, devido à escassez de estudos publicados com este radiofármaco, que tal como o MDP, é composto por uma mistura de espécies, tornou-se necessário realizar diversos ensaios.

Utilizou-se como fase estacionária uma coluna analítica de fase reversa *Macherey-Nagel C18* e um fluxo de 1 ml/min [29][48][49]. Trabalhou-se com eluição por gradiente, fazendo-se variar os solventes utilizados nos canais A e B, de forma a verificar qual o sistema mais adequado para a análise por HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP [48][49]. No canal A foram utilizados solventes aquosos, enquanto no canal B solventes orgânicos.

Assim, foram testados três conjuntos de fases móveis nos canais A e B respetivamente, com base em estudos publicados para o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e na experiência do grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do *IST/ITN* [49]:

- i. A - Solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) a 0,1%  
B - Acetonitrilo com 0,1% de TFA v/v
- ii. A - Água destilada  
B – Metanol (grau de pureza > 99%)
- iii. A – Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0,01M (50 ml) + Hidróxido de Tetrabutilamónio ( $\text{NBu}_4\text{OH}$ )  $10^{-3}\text{M}$  (500 ml)  
B – Metanol (grau de pureza > 99%)

O gradiente manteve-se igual, independentemente dos eluentes A e B utilizados, com variação das percentagens dos mesmos ao longo de 30 minutos (**Tabela 3.1** e **Figura 3.2**).

**Tabela 3.1** – Gradiente utilizado no controlo da pureza radioquímica do frasco padrão de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP por HPLC

Tempo (minutos)	% A (solvente aquoso)	% B (solvente orgânico)
5	90	10
15	10	90
5	10	90
1	90	10
4	90	10

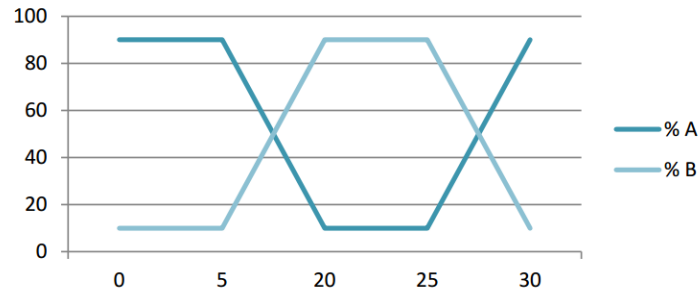


Figura 3.2 – Variação da percentagem das fases móveis (A e B) ao longo do tempo

### 3.3. Fracionamento I

Para este fracionamento, um frasco de HMDP foi dividido em dez frações<sup>‡‡</sup> com um volume de 0,5ml cada. Para tal, injetou-se 5ml de NaCl 0,9% no frasco, após desinfeção do septo do frasco com etanol a 70%, removeu-se igual volume de atmosfera do frasco, e agitou-se vigorosamente de forma a promover a total dissolução do liofilizado (Figura 3.3).

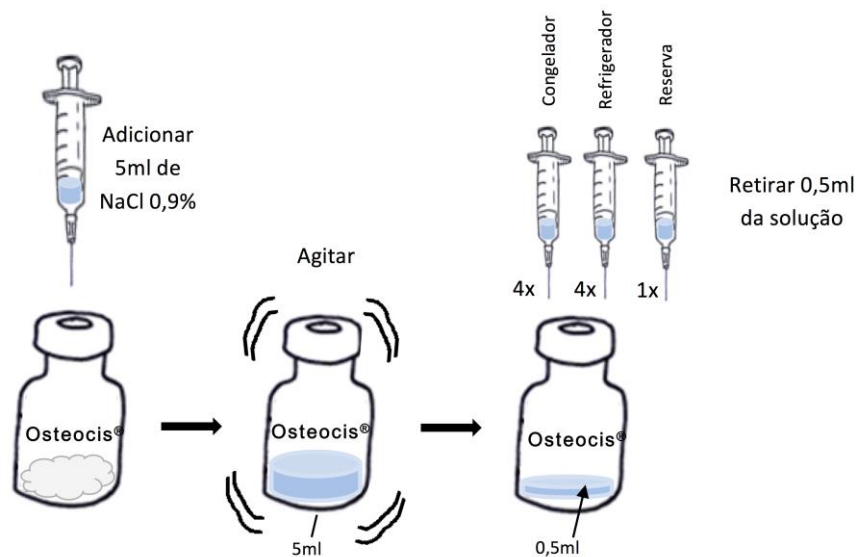


Figura 3.3 – Esquema representativo do fracionamento I

Das dez frações obtidas, apenas nove foram utilizadas tendo ficado uma de reserva para qualquer eventualidade.

<sup>‡‡</sup> As frações foram devidamente etiquetadas com o nome, lote e validade do *kit*, data de fracionamento, volume e local de armazenamento, tendo sido armazenadas em seringas de 2,5ml com agulhas de 25G sem ar, e colocadas num saco isolador.

Cada fração ficou com 1/10 da composição do frasco inicial: 0,3mg de oxidronato de sódio, 0,045mg de cloreto estanhoso dihidratado, 0,075mg de ácido ascórbico e 1mg de cloreto de sódio.

De forma a estudar a influência da temperatura de armazenamento na qualidade das frações, quatro foram armazenadas no refrigerador e outras quatro no congelador, onde permaneceram até à marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ .

Neste fracionamento, as frações foram marcadas diariamente à mesma hora, de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante <sup>[4][5]</sup>, utilizando-se atividades entre 741 e 761MBq, próximas da atividade mínima de marcação (740MBq) e o volume mínimo de marcação (2ml), como ponto de partida, tendo em conta a atividade proveniente do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  e o fluxo de trabalho do serviço de MN da *Fundação Champalimaud*.

A fração destinada à marcação no dia zero (segunda-feira), sem influência de fatores como temperatura e duração de armazenamento, foi mantida no frasco do *kit*, onde foi marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  imediatamente após o fracionamento.

Nos dias subsequentes, desde o dia um ao dia quatro, diariamente foram marcadas duas frações, uma congelada e outra refrigerada.

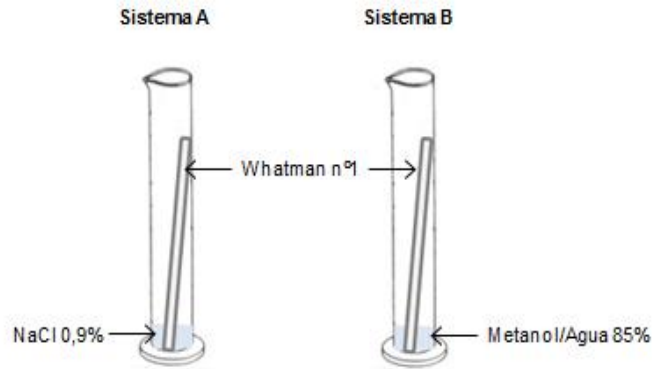
Cada fração foi retirada do refrigerador/congelador, e colocada na CFL até estabilização da temperatura. O conteúdo de cada seringa foi então transferido para um frasco de vácuo e removido igual volume de atmosfera do frasco. As frações refrigeradas foram marcadas primeiro, uma vez que o tempo necessário para estabilização da temperatura das frações congeladas foi superior.

O CQ de cada fração foi realizado imediatamente após marcação, tendo-se determinado o pH, com recurso a papel indicador *MERCK*, bem como a pureza radioquímica, por cromatografia ascendente em papel.

Com base nos resultados obtidos para o frasco padrão (**Capítulo IV - item 4.2**), foi utilizado o método II para determinação da pureza radioquímica de todas as frações. Assim, utilizou-se papel *Whatman* nº.1 (13 x 2cm) como fase estacionária, e como fases móveis<sup>§§</sup>, NaCl 0,9% (Sistema A) e Metanol/Água 85% (Sistema B) (**Figura 3.**).

---

<sup>§§</sup> Os solventes utilizados foram preparados no próprio dia e os recipientes de cromatografia selados de forma a manter a atmosfera saturada.



**Figura 3.4** – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados na determinação da pureza radioquímica das frações de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP obtidas pela técnica de fracionamento I

Para a realização destas cromatografias, foram utilizadas provetas (50ml) cuja dimensão, apesar de reduzida, era suficiente para que as extremidades laterais das tiras não contactassem com as suas paredes, evitando perturbações na ascensão do solvente que ocorre por capilaridade.

Finalizado o desenvolvimento das cromatografias, as atividades das partes iniciais ( $R_f = 0 - 0,15$  e  $R_f = 0 - 0,9$ ) e finais ( $R_f = 0,15 - 1$  e  $R_f = 0,9 - 1$ ) das tiras (A e B, respetivamente) foram medidas numa câmara de ionização *Carpintec Inc CRC-25R* para cálculo da percentagem de pureza radioquímica.

### 3.4. Fracionamento II

Tendo em conta os valores de pureza radioquímica obtidos com o fracionamento I (**Capítulo IV – item 4.3**), procedeu-se a uma alteração na metodologia, ensaiando um fracionamento diferente, intitulado fracionamento II.

No fracionamento II foram utilizados quatro frascos ( $n=4$ ) de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP, dois para realização do estudo de estabilidade e os outros dois para estudos em modelo animal, após determinação da pureza radioquímica.

Para cada estudo um frasco ficou reservado para as frações congeladas e o outro para as frações refrigeradas.

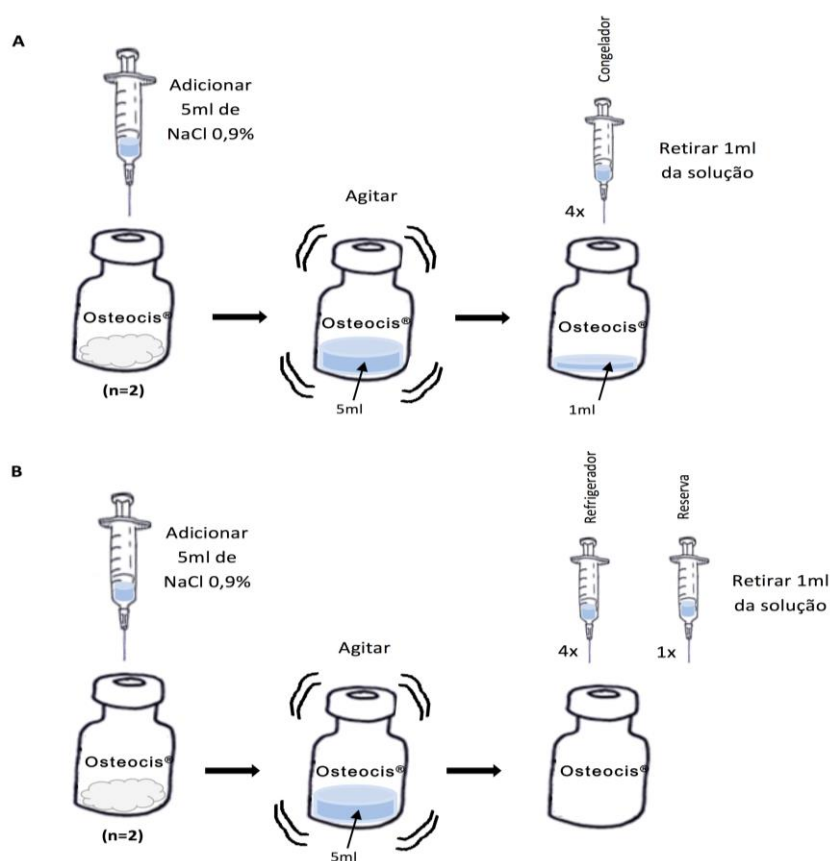
Cada frasco de HMDP foi dividido em cinco frações<sup>\*\*\*</sup> com um volume de 1 ml cada. Para tal, injetou-se 5ml de NaCl 0,9% no frasco, após desinfeção do septo do mesmo

<sup>\*\*\*</sup> As frações foram devidamente etiquetadas com o nome, lote e validade do *kit*, data de fracionamento, volume e local de armazenamento, tendo sido armazenadas em seringas de 2,5ml com agulhas de 25G sem ar, e colocadas num saco isolador.

com etanol a 70%, removeu-se igual volume de atmosfera do frasco, e agitou-se vigorosamente de forma a promover a total dissolução do liofilizado (**Figura 3.5**).

