

Revista da Graduação

Vol. 4

No. 2

2011

16

Seção: FACULDADE DE FARMÁCIA

Título: Controle de Qualidade do Radiofármaco
Fludesoxiglicose (^{18}F): comparação prática
entre os testes requeridos nas Farmacopéias
Britânica, Européia e Americana

Autor: Paula Kopschina Feltes, Denise Milão

Este trabalho está publicado na Revista da Graduação.

ISSN 1983-1374

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/10079/7112>

Controle de Qualidade do Radiofármaco Fludesoxiglicose (^{18}F): comparação prática entre os testes requeridos nas Farmacopéias Britânica, Européia e Americana

Paula Kopschina Feltes¹
Denise Milão¹

¹Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

paula.feltes@gmail.com
dmilao@puers.br

RESUMO

O FDG- ^{18}F é um radiofármaco análogo da glicose, utilizado como indicador de viabilidade celular e captação de glicose em exames para o diagnóstico de câncer, doenças neurológicas e miocárdicas. A produção do ^{18}F é realizada no ciclotron Cyclone 18/9, através da reação $^{18}\text{O} (p, n)^{18}\text{F}$. Após, é efetuada a marcação do precursor triflato de manose com o ^{18}F , resultando no FDG- ^{18}F . Para a dispensação do radiofármaco para os pacientes, são necessários testes de controle de qualidade para assegurar a identidade, pureza e esterilidade do fármaco. A Farmacopéia Brasileira é o código oficial farmacêutico do país, onde se estabelecem os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Até o presente momento, não há monografia específica para este radiofármaco, sendo necessário adotar outros compêndios internacionais como referência, tais como United States Pharmacopeia (USP), European Pharmacopoeia (EP) e British Pharmacopoeia (BP). O objetivo deste trabalho foi comparar na prática qual farmacopéia é a mais adequada para a rotina de produção de FDG- ^{18}F . Após a análise de quatro lotes de radiofármaco, a USP mostrou-se a referência mais adequada por ser mais simplificada, de fácil entendimento e de fácil execução.

Palavras – Chave: FDG- ^{18}F ; Controle de Qualidade; radiofármacos; USP; European Pharmacopoeia; British Pharmacopoeia..

ABSTRACT

FDG- ^{18}F is a glucose analogue, used mainly as a cell viability indicator and glucose captation marker in exams for the diagnosis of cancer, neurological and myocardial diseases. Fluorine- ^{18}F is produced by a $^{18}\text{O} (p,n)^{18}\text{F}$ reaction, through a cyclotron Cyclone 18/9. The next step is adding the precursor mannose triflate to the fluorine- ^{18}F , resulting in the final product FDG- ^{18}F . Before releasing the drug to the patient, quality control tests must be done to ensure the identity, purity and sterility of the product. The Farmacopéia Brasileira is the official pharmaceutical compendium, in which are established the minimum requirements of quality for drugs, raw materials, herbal drugs, medications and health products. Until the present moment, there is no specific monograph for this radiopharmaceutical, being necessary to adopt other international compendiums, such as USP, European Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia. The aim of this study was to do a practical comparison between these three pharmacopoeias, to evaluate which one is the most appropriate for the routine production of FDG- ^{18}F . After analyzing four lots of the radiopharmaceutical, USP was the most suitable reference, being simpler, easier to understand and easier to execute.

Keywords: FDG- ^{18}F ; Quality Control ; radiopharmaceuticals ; USP; European Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia.

INTRODUÇÃO

FDG-¹⁸F, é um radiofármaco de meia vida curta, análogo de glicose no qual o grupo hidroxila do carbono 2 da molécula é substituído por um átomo de flúor radioativo. Como a glicose, o FDG-¹⁸F é absorvido pelas células por transporte facilitado e então é fosforilado pela hexoquinase. Porém, o FDG-¹⁸F não pode ser metabolizado porque o grupo hidroxila no carbono 2 é essencial para o processo. Portanto, FDG-¹⁸F é um bom indicador de viabilidade celular e de captação de glicose, sendo utilizado principalmente no diagnóstico de câncer, doenças neurológicas e cardíacas [Yu et al, 2006].

A primeira síntese de FDG-¹⁸F foi realizada nos EUA pelo Brookhaven National Laboratory, NY, por Wolf e colaboradores em 1976 por fluoração eletroquímica. Porém, o rendimento da síntese era muito pequeno, em torno de 8% [Fowler et al, 2002]. Então, em 1986, Hamacher e colaboradores desenvolveu uma técnica de substituição nucleofílica, utilizando Kryptofix 222 (aminopoliéter) como catalizador. O rendimento da síntese foi superior a 50%. [Hamacher et al, 1986]

Na síntese de FDG-¹⁸F utilizando a substituição nucleofílica, o íon ¹⁸F é o nucleófilo. O precursor é o triflato de manose no qual as posições dos carbonos 1,3,4,6 estão protegidas por grupamentos acetila e o triflato é o grupo de saída no carbono 2. Na presença de Kryptofix 222 como catalizador e acetonitrila como solvente, o íon ¹⁸F se aproxima do triflato de manose na posição do carbono 2, enquanto o grupamento triflato deixa a manose para formar o FDG¹⁸F (Figura 1) [Yu et al, 2006]. O passo final da síntese é remover os grupos protetores de acetila nos carbonos 1,3,4,6. Isto pode ser realizado utilizando ácido clorídrico (hidrólise ácida) ou hidróxido de sódio (hidrólise básica), utilizado neste trabalho. A purificação pode ser efetuada com uma série de colunas de troca iônica, fase reversa C-18 e coluna de alumina [Yu et al, 2006].

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Farmacopéia Brasileira é o Código Oficial Farmacêutico do País, onde se estabelecem, dentre outras coisas, os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Porém, não possui monografia específica do FDG-¹⁸F. Farmacopéias internacionais como USP, Farmacopéia Européia (EP) e Farmacopéia Britânica (BP) são adotadas como referência neste caso. Porém, as monografias destas Farmacopéias diferem entre si em diversos pontos, sendo o objetivo do presente estudo comparar na prática qual a Farmacopéia é a referência mais adequada para o controle de qualidade na rotina de produção do FDG¹⁸F em uma indústria de radiofármacos.

Controle de Qualidade do FDG-¹⁸F

Os testes requeridos para o controle de qualidade do FDG-¹⁸F estão descritos na Tabela I.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Foram analisados quatro lotes de FDG-¹⁸F, FDG001726, FDG001727, FDG001731 e FDG001732, sendo que cada lote foi submetido aos testes das farmacopéias USP, BP e EP.

Produção de Fluoreto-¹⁸F

Fluoreto-¹⁸F foi produzido através da reação ¹⁸O(p, n)¹⁸F com água enriquecida (REM) no ciclotron Cyclone 18/9 IBA.

Síntese de FDG-¹⁸F

Para sintetizar o radiofármaco, o primeiro passo foi extrair o íon fluoreto-¹⁸F da mistura aquosa proveniente do ciclotron. Para remover impurezas, a mistura passou em um cartucho com 30mg de resina aniônica QMA Sep-Pak (Waters Corp.). O íon fluoreto-¹⁸F fica retido no cartucho enquanto todas as impurezas catiônicas e solúveis em água vão para o descarte. O íon então foi eluído com uma solução aquosa de acetonitrila contendo carbonato de potássio e Kryptofix 222 (aminopoliéter). Sob fluxo de nitrogênio, a mistura de água/acetonitrila foi evaporada, deixando como resíduo o complexo de fluoreto-¹⁸F com Kryptofix 222. O próximo passo foi a reação do complexo com o triflato de manose, através da saída do grupo trifluorometanosulfonil do carbono 2 do triflato de manose e a substituição do mesmo pelo íon, gerando o produto intermediário. Esta substituição ocorre via mecanismo SN2. Após, ocorreu a hidrólise básica com solução de hidróxido de sódio e etanol (estabilizante) e aquecimento a 50°C. Este passo remove todos os grupos protetores acetil do produto intermediário, produzindo o FDG-¹⁸F. Para purificação, o produto final foi passado por várias colunas de purificação. A primeira continha uma resina de troca catiônica (para remover Kryptofix 222 e neutralizar o hidróxido de sódio). Ligada a esta coluna, havia um cartucho de óxido de alumínio Sep-Pak Plus B para absorver fluoreto-¹⁸F que não reagiu e por fim, uma coluna C18 Sep-Pak C18 para reter espécies não polares como traços do produto intermediário não hidrolizado. O produto final foi esterilizado através de um filtro de 0,22 µ.