Cada fração ficou com 1/5 da composição do frasco inicial: 0,6mg de oxidronato de sódio, 0,09mg de cloreto estanhoso dihidratado, 0,15mg de ácido ascórbico e 2mg de cloreto de sódio, isto é, com o dobro da quantidade dos componentes em relação ao fracionamento I.

Em cada estudo, de forma a estudar a influência da temperatura de armazenamento na qualidade das frações, imediatamente após o fracionamento, as mesmas foram armazenadas em locais distintos, as de um frasco no refrigerador e as do outro frasco no congelador, onde permaneceram até à marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ .



**Figura 3.5** – Esquema representativo do fracionamento II: **A** – frações congeladas; **B** – frações refrigeradas

Tal como no fracionamento I, as frações foram marcadas diariamente, à mesma hora e de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante <sup>[4][5]</sup>, utilizando-se atividades de marcação entre 1272 e 1590 e volumes de marcação próximos de 3ml, tendo em conta a atividade proveniente do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  e o fluxo de trabalho do serviço de MN da *Fundação Champalimaud*.

As frações de dia zero (segunda-feira) foram marcadas diretamente no frasco, imediatamente após o fracionamento do mesmo, sendo que em cada estudo, no dia zero apenas se utilizou uma fração, ficando a outra de reserva para qualquer eventualidade. À semelhança do fracionamento I, nos dias seguintes, até ao dia quatro, diariamente foram marcadas duas frações, uma congelada e outra refrigerada, as quais foram retiradas do refrigerador/congelador, e colocadas na CFL até estabilização da temperatura. O conteúdo de cada seringa foi então transferido para um frasco de vácuo e removido igual volume de atmosfera do frasco. As frações refrigeradas foram marcadas primeiro, uma vez que o tempo necessário para estabilização da temperatura das frações congeladas foi superior.

#### 3.4.1. Frações para estudo de estabilidade

Relativamente ao CQ das frações destinadas ao estudo de estabilidade, a determinação do pH foi realizada com papel indicador *MERCK*, e a pureza radioquímica, por cromatografia ascendente em papel, imediatamente após a marcação de cada fração e a cada 2 horas, até às 8 horas após a marcação (0, 2, 4, 6 e 8 horas).

Com base nos resultados obtidos para o frasco padrão (**Capítulo IV – item 4.2**), tal como no fracionamento I (**Capítulo IV – item 4.3**), a determinação da pureza radioquímica de todas as frações foi realizada de acordo com o método II. Portanto, utilizou-se papel *Whatman* nº.1 (13 x 2cm) como fase estacionária, e como fases móveis<sup>†††</sup>, NaCl 0,9% (Sistema A) e Metanol/Água 85% (Sistema B). A cromatografia foi realizada em provetas (50ml), assim como na técnica de fracionamento I. Terminado o desenvolvimento cromatográfico, procedeu-se à medição das atividades das partes iniciais ( $Rf= 0 - 0,15$  e  $Rf= 0 - 0,9$ ) e finais ( $Rf= 0,15 - 1$  e  $Rf= 0,9 - 1$ ) das tiras (A e B, respetivamente) na câmara de ionização para cálculo da percentagem de pureza radioquímica.

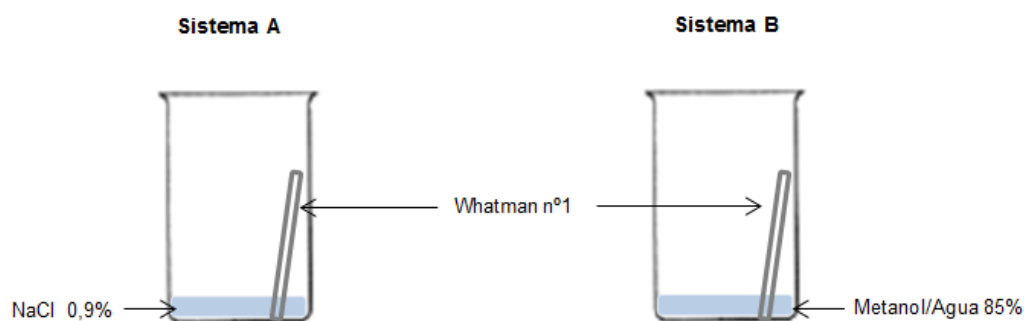
#### 3.4.2. Frações para estudo em modelo animal

Após o estudo de estabilidade, procedeu-se ao fracionamento de dois novos frascos de HMDP (*Osteocis*<sup>®</sup>), para estudos em modelo animal, de acordo com o fracionamento II.

---

<sup>†††</sup> Os solventes utilizados foram preparados no próprio dia e os recipientes de cromatografia selados de forma a manter a atmosfera saturada.

O CQ (pH e pureza radioquímica) destas frações foi efetuado da mesma forma que o das frações destinadas ao estudo de estabilidade, à exceção da pureza radioquímica que foi determinada imediatamente após a marcação das frações e às 4 horas. Devido aos resultados obtidos com as frações do estudo de estabilidade (**Capítulo IV – item 4.4.1**), optou-se por alterar os recipientes de cromatografia, utilizando provetas na cromatografia realizada imediatamente após a marcação das frações, e tinas cromatográficas, de maior dimensão, na cromatografia das 4 horas (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados na determinação da pureza radioquímica das frações de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP para estudo em modelo animal obtidas pela técnica de fracionamento II, após marcação

Assim, para comparar a influência dos recipientes de cromatografia (provetas/tinas) no valor de pureza radioquímica das frações e averiguar qual o recipiente mais adequado, realizaram-se na fração congelada de dia dois (quarta-feira) duas cromatografias, uma em provetas e outra em tinas cromatográficas, após marcação.

Baseando-se nos resultados obtidos com ambos os recipientes cromatográficos (**Capítulo IV – item 4.4.2**), optou-se por valorizar apenas os resultados correspondentes às tinas, 4 horas após marcação das frações.

### 3.5. Estudos de biodistribuição

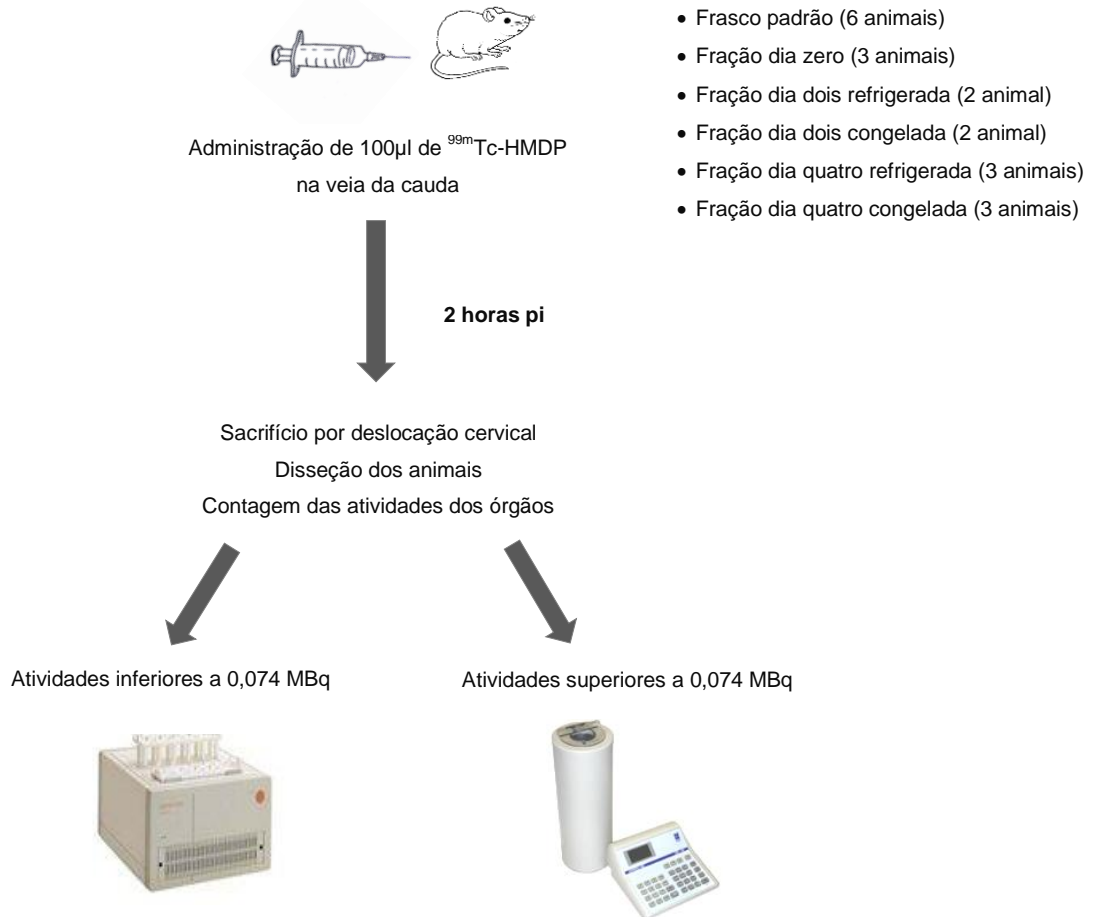
Para os estudos de biodistribuição foram utilizados dezanove ( $n=19$ ) murganhos fêmeas da linhagem *Balb C* com pesos entre 17,8 e 23g, <sup>[29]</sup>.

Inicialmente foi realizado um estudo com o frasco padrão, isto é, não fracionado e marcado de acordo com as especificações do fabricante. Neste estudo foram utilizados seis ( $n=6$ ) animais, dos quais três foram sacrificados 2 horas após a administração do radiofármaco e os outros três passadas 3 horas, com o propósito de quantificar a fixação óssea em diferentes intervalos de tempo e averiguar qual o intervalo de tempo mais adequado <sup>[29]</sup>.

Posteriormente foram realizados estudos de biodistribuição com frações <sup>‡‡</sup> (refrigeradas e congeladas), de forma a estabelecer uma comparação com o frasco padrão. As frações analisadas foram a de dia zero (segunda-feira), as frações refrigerada e congelada de dia dois (quarta-feira), e as frações refrigerada e congelada de dia quatro (sexta-feira). Todas as frações marcadas administradas aos animais obedeceram aos requisitos do controlo de qualidade de acordo com as especificações do fabricante e da Farmacopeia portuguesa (**Capítulo IV – item 4.4.2**) <sup>[4][5]</sup>.

Para a fração de dia zero foram utilizados três animais. Para cada fração de dia dois, refrigerada e congelada, foram utilizados dois animais. Já para cada fração de dia quatro, refrigerada e congelada, foram utilizados três animais (**Figura 3.7**).

(12 animais)



**Figura 3.7** – Representação esquemática das etapas integrantes dos estudos de biodistribuição em modelo animal

<sup>‡‡</sup> As frações utilizadas foram obtidas pelo método de fracionamento II (**Capítulo III - item 3.3.2**).

A administração das amostras de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  <sup>§§§</sup> (100 $\mu\text{l}$ ), do frasco padrão e das frações, foi efetuada por via endovenosa numa veia lateral da cauda, seguida da medição da atividade injetada no animal, numa câmara de ionização *Aloka Curiemeter IGC-3* (**Figura 3.8**) <sup>[29]</sup>.



**Figura 3.8** – Medição da atividade de um murganho *Balb C* na câmara de ionização *Aloka Curiemeter IGC-3* do *IST/ITN*, imediatamente após a administração de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$

Os animais foram sacrificados por deslocação cervical e sua atividade medida numa câmara de ionização. Imediatamente após o sacrifício procedeu-se à dissecação dos murganhos, com remoção de órgãos, nomeadamente osso (fémur), sangue, intestino, coração, rins, músculo e estômago. Os referidos órgãos foram colocados em tubos de ensaio para pesagem numa balança de precisão *Metler AE240* e medição das respetivas atividades numa câmara de ionização *Aloka Curiemeter IGC-3* (atividades superiores a 0,074MBq) ou contador gama *Berthold LB2111* (atividades inferiores a 0,074MBq).

Para cada animal, procedeu-se ao cálculo da percentagem de atividade injetada por órgão (%A.I./órgão) e da percentagem de atividade injetada por grama de órgão (%A.I./g), através das seguintes expressões <sup>\*\*\*\*</sup> (**Equação 3.1** e **Equação 3.2**):

$$\% A.I./\text{órgão} = \frac{\text{atividade do órgão}}{\text{atividade injetada}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% A.I./g = \frac{\% A.I./\text{órgão}}{\text{peso do órgão}} \times 100 \quad (3.2)$$

<sup>§§§</sup> As amostras administradas foram previamente sujeitas a determinação do pH e da pureza radioquímica.

<sup>\*\*\*\*</sup> Todas as atividades foram corrigidas para o decaimento.

Para os órgãos que não foram extraídos na totalidade, como sangue, músculo e osso, os cálculos efetuaram-se com base no pressuposto de que o sangue corresponde a 6% do peso total do animal, o músculo a 40% e o osso a 15% <sup>[50]</sup>.

Foi também calculada a percentagem de excreção total, que avalia a atividade excretada pelo animal desde a administração da amostra do radiofármaco até ao momento do sacrifício, através da fórmula (**Equação 3.3**):

$$\% \text{ excreção total} = \frac{\text{atividade do animal vivo} - \text{atividade do animal morto}}{\text{atividade do animal vivo}} \times 100 \quad (3.3)$$

### 3.6. Controlo bacteriológico

O controlo bacteriológico da CFL *Safeflow 1/30-15* e do refrigerador *GRAM Compact 210*, que constituem os locais com maior probabilidade de ocorrência de contaminações por micro-organismos, foi efetuado através da realização da técnica de exposição (método de sedimentação espontânea) utilizando placas de *Petri* com meio de cultura de TSA <sup>[40]</sup>. Não foi realizado o controlo bacteriológico no congelador, uma vez que abaixo dos 0°C provavelmente não ocorre crescimento bacteriano, daí ter sido realizado apenas no refrigerador <sup>[45]</sup>. Para além disso, o controlo de microrganismos com temperaturas de multiplicação entre 0°C e 7°C (psicrotróficos), apenas é obrigatório em alimentos <sup>[45]</sup>.

Este controlo foi efetuado simultaneamente aos procedimentos realizados na CFL e às manipulações que envolveram o refrigerador.

O meio de cultura (TSA) foi preparado na véspera dos estudos, respeitando todas as normas de preparação, de acordo com o seguinte protocolo:

- 1) Pesagem do meio desidratado (40g/l);
- 2) Aquecimento de água destilada até 90°C;
- 3) Reconstituição com a água destilada aquecida e agitação até dissolução completa de todo o ágar;
- 4) Esterilização por calor húmido (pressão 1 bar, 121°C) durante 20 minutos;
- 5) Arrefecimento até 50/60°C;
- 6) Distribuição em placas de *Petri* e solidificação.

Para este estudo foram utilizados dois tipos de placas de *Petri*, com as seguintes características:

- Placas A: destinadas à avaliação da qualidade do ar interno, são de maior dimensão (100mm), e apresentam menor quantidade de meio.
- Placas B: destinadas ao controlo das superfícies, são de menor dimensão (55mm), e encontram-se totalmente preenchidas com meio de cultura, de modo a poderem estar em contacto com a superfície a analisar.

Diariamente, antes da realização de qualquer procedimento nos locais a analisar, refrigerador e CFL, procedeu-se à desinfeção de todas superfícies com etanol a 70% e, no caso da CFL, complementou-se com raios Ultra Violeta (UV) durante aproximadamente 10 minutos.

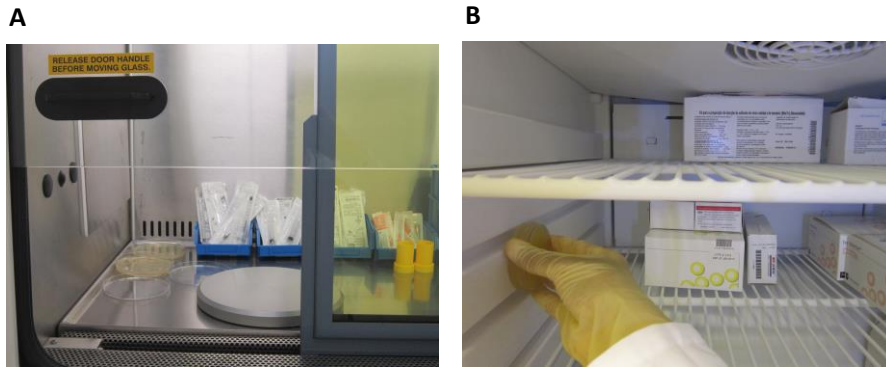
As provas de controlo microbiológico do ar foram realizadas com recurso a placas A, abrindo-as nos locais a analisar durante um período de tempo pré-determinado sempre em duplicado. As placas apenas foram abertas quando se encontravam no interior do local a analisar (refrigerador ou CFL) (**Figura 3.9 - A**). Estas placas foram colocadas no início dos procedimentos, após desinfeção cuidadosa dos locais, tendo sido retiradas no final dos mesmos.

No caso do refrigerador, para controlo da qualidade do ar, diariamente foram utilizadas somente duas placas, que permaneceram no seu interior até ao final do dia de trabalho. Inicialmente para os estudos de estabilidade permaneciam uma média de 10 horas e posteriormente, nos estudos em modelo animal, apenas cerca de 2 horas, permanecendo assim nos locais a analisar desde a primeira manipulação até à última.

Já na CFL foram colocados diversos pares de placas, em duplicado, para controlo da qualidade do ar, que foram sucessivamente retirados no final dos respetivos procedimentos, de forma a controlar este local no início e no final das manipulações. Numa primeira fase, para os estudos de estabilidade, foram colocadas placas a cada 2 horas, que permaneceram no local uma média de 1 hora e 30 minutos, posteriormente para os estudos em modelo animal, por dia, foi utilizado um único conjunto de placas que permaneceu no local durante uma média de 2 horas. Uma vez mais, as placas permaneceram no local a analisar desde o início das manipulações até ao final, período que foi diferente nos dois estudos.

As provas de controlo da esterilidade das superfícies foram efetuadas através de placas B. Este tipo de teste, realizou-se por contacto do meio de cultura existente na

placa com as superfícies do local a analisar (**Figura 3.9 - B**). Quanto ao refrigerador, diariamente foram utilizadas duas placas de contacto, uma no início do dia, após desinfecção cuidadosa do local, e a outra no final de todas as manipulações neste local. Na CFL, para cada procedimento, foi utilizado um conjunto de duas placas, uma no início e outra no final do mesmo.



**Figura 3.9** – Controlo bacteriológico: **A**- placas de análise da qualidade do ar da CFL *Safeflow 1/30-15*; **B**- placa de contacto para avaliação das superfícies do refrigerador *Gram Compact 210*

No final de cada dia, as placas devidamente identificadas<sup>††††</sup>, foram incubadas a diferentes temperaturas. Assim, as placas A (qualidade do ar) foram incubadas a 37°C durante 48 horas, ainda que tenha sido feita uma leitura às 24 horas, enquanto as placas B (superfícies de contacto) foram incubadas a 30°C durante 72 horas, com leitura também às 48 horas<sup>[41][44]</sup>.

Como controlo, fizeram-se controlos de cada amostragem, ou seja, por cada lote de placas feitas, incubou-se uma, exatamente nas mesmas condições das restantes, de forma a garantir a esterilidade do meio de cultura e das condições em que o mesmo foi preparado. Estas placas de controlo não foram expostas, tendo permanecido com as respetivas tampas colocadas.

Após o período de incubação, procedeu-se à análise macroscópica das placas para contagem das UFC visíveis.

<sup>††††</sup> Na identificação constava o local de estudo (refrigerador/CFL), data, hora e número de procedimento.



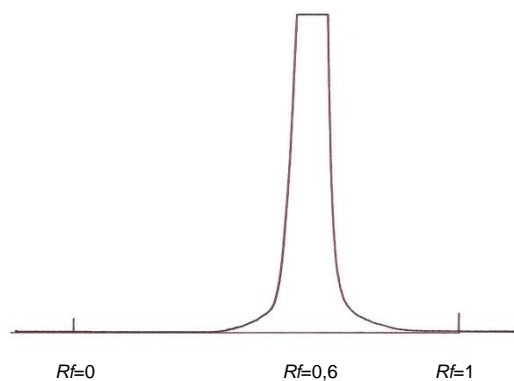
## Capítulo IV

### 4. Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes ao CQ do eluído, das frações marcadas, de acordo com o tipo de fracionamento realizado, assim como do frasco padrão. São também descritos os resultados dos estudos de biodistribuição em murganhos *Balb C*, assim como das provas de controlo bacteriológico realizadas à CFL e ao refrigerador.

#### 4.1. Eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ e CQ do eluído

Relativamente à pureza radioquímica, obtiveram-se sempre valores superiores a 95%, caracterizados por cromatogramas com picos bem definidos em  $R_f=0,6$  que correspondem a  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (Figura 4.1) [4][5].



**Figura 4.1** – Cromatograma do eluído com fase móvel de metanol/água (80/20) e fase estacionária de *Whatman* nº1 (10x1cm) - escala 1M

Em relação ao pH do eluído, obteve-se sempre o mesmo valor,  $\text{pH}=6$ , que se encontra entre dentro do intervalo de referência (4,0 e 8,0) [6][7][11][30].