Identidade Radionuclídica

Um radionuclídeo é identificado pelo tempo de meia-vida, pela natureza e energia da sua radiação [F. Bras, IV edição]. O tempo de meia vida (t_{1/2}) é definido como o intervalo de tempo necessário para uma determinada atividade do radionuclídeo decair a metade do seu valor inicial [USP <821>]. O ¹⁸F possui uma meia-vida de 110 minutos. Para determinar a atividade da amostra foi utilizado um Curiômetro e sua atividade foi medida a cada 10 minutos até 30 minutos. O t_{1/2} foi determinado a partir da fórmula abaixo:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2 \times t}{\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)}$$

Onde A_0 é atividade inicial medida em cps, mCi ou μ Ci no tempo zero;

A é a atividade medida em cps, mCi ou μ Ci no tempo t ;

t é o tempo em minutos decorrido desde a obtenção de A_0 .

Pureza Radionuclídica

A pureza radionuclídica do FDG- ^{18}F foi determinada através de um espectrômetro de raios gama, no equipamento Analisador Multicanal (MCA), com detector de cintilação de iodeto de sódio ativado com tálio (NaI[Tl]), eficiente para detecção de fótons únicos. Sistemas de detectores de cintilação têm um processo interessante de conversão. As radiações gama incidem no cristal de iodeto de sódio e cedem energia aos elétrons de valência, durante a interação fotoelétrica e Compton. A energia cedida eleva os elétrons para a banda de condução da rede cristalina. A diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução é da ordem de alguns elétron-volt. O elétron libera energia ao retornar ao estado de origem, isto é, ao retornar da banda de condução para a banda de valência, e são liberados fótons de luz. O próximo passo no processo é a interação dos fótons luminosos que chegam ao cristal com o fotocátodo da válvula fotomultiplicadora. O pulso resultante da válvula fotomultiplicadora é processado posteriormente, podendo tomar a forma de amplificação seguida de uma análise de pulso para determinar a energia incidente no cristal [Thrall, et al, 2003].

A espectrometria gama é baseada na propriedade que certas substâncias têm de emitirem luz quando bombardeadas por raios gama. O espectro de raios gama do radionuclídeo é próprio do mesmo [F. Bras., IV edição]. A energia foi medida através do posicionamento da amostra contida em um tubo criogênico no MCA.

BP e EP: Primeiramente, foi realizado o espectro de energia da amostra posicionando o tubo criogênico em um suporte no MCA, de forma que os fótons da amostra incidam no cristal de forma planar, para a determinação do pico em 511 keV ou 0,511 MeV. Para a identificação de impurezas com $t_{1/2}$ maior que a do ^{18}F , a amostra foi retida por 24 horas para permitir o decaimento do ^{18}F a níveis que permitam a detecção das mesmas. Além disso, a amostra foi diluída com volume suficiente de solução salina para que tivesse no máximo 50.000 contagens por segundo (cps).

USP: a amostra foi diluída com volume suficiente para ter no máximo 20.000 cps e não exceder a capacidade do detector, e foi posicionada no poço do MCA de forma que o detector fique posicionado de forma circular ao redor da amostra para determinação de picos de 511 keV ou 1022 keV.

Identidade Radioquímica

USP: O valor de R_f do FDG- ^{18}F obtido no teste de pureza radioquímica da solução teste corresponde ao da solução padrão.

BP e EP: obtido através da comparação do tempo de retenção da solução teste e padrão por CLAE.

Pureza Radioquímica

Razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo em questão presente na fonte na forma química declarada, relacionada ao total da radioatividade do radionuclídeo presente na fonte [F. Bras, IV edição].

USP: Utiliza a metodologia de cromatografia em camada delgada (CCD). Para proceder ao teste, foi utilizado 1 mg de padrão de Fluordesoxiglicose RS, dissolvido em 10 mL de acetonitrila e água (95:5). Foi aplicado 10 μ L de solução padrão e 2 μ L solução teste na placa de CCD e a placa foi posicionada em uma cuba contendo a fase móvel acetonitrila e água (95:5). Após a eluição e completa secagem da placa, a distribuição da radioatividade foi determinada escaneando o cromatograma com um detector de radiação colimado, o TLC scanner. A localização de FDG- ^{18}F foi determinada borrifando a placa com ácido sulfúrico 2N e aquecendo a placa a 110°C por 10 minutos.