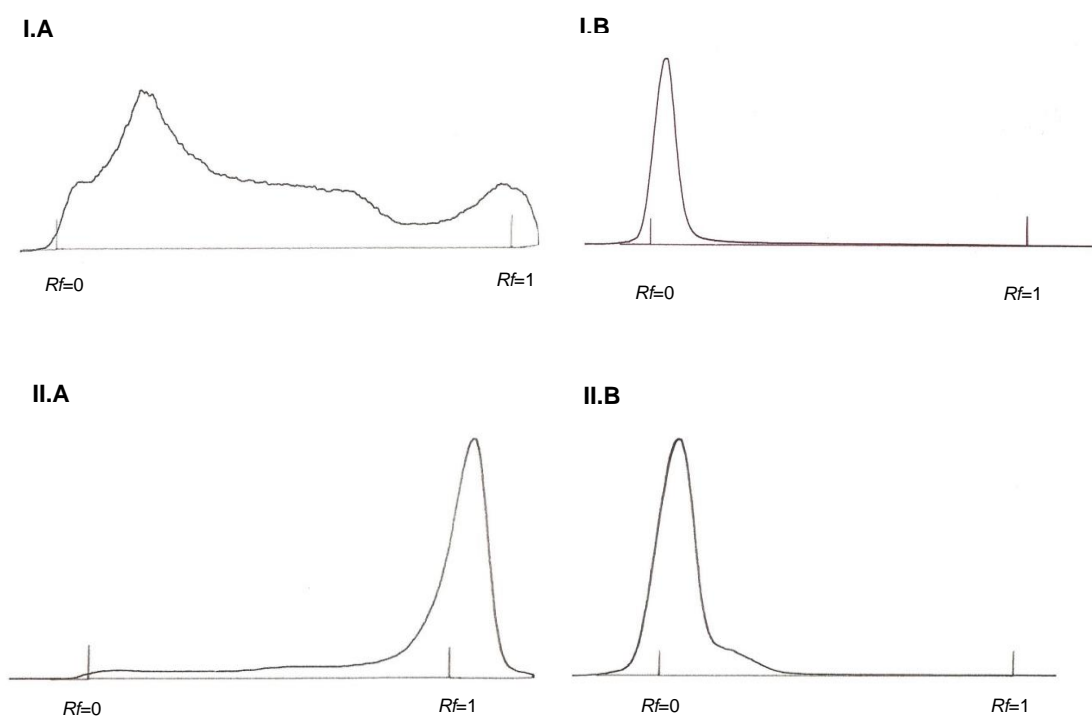
Quanto à pureza química, os valores obtidos foram sempre inferiores a  $10\mu\text{g Al/ml}$  de eluído. Na determinação da pureza radionuclídica, os valores de contaminação por  $^{99}\text{Mo}$  foram sempre inferiores a 0,1% da radioatividade total da amostra [6][7][10][11][31][32].

#### 4.2. Frasco padrão

Em relação à pureza radioquímica, por análise dos cromatogramas obtidos, verificou-se que em relação ao método I, o sistema A apresentava um cromatograma com

vários picos mal definidos, pelo que não era, de forma alguma, adequado ao controlo deste radiofármaco (**Figura 4.2 - I.A**), já o sistema B apresentava um cromatograma com um pico bem definido, no início da tira ( $Rf=0$ ), correspondente ao complexo de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  (**Figura 4.2 - I.B**).

Quanto ao método II, pôde-se verificar que em ambos os sistemas existiam dois picos bem definidos. No sistema A, constatou-se que ocorreu migração do complexo de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  para o final da tira ( $Rf=1$ ), permanecendo o  $^{99m}\text{TcO}_2$  no início da tira ( $Rf=0$ ) e o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em  $Rf=0,6$  (**Figura 4.2 - II.A**). Já no sistema B, o complexo de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  permaneceu no início da tira ( $Rf=0$ ), assim como o  $^{99m}\text{TcO}_2$ , e o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em  $Rf=0,8$  (**Figura 4.2 - II.B**).



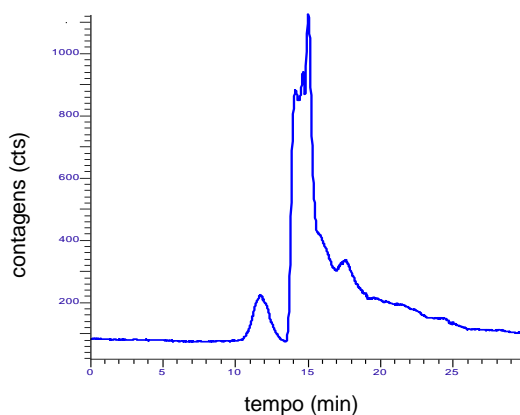
**Figura 4.2** – Cromatogramas do frasco padrão de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ : **I.A**- método I, sistema A - fase móvel de NaCl 0,9% e fase estacionária de ITLC-SG *Varian* (20x2,5cm) - escala 300K; **I.B**- método I, sistema B - fase móvel de acetona/metanol (1/1) e fase estacionária de ITLC-SG *Varian* (20x2,5cm) - escala 1M; **II.A**- método II, sistema A - fase móvel de NaCl 0,9% e fase estacionária de *Whatman* nº1 (13x2cm) - escala 300K; **II.B**- método II, sistema B - fase móvel de metanol/água (85/15) e fase estacionária de *Whatman* nº1 (13x2cm) - escala 300K

Com base nos cromatogramas obtidos com os dois métodos, optou-se por escolher o método II. Assim, analisando os dados relativos ao método II, verificou-se que o frasco padrão apresentou uma percentagem de  $^{99m}\text{Tc-HMDP}$  (pureza radioquímica) de 98%,

ou seja, superior a 95%. A percentagem total de impurezas radioquímicas,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$ , foi 0 e 1,8%, respetivamente, isto é, inferior a 5% [4][5][18].

Apesar de alguns estudos [51][52] demonstrarem que as tiras de ITLC-SG *Varian* constituem uma alternativa às tiras ITLC-SG GELMAN, com valores semelhantes de *R<sub>f</sub>* e de pureza radioquímica, e menor duração de desenvolvimento cromatográfico, verificou-se que, para o radiofármaco em estudo, são obtidos melhores valores de pureza radioquímica com papel *Whatman* nº1. É de salientar que resultados precedentes no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do *IST/ITN* indicaram diferenças no comportamento de diferentes compostos marcados utilizando ITLC-SG GELMAN e ITLC-SG *Varian*, conduzindo usualmente as tiras ITLC-SG *Varian* a resultados menos fiáveis.

Quanto aos estudos em HPLC, verificou-se que nenhum dos sistemas utilizados era adequado para realização da determinação da pureza radioquímica deste radiofármaco. O perfil dos cromatogramas obtidos caracterizou-se sempre pela existência de vários picos correspondentes às várias espécies que constituem o  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP. Verificou-se que não existia  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , uma vez que não se observava nenhum pico com tempo de retenção inferior a 5 minutos, altura em que saíria da coluna, se estivesse presente. A partir dos 15 minutos observou-se um arrastamento resultante da adsorção do  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP na coluna, que ficou aí retido sem ser arrastado pelos eluentes (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3** – Cromatograma de HPLC com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP: fase estacionária de C18 e fases móveis de metanol (B) e  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,01M (50 mL) +  $\text{NBu}_4\text{OH}$   $10^{-3}\text{M}$  (500 mL) (A)

Mesmo após substituição das fases móveis, o problema de retenção do radiofármaco na coluna manteve-se, com cerca de 70% da amostra injetada retida. Com a fraca recuperação da coluna, o resultado obtido não pôde ser considerado representativo da amostra analisada. Assim, com base nos resultados pouco satisfatórios obtidos para o

frasco padrão, não se prosseguiu com o estudo por HPLC das frações marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP.

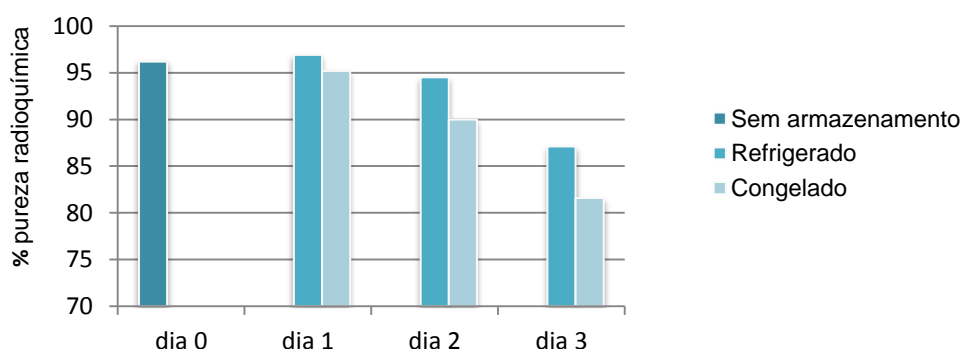
Em relação ao pH da amostra do frasco padrão, obteve-se um valor de 5,5, que se encontra dentro dos limites 5,0 e 7,0 <sup>[4][5]</sup>.

### 4.3. Fracionamento I

Em relação aos valores de pureza radioquímica das frações obtidas por este tipo de fracionamento, pôde-se verificar que ocorreu um decréscimo ao longo da semana (**Figura 4.4**). No dia zero (segunda-feira), a fração apresentou uma percentagem de 96%, indicando que após o fracionamento do frasco de *Osteocis*<sup>®</sup> em 10 frações, o valor de pureza radioquímica, sem influência da temperatura e do armazenamento, continua a ser superior a 95%, como recomendado pelo fabricante <sup>[4][5]</sup>.

No dia um (terça-feira), ambas as frações, refrigerada e congelada, apresentaram valores de pureza radioquímica superiores a 95%, 97 e 95%, respetivamente. Porém, a partir do dia dois (quarta-feira), os valores foram decrescendo, até 82%, correspondente à fração congelada de dia três (quinta-feira). Pôde-se também constatar que nos dias estudados, as frações refrigeradas exibiram valores de pureza radioquímica superiores às congeladas, ao contrário do que seria esperado.

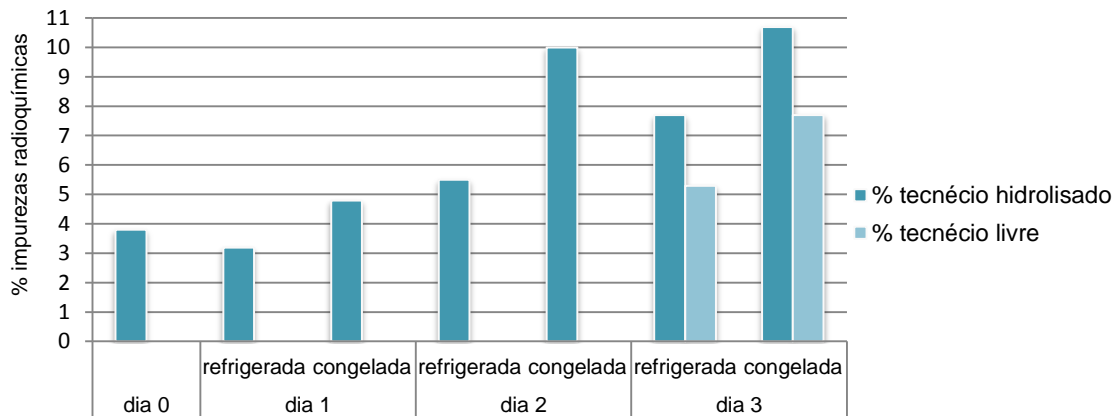
Com base nestes valores, que foram sucessivamente decrescendo até valores significativamente inferiores a 95%, não se realizou o controlo no dia quatro (sexta-feira), uma vez que valores de pureza radioquímica abaixo desse limiar podem comprometer a acuidade diagnóstica.



**Figura 4.4** - Valores de pureza radioquímica das frações obtidas por fracionamento I ao longo da semana

Uma análise mais detalhada das tiras permite-nos verificar que desde o dia de fracionamento (segunda-feira) até ao segundo dia após o mesmo (quarta-feira), as frações não apresentavam  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Esta impureza radioquímica surge apenas no

terceiro dia (quinta-feira), sendo superior na fração congelada (7,7%) comparativamente à fração refrigerada (5,3%). Relativamente ao  $^{99m}\text{TcO}_2$ , verificou-se que esta impureza se encontrava em todas as frações, uma vez mais, em maior percentagem nas frações congeladas. Assim, a contabilização de  $^{99m}\text{TcO}_2$  e  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  não ultrapassa os 5% recomendados apenas nas frações de dia zero (segunda-feira) e de dia um (terça-feira) (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5** – Percentagens de tecnécio hidrolisado e reduzido das frações obtidas por fracionamento I ao longo da semana

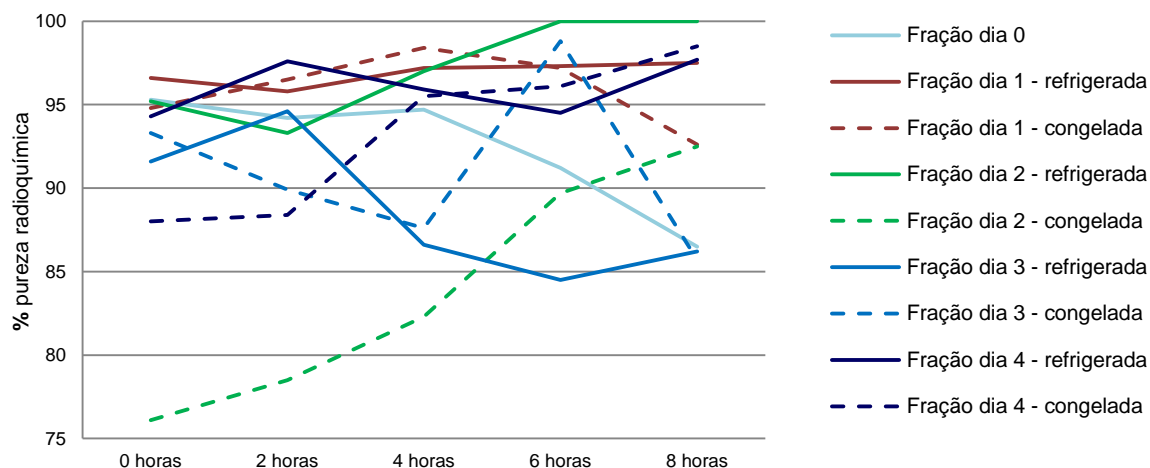
Os resultados da fração de dia zero, podem ter sido melhores pelo facto de a marcação desta fração, ao contrário das restantes, ter sido realizada no frasco, tendo ocorrido menor manipulação, e não sendo influenciada pela temperatura e duração de armazenamento.

Em relação ao pH das frações, obteve-se sempre um valor de 5,5, que se encontra dentro dos limites 5,0 e 7,0 <sup>[4][5]</sup>.

## 4.4. Fracionamento II

### 4.4.1. Frações para estudo de estabilidade

Em relação ao estudo de estabilidade após marcação, verificou-se que o padrão não foi linear, não se observando um registo constante ao longo das 8 horas, com acentuadas oscilações, contrariamente ao esperado. Previa-se que os valores de pureza radioquímica fossem decrescendo ao longo do tempo, devido a uma eventual reoxidação a  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , o que não foi indicado pela análise cromatográfica efetuada (**Figura 4.6**).

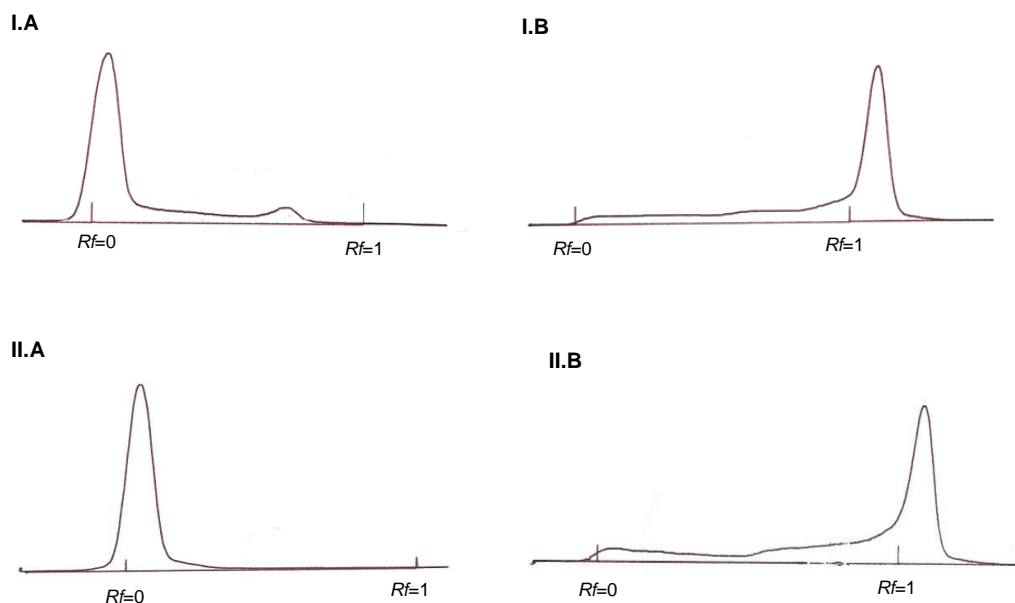


**Figura 4.6** - Valores de pureza radioquímica das frações a cada 2 horas - estudo de estabilidade

Com base na baixa credibilidade destes resultados, procedeu-se a uma alteração no procedimento cromatográfico.

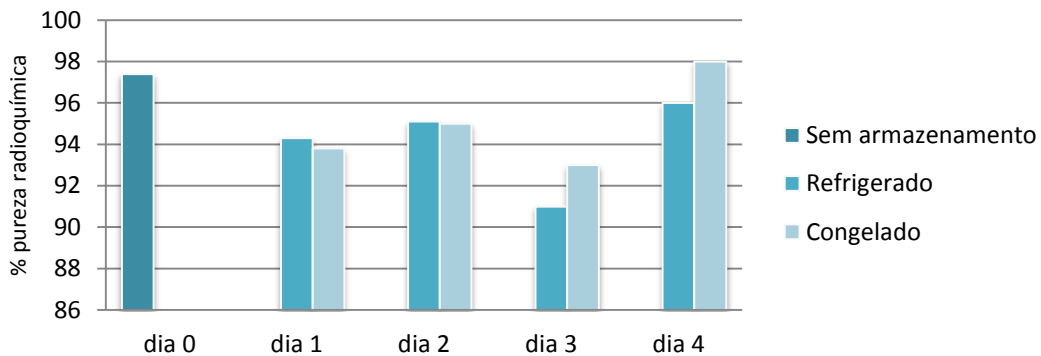
#### 4.4.2. Frações para estudo em modelo animal

Através da análise comparativa dos cromatogramas referentes à fração congelada de dia 2, após a marcação, utilizando provetas ou tinas, constatou-se que existiam algumas diferenças (**Figura 4.7**).



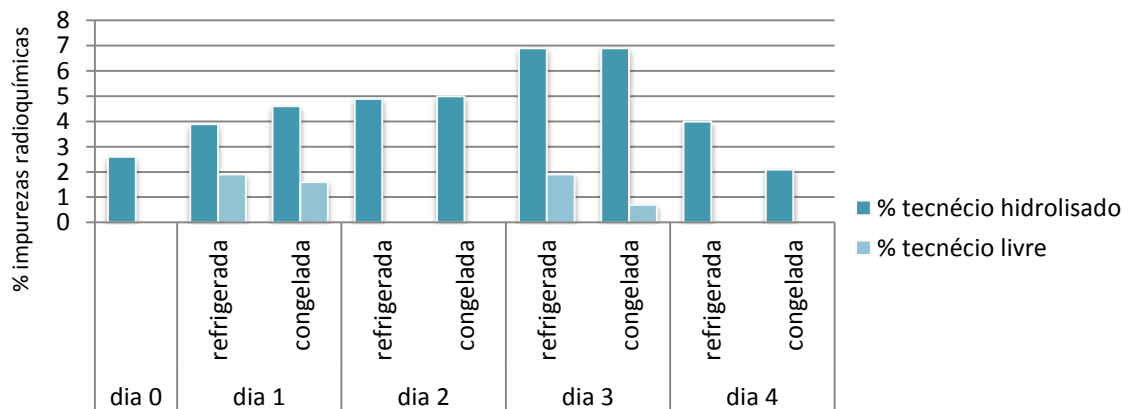
**Figura 4.7** - Cromatogramas da fração congelada de dia 2 (quarta-feira) imediatamente após a marcação: **I.A**- provetas – método II, sistema A (escala 1M); **I.B**- provetas – método II, sistema B (escala 1M); **II.A**- tinas – método II, sistema A (escala 1M); **II.B**- tinas - método II, sistema B (escala 1M)

A utilização de provetas como recipientes de cromatografia gerava um artefacto que contribuía para uma subvalorização dos valores de pureza radioquímica (81%), comparativamente aos valores obtidos com tinhas (93%). Assim, com base nestes resultados e nos resultados da fração refrigerada, foram considerados apenas os valores de pureza radioquímica relativos às cromatografias realizadas em tinhas, 4 horas após a marcação das frações (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8** - Valores de pureza radioquímica das frações obtidas por fracionamento II ao longo da semana, 4 horas após marcação

Mediante análise dos valores obtidos, pôde-se constatar que à exceção das frações refrigeradas e congeladas de dia um (94% cada) e dia três (91 e 93%, respetivamente), se obteve valores de pureza radioquímica superiores a 95%. Todavia, os valores abaixo deste limiar não são tão baixos que permitam concluir que estas frações não possam ser administradas. É de salientar que as frações refrigerada e congelada de dia quatro apresentam valores de pureza radioquímica elevados (96 e 98%, respetivamente), o que indica que com a técnica de fracionamento II, as frações podem ser utilizadas até 4 dias após o fracionamento, quer sejam armazenadas no congelador ou no refrigerador (**Figura 4.9**).



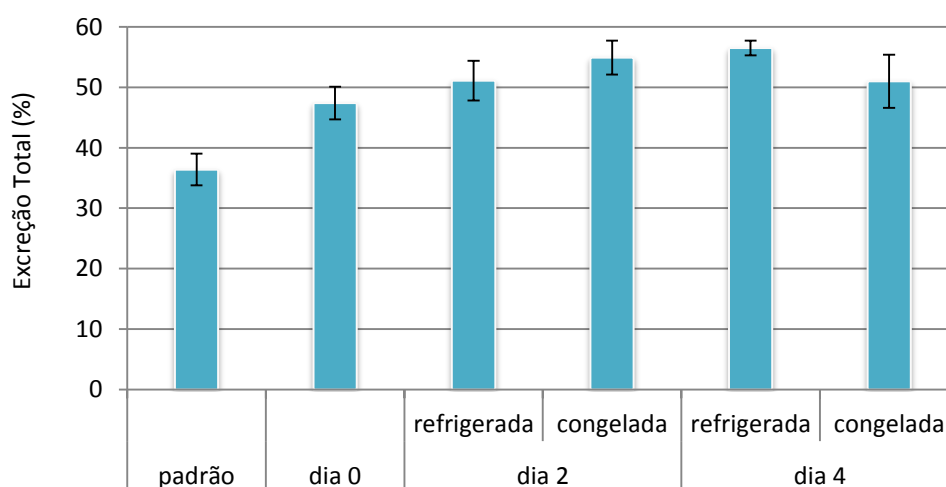
**Figura 4.9** - Percentagens de tecnécio hidrolisado e reduzido das frações obtidas por fracionamento II ao longo da semana, 4 horas após marcação

Em relação às impurezas radioquímicas destas frações, verificou-se que nos dias zero, dois e quatro, não havia  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Em relação ao  $^{99m}\text{TcO}_2$ , verificou-se que foi nas frações de dia três que atingiu valores superiores (7%). Assim, não se observou uma relação entre a percentagem de impurezas radioquímicas e a idade das frações.

#### 4.5. Estudos de biodistribuição

Relativamente aos estudos de biodistribuição realizados aos animais administrados com uma amostra do frasco padrão, optou-se por considerar apenas os valores correspondentes às 2 horas, uma vez que já se observava uma captação óssea considerável ( $8,9 \pm 0,5$  %A.I./g), para além de o padrão de biodistribuição ter sido muito semelhante às 2 e às 3 horas após administração da amostra (**Anexo II**).