EP e BP: utiliza duas metodologias para determinar a pureza radioquímica, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e CCD.

Para o CLAE, foi utilizada uma coluna de troca aniônica básica de 10 μ m, l=0,25m e O=4 mm. A fase móvel era constituída de uma solução de hidróxido de sódio 4g/L, com fluxo de 1 mL/min, um detector de índice refrativo e outro de iodeto de sódio para detecção de substâncias radioativas. A solução padrão de FDG utilizada possuía concentração 0,045mg/mL, enquanto a solução padrão de 2-fluor-2-deoxi-D-manose (FDM) possuía concentração 0,025mg/mL. O volume de injeção das soluções padrão e teste foram de 20 μ L.

Para o teste de CCD, foi dissolvido 30 mg de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-B-D-glicopiranosose R em 1 mL de água. A fase móvel era constituída de acetonitrila e água (95:5). O volume de aplicação da solução padrão e teste foi de 2 μ L. A distribuição da radioatividade foi determinada pelo TLC scanner e após, a placa foi colocada em uma solução de 75g/L de ácido sulfúrico em metanol e secada com um secador portátil a 150°C até o aparecimento de pontos escuros no cromatograma.

pH

O pH das amostras foi determinado utilizando fitas indicadoras, com faixa de intervalo 1-14 e 4-7.

Endotoxinas

USP, BP e EP: a determinação de endotoxinas bacterianas é realizada através do teste de formação de gel do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Para execução do teste, foram identificados dois tubos para controle positivo com 0,25 UE/mL de padrão de endotoxinas, 2 tubos para controle negativo com água de injeção apirogênica, uma amostra de FDG contaminada com 0,50 UE/mL e a solução teste. Após, os tubos foram transferidos para banho maria a 37°C por 60 minutos. Após este período, os tubos foram invertidos para verificar a formação ou não de gel integro.

Esterilidade

USP, BP e EP: para este teste, foram utilizados dois tipos de meio de cultura, o meio de tioglicolato fluído, utilizado para cultura de bactérias anaeróbicas e aeróbicas, e meio de caseína soja (TSB), adequado para cultura de fungos e bactérias aeróbicas. 200µL de solução teste foi inoculada em ambos os meios de cultura em tubos e incubadas em estufa a 20-25°C para o meio caseína soja e 30-35°C para o meio tioglicolato fluído, por 14 dias.

Pureza Química

Razão, em porcentagem, da massa da substância presente na forma química declarada e o total da massa contida na fonte, desprezados excipientes ou solventes [F. Bras., IV edição]

USP: dois testes para pureza química são descritos. Para o teste de aminopoliéter em CCD com sílica gel, 1 mg de padrão (USP related compound A) foram dissolvidos em 1 mL de solução salina. Após, 100µL foram pipetados e diluídos até 2 mL em solução salina para obter uma concentração final de 50µg/mL e a fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol e hidróxido de amônio 30% (9:1). 1 µL de solução padrão e solução teste foram aplicados na placa e após, a placa foi posicionada em uma cuba contendo a fase móvel. Após a eluição, a placa foi colocada em outra cuba contendo cristais de iodo com a finalidade de exposição aos vapores de iodo.

Para a determinação de 2-cloro-2-deoxi-D-glicose (CIDG) utilizou-se a metodologia de CLAE. A coluna utilizada foi a de troca iônica, composta de 10 µm poliestireno/divinilbenzeno com amina quaternária, com as dimensões de 4mm x 25 cm. O fase móvel era composta de 16g de NaOH 50% em 1000 mL de água grau HPLC e fluxo de 0,5 mL/min, detector de índice refrativo e iodeto de sódio. A solução padrão de CIDG foi preparada dissolvendo-se 1 mg de padrão em 10 mL de água grau HPLC, de forma a obter uma solução 0,1mg/mL. O volume de injeção da amostra e da solução padrão foi de 20 µL.

BP e EP: para determinação de aminopoliéter, foi utilizado a metodologia de Spot Test em uma placa de sílica gel 20 x 50 mm (Merck). A solução padrão de aminopoliéter foi preparada com concentração final de 0,20 mg/mL. O volume de aplicação da solução teste e padrão foram de 2,5 µL, um ao lado do outro. A placa foi posicionada em uma cuba contendo iodo ressublimado para ser exposta aos vapores de iodo.