Através da análise comparativa dos valores de % excreção total, verificou-se que, no geral, os valores relativos às frações e ao frasco padrão foram semelhantes entre si e comparativamente a estudos realizados com  $^{99m}\text{Tc-MDP}$ , tendo sido o valor correspondente ao frasco padrão, o mais baixo ( $36,4 \pm 2,6$ ) (**Figura 4.10**)<sup>[29]</sup>.



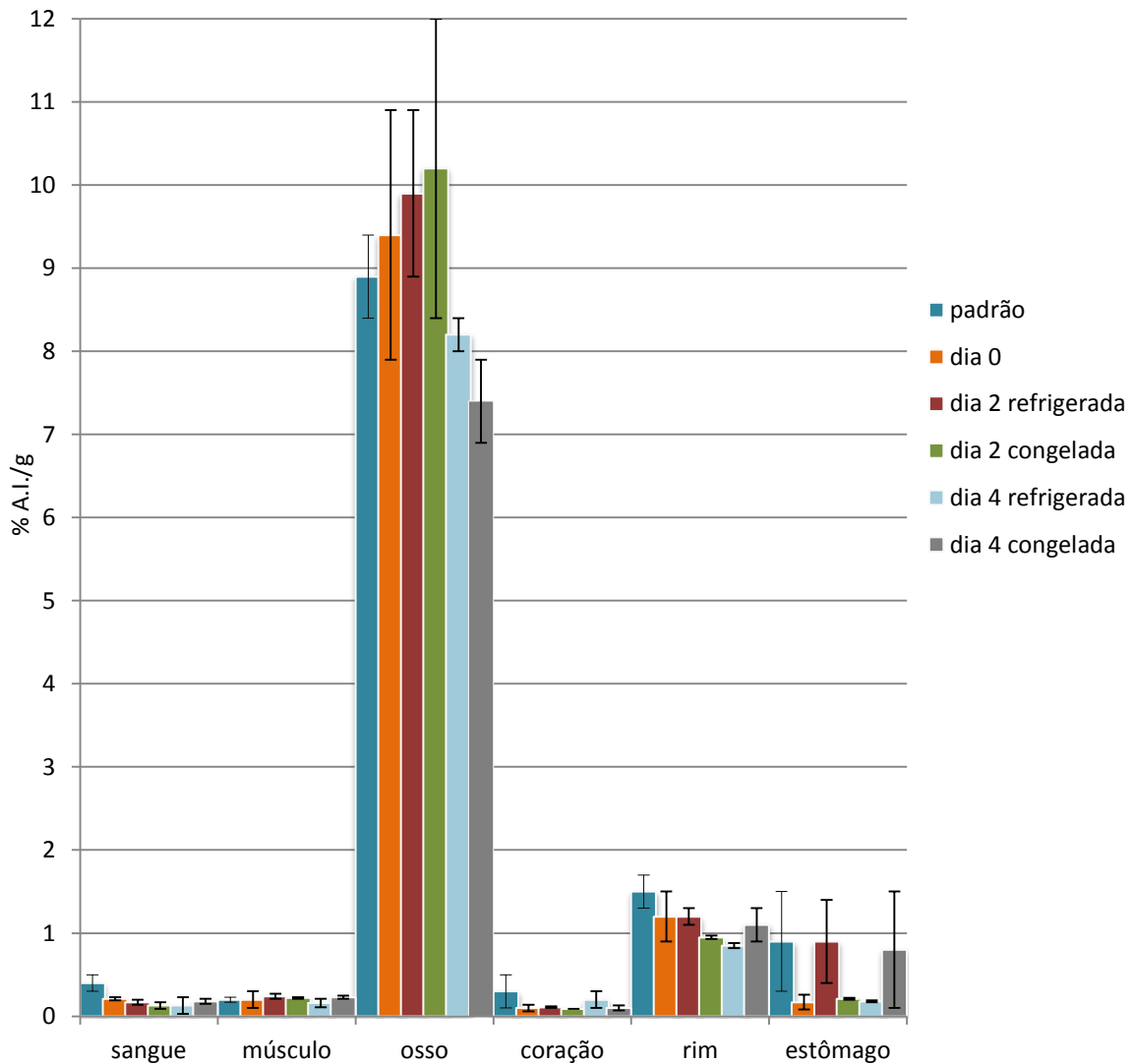
**Figura 4.10** - Valores de % excreção total relativos ao frasco padrão e frações, 2 horas após administração das amostras

Analisando os valores de %A.I./g do frasco padrão e das frações, às 2 horas após a administração das amostras (**Anexo II e Anexo III**) verificou-se que se obtiveram bons resultados de fixação no osso, tendo sido nas frações refrigerada e congelada de dia 2 que os valores foram mais elevados ( $9,9 \pm 1,0$  e  $10,2 \pm 1,8$ ).

As atividades (% A.I./g) nos restantes órgãos foram muito semelhantes entre frações e comparando com o frasco padrão.

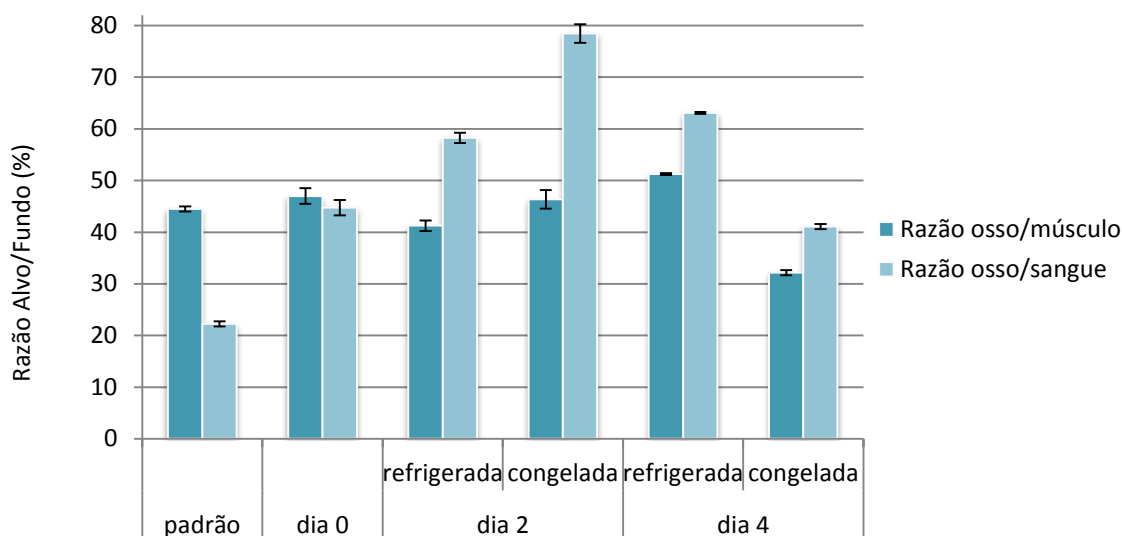
A captação no estômago foi reduzida, o que evidencia que não ocorreu oxidação a  $^{99m}\text{TcO}_4$ .

Tanto nas frações como no frasco padrão, observou-se uma eficiente eliminação do radiofármaco do sangue e tecidos moles, com reduzidos valores de % A.I./g às 2 horas após administração das amostras nos animais (**Figura 4.11**).



**Figura 4.11** - Valores de % A.I./g nos diferentes órgãos relativos ao frasco padrão e às frações, 2 horas após administração das amostras

As razões osso/músculo e osso/sangue foram elevadas tanto no frasco padrão como nas frações, sendo que os maiores valores de razão osso/músculo e osso/sangue se obtiveram nas frações refrigerada de dia 4 e na fração congelada de dia 2, respectivamente (**Figura 4.12**)<sup>[29]</sup>.



**Figura 4.12** - Valores de razão alvo/fundo relativos ao frasco padrão e frações, 2 horas após administração das amostras

## 4.6. Controlo bacteriológico

Através da análise macroscópica das 170 placas de *Petri*, constatou-se que todas apresentaram uma contagem de UFC significativamente inferior aos valores limite ( $500\text{UFC}/\text{m}^3$  e  $5\text{UFC}/\text{cm}^2$ , para placas A e B respetivamente) <sup>[41][43]</sup>, à exceção de uma placa de contacto de superfícies proveniente do refrigerador (**Tabela 4.1**).

**Tabela 4.1** – Resultados dos controlos do ar e superfícies obtidos nas placas A e B referentes à CFL, Refrigerador e Controlos

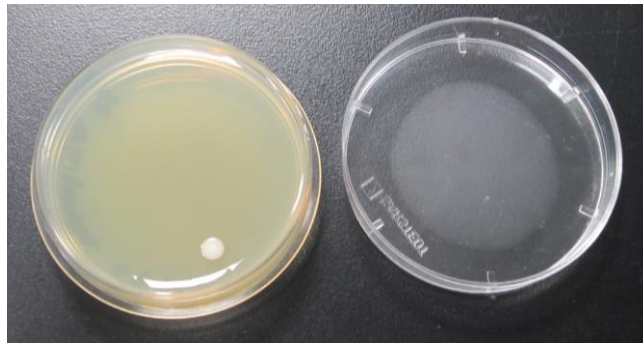
		CFL	Refrigerador	Controlos
ar (placas A)	< $1\text{UFC}/\text{m}^3$	60	19	10
	$\geq 1\text{UFC}/\text{m}^3$	0	1	0
	$\geq 500\text{UFC}/\text{m}^3$	0	0	0
superfícies (placas B)	< $1\text{UFC}/\text{cm}^2$	60	8	10
	$\geq 1\text{UFC}/\text{cm}^2$	0	1	0
	$\geq 5\text{UFC}/\text{cm}^2$	0	1	0

Em relação às placas de controlo, não se observou crescimento de micro-organismos, o que significa que o meio de cultura estava bem preparado e as condições eram adequadas.

Quanto à CFL, não se observou formação de colónias bacterianas nas 120 caixas analisadas, o que indica que esta reunia as condições necessárias para realização dos procedimentos radiofarmacêuticos (**Tabela 4.1**). Tais resultados estão relacionados com a existência de um fluxo vertical de ar laminar em toda a superfície, um sistema

de ventilação e filtros tipo HEPA (do acrónimo inglês *High Efficiency Particulate Air*) H14, que constituem barreiras à entrada de bactérias, assim como de uma lâmpada UV cuja ligação diária promove a esterilização do local.

Quanto ao refrigerador, no primeiro dia de estudo, 24 horas após incubação de uma placa de controlo de ar a 37°C, observou-se formação de uma colónia de bactérias (1UFC/m<sup>3</sup>). A mesma placa permaneceu na estufa a 37°C até às 48 horas, sem ter ocorrido crescimento de novas colónias. É de ressaltar que este valor é muito inferior ao valor limite (500UFC/m<sup>3</sup>) (**Figura 4.14**). Através análise macroscópica da placa verificou-se que se tratava de uma colónia de bactérias, caracterizada por um aspeto viscoso, conformação circular e coloração próxima do branco (**Figura 4.13**)<sup>[42]</sup>.

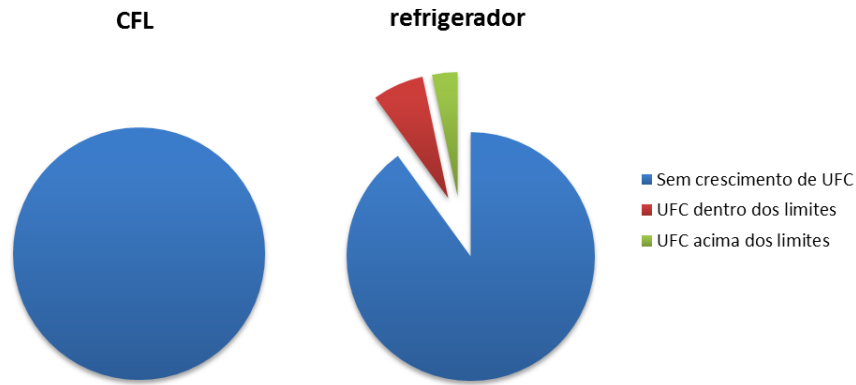


**Figura 4.13** – Placa de *Petri* de controlo de ar do refrigerador com meio TSA apresentado uma colónia de bactérias (coloração branca, aspeto viscoso e formação circular)

Esta contaminação foi um caso isolado, muito provavelmente causada pelo manipulador (respiração, toque, mucosas), uma vez que a colónia se desenvolveu após incubação (37°C), por indução do calor, tratando-se de uma colónia de micro-organismos mesófilos<sup>[45]</sup>.

Com base no sucedido procedeu-se a uma desinfeção e manipulação mais cuidadosas do refrigerador.

Em relação às placas de contacto de superfícies, verificou-se que ocorreu crescimento bacteriano em duas, ambas após 72 horas de incubação a 30°C, o que indica que eram bactérias mesófilas<sup>[45]</sup>. O facto destas UFC se terem desenvolvido exclusivamente após a incubação, reforça a ideia de as contaminações serem de natureza humana, provenientes do manipulador. Numa das placas cresceu 1UFC (inferior ao limite 5UFC/m<sup>3</sup>) e na outra 14UFC (superior ao limite 5UFC/m<sup>3</sup>) (**Figura 4.14**).



**Figura 4.14** – Percentagem de placas (controlo de ar e de superfícies) da CFL e refrigerador com e sem crescimento de UFC

Estes resultados podem estar relacionados com o facto de as placas em questão pertencerem a um grupo que permaneceu no refrigerador durante um período mais longo de tempo ( $\approx 10$  horas), estando por isso sujeitas a uma maior exposição a agentes contaminantes externos e maior interferência do operador.

O facto de se terem avaliado as diversas superfícies do refrigerador, dificultou a identificação da fonte de contaminação.

Verificou-se que após reforço do procedimento de desinfeção e do cuidado na manipulação, não voltou a ocorrer crescimento bacteriano nas placas posteriores, tratando-se de casos isolados.

Não estando num laboratório de microbiologia e tendo por base um histórico de valores aceitáveis decidiu-se não repetir o procedimento. No entanto, se necessário, poder-se-á sempre repetir as placas de forma a dissipar todas as dúvidas.

## Capítulo V

### 5. Discussão de Resultados

A marcação do frasco padrão e das frações foi efetuada com eluido cujo resultado do controlo de qualidade (pH, pureza química, pureza radioquímica e pureza radionuclídica) cumpria as especificações da Farmacopeia portuguesa.

Com base nos radiocromatogramas e nos valores de pureza radioquímica obtidos com ambos os métodos cromatográficos sugeridos pelo fabricante, verificou-se que o mais eficaz foi o método II, com Sistema A composto por fase móvel de NaCl 0,9% e fase estacionária de *Whatman* nº1 (13x2cm), e Sistema B composto por fase móvel de metanol/água (85/15) e fase estacionária de *Whatman* nº1 (13x2cm).

Verificou-se também que existem diferenças nos valores de pureza radioquímica consoante o tipo de recipiente cromatográfico utilizado. Assim, deve-se optar pela utilização de recipientes com uma maior área, como tinhas, ao invés de provetas, uma vez que as últimas podem gerar artefactos, nomeadamente subvalorização dos valores de pureza radioquímica.

Através da análise dos estudos de biodistribuição em murganhos *Balb C* referentes ao  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP marcado de acordo com as recomendações do fabricante (frasco padrão), às 2 e às 3 horas após administração do radiofármaco, constatou-se que logo às 2 horas a fixação óssea era elevada e a taxa de excreção total adequada.

Com base nos radiocromatogramas e nos valores de pureza radioquímica obtidos com ambos os fracionamentos, constatou-se que o fracionamento II, isto é, o fracionamento de frascos de HMDP (Osteocis<sup>®</sup>) em cinco frações de 1ml, é o mais apropriado. Como tal, as frações utilizadas nos estudos de biodistribuição foram obtidas por fracionamento II.

Mediante a análise comparativa dos radiocromatogramas e dos valores de pureza radioquímica das frações, apurou-se que não existem diferenças significativas entre frações refrigeradas e congeladas, e que ao longo do período de estudo (5 dias) não ocorreu diminuição dos valores de pureza radioquímica.

É de destacar que ambas as frações de dia um (terça-feira) e de dia três (quinta-feira) apresentaram valores de pureza radioquímica abaixo dos 95% recomendados pelo fornecedor e pela Farmacopeia portuguesa. Estes valores têm, muito provavelmente a

ver com problemas relacionados com a cromatografia, tendo em conta que nos restantes dias os valores foram superiores, como é o caso da fração congelada de dia quatro (sexta-feira) cujo valor (98%) foi idêntico ao do frasco padrão (98%), o que significa que, à partida, o fracionamento resultou. Contudo, seria importante repetir-se o fracionamento e os respetivos controlos de qualidade, de forma a obter-se maior relevância estatística.

Para os estudos de biodistribuição foram administradas as frações de dia zero (segunda-feira), dia dois (quarta-feira) e dia quatro (sexta-feira), todas com valores de pureza radioquímica acima de 95%, caracterizando-se por elevada fixação no osso e excreção total adequada.

Assim, comparando os resultados do frasco padrão com os das frações, verificou-se que não existiam diferenças significativas a nível das percentagens de atividade injetada por órgão, da excreção total e da qualidade das imagens obtidas.

Relativamente ao pH, verificou-se que, quer para o frasco padrão quer para as frações, o valor se manteve dentro dos limites de tolerância recomendados pelo fornecedor e pela Farmacopeia portuguesa.

Através da análise dos estudos de controlo bacteriológico, de superfícies e da qualidade do ar interno, realizados à CFL e ao refrigerador, verificou-se que não ocorreu formação de UFC na CFL. Já no refrigerador, ocorreu crescimento de três UFC, em duas placas de contato de superfícies e numa placa de controlo da qualidade do ar interno. Contudo, o facto de o crescimento apenas ocorrer após incubação e tendo sido casos isolados, sugere-nos que as contaminações bacteriológicas foram causadas por manipulação humana.

## Capítulo VI

### 6. Considerações Finais

O propósito desta dissertação foi o de estudar a influência das condições de armazenamento de *kits* de HMDP (*Osteocis*<sup>®</sup>), após fracionamento, com base nos valores de pureza radioquímica, nos resultados dos estudos de biodistribuição em modelo animal, após marcação com <sup>99m</sup>Tc, e compará-los com os resultados de um frasco marcado de acordo com as especificações do fabricante (frasco padrão).

Assim, com base nos resultados de pureza radioquímica, nos estudos de biodistribuição em modelo animal, pôde-se concluir que é aceitável utilizar frações de 1ml obtidas através do fracionamento de frascos de HMDP em cinco frações, ao longo de uma semana, quer sejam armazenadas num refrigerador, quer sejam armazenadas num congelador. Contudo, o armazenamento a temperaturas mais baixas (congelador) envolve uma menor probabilidade de ocorrência de contaminações bacteriológicas.

É de salientar que não foram encontradas diferenças significativas entre os estudos de biodistribuição relativos ao frasco referência e às frações estudadas.

No entanto, para aumentar a fiabilidade estatística seria importante estudar um maior número de frascos.

Face aos resultados dos estudos de controlo bacteriológico, pôde-se concluir que a CFL reunia as condições de assepsia necessárias no período de estudo, e que o crescimento de micro-organismos no refrigerador foram, muito provavelmente, de origem humana.

Como perspetivas futuras seria importante analisar a influência da variação de alguns parâmetros relacionados com o fracionamento nos valores de pureza radioquímica e nos estudos de biodistribuição, nomeadamente as dimensões das seringas utilizadas para fracionamento, bem como as atividades e volumes de marcação das frações.

Seria igualmente interessante estudar qual o período máximo de tempo após o fracionamento em que as frações podem ser utilizadas com segurança e sem comprometimento da acuidade diagnóstica.

Por último, a extrapolação deste estudo para humanos seria interessante, de forma a confirmar se os resultados se mantêm.



## Referências Bibliográficas

- [1] The International Pharmacopoeia 4<sup>th</sup> Edition 2011.[Online]. 2011 [cited 2012 Outubro 19]. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>.
- [2] Neves D, Vale F, Pascoal A. The profile and practice of nuclear medicine technologists in Portugal: findings from a nationwide survey. *Nuclear Medicine Communications*. 2012; 33: 1277-1286.
- [3] Bayomy T, Abdulrazzak M, Moustafa H, Khalil W, Pant G. Different Models for Cost-Effective Fractionation of Bone Radiopharmaceuticals; Methylene Diphosphonate (MDP) & Hydroxymethylene Diphosphonate (HDP). *Egyptian J. Nucl. Med.* 2009; Vol 2, N<sup>o</sup> 2: 74-81.
- [4] Osteocis<sup>®</sup> - Summary of Product Characteristics. CIS bio international; 07/2008.
- [5] Osteocis<sup>®</sup> - Summary of Product Characteristics. CIS bio international; 08/2008.
- [6] Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa; 2005.
- [7] British Pharmacopoeia 2009. London; 2009.
- [8] Ballinger J, Ryder H, Decristoforo C, Stopar T, Farstad B, McCoubrey B, et al. *The Radiopharmacy - A Technologist's Guide: European Association of Nuclear Medicine (EANM)*; 2008.
- [9] Perkins A, Frier M. *Nuclear Medicine in Pharmaceutical Research*. London: Taylor & Francis; 2002.
- [10] Sharp P, Gemmell H, Murray A. *Practical Nuclear Medicine*. 3<sup>rd</sup> Edition. London: Springer; 2005.
- [11] Zolle I. *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. Austria: Springer; 2007.
- [12] Saha G. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 5<sup>th</sup> Edition. USA: Springer; 2004.
- [13] Welch M, Redvanly C. *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*. England: Wiley; 2003.
- [14] Marques F, Okamoto M, Buchpiguel C. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol Bras.* 2001; 34(4): 233-239.
- [15] Christian P, Waterstram-Rich K. *Nuclear Medicine and PET/CT – Technology and Techniques*. 7<sup>th</sup> Edition. Missouri: Elsevier Mosby; 2011.
- [16] TechneScan<sup>®</sup> HDP Portugal - Resumo das características do medicamento. Mallinckrodt Medical BV; 2000.
- [17] DRAXIMAGE<sup>®</sup> MDP - Resumo das características do medicamento. Jubilant DraxImage Inc; 2011.