Para determinação de CIDG por CLAE, procedeu-se a mesma metodologia aplicada para o teste de Pureza Radioquímica. A solução padrão de CIDG foi preparada na concentração de 0,045 mg/mL e o volume de injeção foi de 20 µL.

Solventes Residuais

Solventes residuais são definidos como solventes orgânicos que são utilizados ou produzidos na fabricação de drogas ou excipientes [ICH, 2009]. A determinação de solventes residuais envolve a avaliação do risco baseado não somente em sua toxicidade aos humanos, mas também

aos possíveis efeitos deletérios ao meio ambiente [Hung et al]. De acordo com ICH, os solventes residuais são classificados em 3 categorias (classe 1, classe 2 e classe 3) onde a classe 1 são os solventes altamente tóxicos que devem ser evitados a menos que o risco-benefício seja demonstrado; os de classe 2 devem ser limitados para proteger pacientes de possíveis efeitos adversos; e os de classe 3 são menos tóxicos ao homem, podendo ser utilizados quando necessário.

USP: primeiramente, foram preparados soluções de éter, acetonitrila e etanol nas concentrações de 0,1%, 0,01% e 0,1%, respectivamente. A metodologia utiliza cromatografia gasosa (CG) para determinação dos solventes residuais e o sistema cromatográfico utilizado foi composto de um detector de ionização de chama (FID), sistema de injeção *splitless*, coluna cromatográfica de 0,32mm x 30m de sílica fundida recoberta com 0,25µm de fase estacionária C16 *cross linked*. Gás carreador hélio, com fluxo de 10 mL por minuto. A temperatura inicial foi mantida 40°C por 2 minutos, então elevada a uma taxa de 20°C por minuto até atingir 130°C. Esta temperatura foi mantida por 130°C por 5,5 minutos. A porta de injeção e o detector foram mantidos a uma temperatura de 250°C e 300°C, respectivamente. 1µL de injeção da solução padrão e após, de solução teste foram injetados.

BP e EP: os testes foram conduzidos de acordo com o capítulo geral 5.4. Neste sistema utilizou-se uma coluna de 0,53mm x 30m de sílica fundida, recoberta com 1µm de fase estacionária contendo 6% de policianopropilfenilsiloxano e 94% de polimetilsiloxano *cross linked* e detector FID. O gás carreador é o hélio com fluxo de 35 cm/s. A temperatura inicial foram de 40°C e a final, 50°C, com tempo de corrida de 5 minutos. Volume de injeção de 1µL. As concentrações das soluções de referência foram de 4,545µg/mL para etanol e 363µg/mL de acetonitrila.

Ensaio para radioatividade

USP, BP e EP: utilizando um curiômetro, foi determinada a atividade da injeção em mCi.

Análise estatística

A estatística aplicada a este trabalho foi a de obtenção da média dos resultados ± desvio padrão.

RESULTADOS

Neste presente estudo realizamos uma comparação prática entre as monografias do radiofármaco FDG-¹⁸F das farmacopéias USP, BP e EP, executando todos os testes descritos. Os resultados dos testes segundo a USP encontram-se na Tabela 2, enquanto os resultados da EP e BP encontram-se na Tabela 3.

Todas as farmacopéias analisadas apresentam muitas similaridades, porém algumas metodologias diferem entre si.

No teste de Identidade Radionuclídica, por exemplo, não encontramos diferença na metodologia entre as farmacopéias, portanto, o resultado obtido foi igual para

as três. A média do $t_{1/2} \pm$ desvio padrão (D.P) foi de $109,01 \pm 1,91$ minutos.