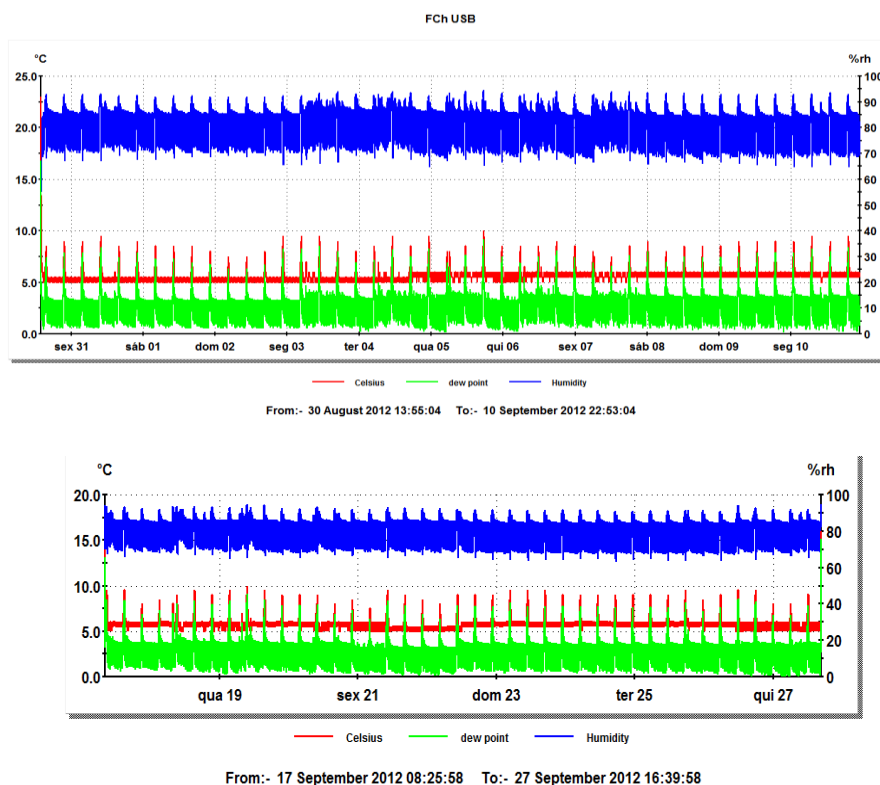
- [18] Yasan B, Günalp B, Bayhan H. Preparation and Evaluation of Bone Seeking Agents With in vitro Quality Control and Biodistribution Studies. TJNM. 1996; 5 (3) 178-185.
- [19] International Atomic Energy Agency (IAEA). Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits, Technical Reports Series nº 466. Austria; 2008.
- [20] Palma E, Oliveira B, Correia J, Gano L, Maria L, Santos IC, Santos I. A new Bisphosphonate-containing  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  tricarbonyl complex potentially useful as bone-seeking agent: synthesis and biological evaluation. J. Biol. Inorg. Chem. 2007; 12: 667-679.
- [21] Castro L, Silva A, Chung M, Ferreira A, Ferreira E. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. Quim. Nova. 2004; Vol. 27, Nº 3: 256-460.
- [22] Bombardieri E, Aktolun C, Baum R, Bishof-Delaloye A, Buscombe J, Chatal J, et al. Bone Scintigraphy: procedures guidelines for tumour imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003; 30(12): 99-106.
- [23] Donohoe K, Brown M, Collier B, Carretta R, Henkin R, O'Mara R, et al. Society of Nuclear Medicine – Procedure Guideline for Bone Scintigraphy.[Online]. 2003 [cited 2012 Novembro 3]. Available from: [http://interactive.snm.org/docs/pg\\_ch34\\_0403.pdf](http://interactive.snm.org/docs/pg_ch34_0403.pdf).
- [24] Loutfi I, Collier B, Mohammed A. Nonosseous Abnormalities on Bone Scans. J Nucl Med Technol. 2003; 31: 149-153.
- [25] Vallabhajosula S, Killeen R, Osborne J. Altered Biodistribution of Radiopharmaceuticals: Role of Radiochemical/Pharmaceutical Purity, Physiological, and Pharmacologic Factors. Semin Nucl Med. 2010; 40:220-241.
- [26] Weiner G, Jenicke L, Müller V, Bohuslavizki K. Artifacts and non-osseous uptake in bone scintigraphy – Imaging reports of 20 cases. Radiol Oncol. 2001; 35(3): 185-91.
- [27] Ponto J. Preparation and Dispensing Problems Associated with Technetium Tc-99m Radiopharmaceuticals. New Mexico; 2004.
- [28] Cheng K, Shaw S, Pinkerton T, Hoch D, Sickie D. A Walker 256 Tumor-Induced Osteogenic Small Animal Model for the Evaluation of [ $^{99m}\text{Tc}$ ] Diphosphonate Radiopharmaceuticals. Int. J. Nucl. Med. Biol. 1985; Vol. 12, Nº 3: 197-208.
- [29] Palma E, Correia J, Oliveira B, Gano L, Santos IC, Santos I.  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  – labeled pamidronate and alendronate for bone imaging. The Royal Society of Chemistry. 2011. Dalton Trans; 40: 2787-2796.
- [30] Ahuja S, Dong M. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Vol. 6. San Diego: Elsevier; 2005.
- [31] International Atomic Energy Agency (IAEA). Nuclear Medicine Resources Manual. Austria; 2006.

- [32] International Atomic Energy Agency (IAEA). Quality Assurance for Radioactivity Measurement in Nuclear Medicine, Technical Reports Series nº 454. Austria; 2006.
- [33] Elsinga P, Todde S, Penuelas I, Meyer G, Farstad B, Faivre-Chauvet A, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; DOI 10.1007/s00259-010-1407-3.
- [34] Biodex – Tec-Control Alumínim Breakthru Kit. [Online]. 2013 [cited 2013 Janeiro 25]. Available from: <http://www.biodex.com/nuclear-medicine/products/radiopharmacy/radiopharmaceutical-qc/tec-control-aluminum-breakthru-kit>.
- [35] Fleming W, Jay M, Ryo U. Reconstitution and Fractionating of Radiopharmaceutical Kits. Kentucky. *J Nuc Med*. 1992; 33: 1915.
- [36] Decristoforo C, Riccabona G. Problems with Fractionated Cold Kits. *The Journal of Nuclear Medicine*. 1996; Vol. 37, Nº 11: 1912-1913.
- [37] Kumar V. Fractionated Cold-Kits: Adress the Critical Issues to Obviate Problems. *The Journal of Nuclear Medicine*. 1997; Vol. 38, Nº 10: 1664.
- [38] Santos L. Estudo das variáveis que influenciam a formação do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrafosmina e otimização do protocolo de preparação do radiofármaco. [Dissertação]. [Porto]: Faculdade de Farmácia; 2011. 152p.
- [39] Faria D, Marques N, Fabio L. Improving labeling efficiency of the myoview fractionated cold kit. [Online]. 2005 [cited 2013 Janeiro 16]. Available from: [http://www2.alasbimnjournal.cl/alasbimn/CDA/sec\\_a/0,1205,SCID%253D12854%2526PRT%253D12853%2526LNID%253D10,00.html](http://www2.alasbimnjournal.cl/alasbimn/CDA/sec_a/0,1205,SCID%253D12854%2526PRT%253D12853%2526LNID%253D10,00.html).
- [40] BD™ Tryptic Soy Agar. BD Diagnostic Systems; 2003.
- [41] Albrecht A, Kiel K, Kolk A. Strategies and Methods for Investigation of Airborne Biological Agents From Work Environments in Germany. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*. 2007; Vol. 13, Nº 2: 201-213.
- [42] Envirocheck® - Contact TVC Total Viable Counts. Merck; 2010.
- [43] Decreto-Lei nº 79/2006 de 4 de Abril. *Diário da República*, 1 Série-A - nº 67.
- [44] Morais G, Silva M, Carvalho M, Santos J, Dolinger E, Brito D. Qualidade do ar interno em uma instituição de ensino superior brasileira. *Biosci. J*. 2010; Vol. 26, Nº 2: 305-310.
- [45] Prokariotae-Tripod. [Online]. [cited 2013 Março 9]. Available from: [http://prokariotae.tripod.com/psicrofilos\\_psicrotroficos\\_mesofilos\\_termofilos.htm](http://prokariotae.tripod.com/psicrofilos_psicrotroficos_mesofilos_termofilos.htm).
- [46] Elumatic III®: Technetium [ $^{99m}\text{Tc}$ ] Generator - Summary of Product Characteristics. CIS bio international; 2010.
- [47] Whatman™ - GE Healthcare. [Online]. 2011 [cited 2012 Novembro 3]. Available from: <http://www.whatman.com/CelluloseChromatographyPapers.aspx>.

- [48] Handeland A, Lindegaard M, Heggli D. Biodistribution of anionic separated MDP complexes from different MDP preparations. *Eur J Nucl Med.* 1989; 15: 609-611.
- [49] Hoch D, Pinkerton T. Reversed-phase HPLC of  $^{99m}\text{Tc}$  Methylene Diphosphonate Bone Imaging Kits with Quantification of Pertechnetate. *Appl. Radiat. Isot.* 1986; Vol. 37, N<sup>o</sup> 7: 593-598.
- [50] Sousa M. Contribuição para a avaliação da integridade de colimadores e confirmação de alguns parâmetros de performance de uma câmara gama BrightView da Philips. [Relatório de Estágio]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências; 2012. 100p.
- [51] Ivanov Z, Baldas, J. Results of the Quality Assurance Testing Program for Radiopharmaceuticals, Technical Report Series n<sup>o</sup> 153. Australia; 2009.
- [52] Moreno-Ortega E, Mena-Bares L, Maza-Muret F, Hidalgo-Ramos F, Vallejo-Casas J. Validation of stationary phases in (111)In-pentetreotide planar chromatography. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2013. DOI: 10.1016/j.remn.2013.01.005.

## Anexos

**Anexo I** - Gráficos de temperatura (°C) e humidade relativa (%rh) referentes ao refrigerador, nos períodos de estudo



**Anexo II** – Valores de % A.I./órgão, % A.I./g e % excreção total referentes ao frasco padrão às 2 e 3 horas após administração

Órgão	2 horas		3 horas	
	% A.I./ órgão ± dp n=3	% A.I./ g ± dp	% A.I./ Órgão ± dp n=3	% A.I./ g ± dp
sangue	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,45 ± 0,06	0,38 ± 0,02
intestino	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,38 ± 0,04
coração	0,05 ± 0,02	0,3 ± 0,2	0,08 ± 0,04	0,6 ± 0,3
rim	0,52 ± 0,08	1,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3
músculo	1,6 ± 0,2	0,20 ± 0,03	1,8 ± 0,2	0,23 ± 0,04
osso	<b>18,5 ± 1,5</b>	<b>8,9 ± 0,5</b>	<b>18,1 ± 0,6</b>	<b>9,3 ± 1,2</b>
estômago	0,4 ± 0,3	0,9 ± 0,6	0,16 ± 0,02	0,34 ± 0,03
<b>% excreção total</b>	<b>36,4 ± 2,6</b>		<b>39,4 ± 4,1</b>	

**Anexo III – Valores de % A.I./g de órgão e % excreção total referentes às frações de dia 0, dia 2 e dia 4, às 2 horas após administração**

Órgão	% A.I./g ± dp				
	Fração dia 0 (segunda-feira)	Frações dia 2 (quarta-feira)		Frações dia 4 (sexta-feira)	
	n=3	refrigerada n=2	congelada n=2	refrigerada n=3	congelada n=3
sangue	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,1	0,18 ± 0,03
intestino	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,16 ± 0,01	0,4 ± 0,1
coração	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,2 ± 0,1	0,10 ± 0,03
rim	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,95 ± 0,02	0,85 ± 0,03	1,1 ± 0,2
músculo	0,2 ± 0,1	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,23 ± 0,02
osso	<b>9,4 ± 1,5</b>	<b>9,9 ± 1,0</b>	<b>10,2 ± 1,8</b>	<b>8,2 ± 0,2</b>	<b>7,4 ± 0,5</b>
estômago	0,17 ± 0,09	0,9 ± 0,5	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,8 ± 0,7
% excreção total	47,4 ± 2,7	51,1 ± 3,3	54,9 ± 2,8	56,5 ± 1,2	51,0 ± 4,4