Para pureza radionuclídica, a USP e a BP e EP diferem entre si. Enquanto a USP exige apenas que 99,5% das emissões gama correspondam a 511 keV, 1022 keV e espalhamento Compton (Figura 2), a BP e EP exigem, além disso, a quantificação de impurezas com tempo de meia vida maior a 2 horas presente. Para determinação de impurezas, é importante deixar a amostra decair 24 horas para que picos de impurezas possivelmente sobrepostos pelos picos de energia maior possam ser analisados. Para determinação de impurezas é importante ter uma concentração maior de amostra para que o detector possa identificá-las. Esta concentração maior de amostra somente é possível utilizando o suporte no MCA, de forma que o detector seja paralelo e detecte somente o pico de 511 keV. Na USP, a média \pm D.P das energias encontradas no pico de 511 keV e 1022 keV, e do percentual de emissões gama foram, respectivamente, de $529,5 \pm 7,72$ keV e $1036 \pm 16,33$ keV, e $99,87 \pm 0,06\%$. Na BP e EP a média das energias e impurezas foram, respectivamente de $519,5 \pm 2,51$ keV e $0,1 \pm 0,0\%$ (Figura 3). Num sistema de detecção perfeito e contando com a absorção completa da radiação gama de 511 keV ou 1022 keV no detector, teríamos uma linha única que seria gravada exatamente nestes valores. A distribuição gaussiana dos eventos gravados é devida à natureza estatística do processo de detecção da radiação. Cada um dos passos no processo de transformação da radiação ionizante em corrente elétrica é sujeito a flutuação estatística. Fótons luminosos são liberados no cristal com a mesma probabilidade, porém a direção é randômica. Entre a absorção de dois eventos distintos, um pequeno número diferente de fótons luminosos incide nos fotocatodos. O número de elétrons deslocados também é sujeito a flutuações estatísticas, e o mesmo ocorre na amplificação em cada dinodo da válvula fotomultiplicadora [Thrall et al, 2003].

Para o teste de identidade radioquímica, tanto a USP quanto a BP e EP utilizam os resultados de R_f e R_t , respectivamente, obtidos no teste de pureza radioquímica. Na pureza radioquímica, tanto a USP e a BP e EP utilizam a mesma metodologia de CCD. A diferença é que a USP determina somente o R_f do FDG- ^{18}F , enquanto a BP e EP além do R_f do FDG- ^{18}F , determina impurezas de derivados acetilados e o R_f do FDM- ^{18}F . O uso do TLC Scanner na determinação da distribuição da radioatividade da amostra auxilia ainda na determinação exata do R_f , levando em conta que as vezes a mancha após a revelação da placa cromatográfica não é muito visível. A BP e EP ainda exigem o teste por CLAE para determinação do R_t do FDG- ^{18}F e FDM- ^{18}F e a radioatividade relativa a estes compostos. O R_f do FDG- ^{18}F obtido pelo teste da USP foi de $0,484 \pm 0,08$, ficando dentro dos critérios de aceitação de cerca de 0,4. A radioatividade do FDG- ^{18}F correspondeu a $94,44 \pm 3,4\%$, ficando também dentro dos critérios de aceitação. Para a BP e EP, os limites estabelecidos no teste por CCD são aplicados a distribuição da radioatividade dos compostos. O FDG- ^{18}F correspondeu a $99,17 \pm 0,35\%$, estando dentro dos critérios de aceitação que exigem mínimo de 95% da radioatividade total para o FDG- ^{18}F e no máximo 5% da

radioatividade total para derivados acetilados. No teste por CLAE, a distribuição da radioatividade foi similar, $98,48 \pm 1,012$ para o FDG- ^{18}F e $0,33 \pm 0,13\%$ para FDM- ^{18}F . Os critérios de aceitação para este teste são de no mínimo 95% da radioatividade para o FDG- ^{18}F e no máximo 10% da radioatividade para FDM- ^{18}F .

Na determinação do pH, não há diferença na metodologia entre as farmacopéias e em todos os lotes o pH ficou em $5,57 \pm 0,15$, dentro dos limites preconizados.

As endotoxinas são determinadas da mesma forma através do teste do LAL previamente validado na indústria, para garantir que a amostra radioativa não interfira no resultado final. Em nenhum lote houve a detecção de endotoxinas, indicando que a amostra está livre de pirogênicos.

No caso do ensaio de esterilidade, a metodologia é igual também entre as farmacopéias. Conforme esperado, não houve crescimento microbiológico em nenhum dos meios nos 14 dias de incubação.

A pureza química é efetuada para determinar os resíduos de impurezas provenientes da síntese. Para USP, são exigidos os testes para aminopoliéter e CIDG. Para a BP e EP, os testes de aminopoliéter, FDM e CIDG. É importante citar que a formação de CIDG ocorre principalmente quando hidrólise ácida com ácido clorídrico é utilizada, porém, pode estar presente também quando se utiliza uma coluna com resina de troca aniônica durante a síntese do produto. Como utilizamos a coluna QMA com resina aniônica, realizamos a análise desta impureza. Outro dado importante é que o aminopoliéter é um composto altamente tóxico, com um $L_D=35\text{mg/kg}$ [Hung et al, 2002]. Talvez fosse interessante incluir uma metodologia mais sensível que CCD para determinação deste composto. Quanto aos testes, para USP, a descrição do teste de aminopoliéter é um pouco confusa, deixando dúvidas de como proceder. A eluição da placa com a fase móvel de hidróxido de amônio e metanol (1:9) não é necessária, tendo em vista que apenas a exposição do produto aos vapores de iodo é suficiente para corar a mancha de padrão e amostra e assim, comparar a intensidade da mancha entre ambos. Neste quesito, a BP e EP são mais claras e propõe o teste somente com a exposição aos vapores de iodo. De qualquer forma, tanto com a USP quanto BP e EP a intensidade da mancha da amostra foi sempre menor que a intensidade da mancha do padrão. No teste de CIDG da USP utilizando CLAE, o R_t do padrão de CIDG foi de $11,33 \pm 0,07$ minutos (figura 4) e na amostra não foi detectado nenhum pico referente a esta impureza (figura 5). Para o teste da BP e EP, o R_t do padrão de CIDG foi de 9,10 minutos e também o pico referente a esta impureza não foi detectado (figura 6).

Para o teste de solventes residuais, a USP mostra-se mais exigente ao requerer o controle de éter, etanol e acetonitrila. A média \pm D.P da acetonitrila foi de $0,002 \pm 0,001\%$; para o etanol, a média \pm D.P foi de $0,096 \pm 0,031\%$. Para o éter, não foi detectado a presença deste solvente no cromatograma (figura 8). Os resultados encontrados estão dentro dos critérios de aceitação da USP de 0,04% para acetonitrila e 0,5% para éter e etanol. A BP e EP não especificam quais os solventes a serem testados, portanto, foram testados somente a acetonitrila e etanol, solventes utilizados na síntese do produto. A

média e desvio padrão de acetonitrila e etanol, foi de $0,008 \pm 0,005$ mg/mL e $0,301 \pm 0,042$ mg/mL (figura 9). Estes resultados ficam abaixo dos limites preconizados pelo ICH, que são 4,1 mg/dia para acetonitrila e 50 mg/dia para o etanol.

O ensaio para radioatividade consiste em determinar a atividade da amostra após a produção. A metodologia não difere entre as farmacopéias e a quantidade de radioatividade requerida numa produção dependerá do número e do tipo de exames solicitados pelo médico, além do intervalo de tempo que decorrerá entre a produção do radiofármaco e a sua administração no paciente, devendo ser considerado o tempo de meia-vida do radioisótopo utilizado.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, podemos observar que todas as farmacopéias são bastante similares. Os testes apresentados na USP são mais simples, utilizando técnicas como CCD na maioria de seus ensaios. A BP e EP mostram-se mais exigentes, requerendo a determinação de impurezas tais como derivados acetilados, FDM-¹⁸F, que a USP não exige. Porém, na BP e EP não há teste específico para solventes residuais na monografia do FDG-¹⁸F, remetendo ao capítulo geral de solventes residuais. Na USP, além de haver a descrição do teste, há a exigência da determinação de acetonitrila, etanol e éter. Nas BP e EP, a forma como os testes foram descritos pode levar ao surgimento de dúvidas. Porém, estes dois compêndios fazem uma observação importante para a prática, que é a descrição de quais testes podem ser executados após a dispensação do radiofármaco, tais como esterilidade, pureza radionuclídica e endotoxinas. Como a Farmacopéia de escolha para a rotina de controle de qualidade do radiofármaco FDG-¹⁸F, com base na análise de descrição das metodologias e resultados obtidos, a USP mostra-se mais adequada, possuindo uma descrição dos testes de fácil entendimento e fácil execução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos da R2 Soluções em Radiofarmácia que proporcionaram a oportunidade de executar este trabalho, principalmente a Fernanda Plentz de Jesus, Lara Pias, Simone Staniecki e Cristiano Duarte. Muito obrigado!

REFERÊNCIAS

- [1] ANVISA. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 3 de maio de 2011.
- [2] Farmacopéia Brasileira, IV ed., parte I. Editora Atheneu, São Paulo, 1988.
- [3] Fludeoxyglucose F18 Injection. British Pharmacopoeia 2009. London: British Pharmacopoeia Commission, 2009.
- [4] Fludeoxyglucose F18 Injection. The European Pharmacopoeia, 7° ed. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. Council of Europe, Strasbourg, 2010.
- [5] Fludeoxyglucose F18 Injection. United States Pharmacopoeia – USP ed. 34, The National Formulary,

ed. 29. The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2011.

[6] FOWLER J.S. Initial and subsequent approach for synthesis of 18FDG. **Semin Nucl Med**, v. 1, n. 32, p. 6-12, 2002.

[7]HAMACHER, K., COENEN H., Efficient stereospecific synthesis of no-carrier added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. **J Nucl Med**, v.7, n. 2, p. 235-238, fev 1986.

[8] HUNG, Joseph. Comparison of various requirements of the quality assurance procedures for ¹⁸F-FDG injection. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.43, n. 11, p. 1495 – 1506, nov. 2002.

[9] European Medicines Agency. ICH Topic Q3C Impurities: Guideline for Residual Solvents. London, 2009.

[10] **THRALL, James H., ZIESSMAN, Harvey A.** Medicina Nuclear. 2° edição, editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

[11] YU, S. Review of ¹⁸F-FDG synthesis and quality control. **Biomed Imaging Interv**, v.2, n. 57, p. 1-11, dez. 2006.

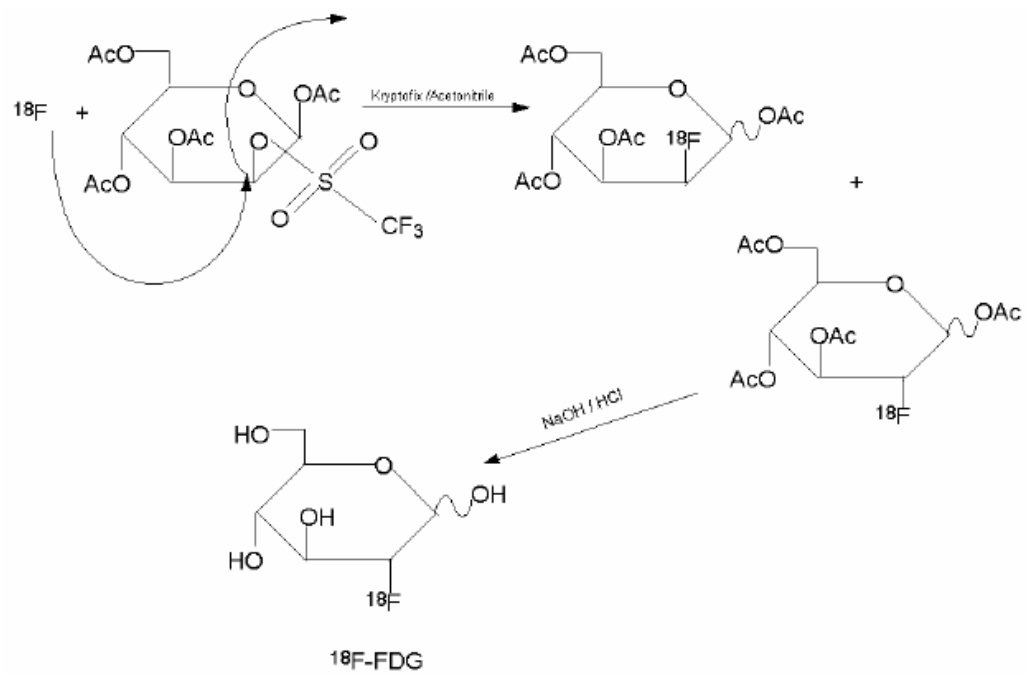


Figura 1.: Síntese de FDG - ^{18}F por substituição nucleofílica.

Tabela 1: Descrição dos testes de controle de qualidade do radiofármaco fludeoxiglicose (^{18}F) da USP, Farmacopéia Européia e Farmacopéia Britânica.

Testes	USP	BP	EP
Aparência	Não consta	Solução límpida, incolor ou levemente amarelada	Solução límpida, incolor ou levemente amarelada
Identidade Radionuclídica	Determinação de sua meia-vida. Entre 105 e 115 minutos.	Determinação de sua meia-vida. Entre 105 e 115 minutos.	Determinação de sua meia-vida. Entre 105 e 115 minutos.
Pureza Radionuclídica	Espectrômetro de raios gama. Não menos que 99,5% das emissões gama devem corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV.	A: Espectrômetro de raios gama. Não menos que 99,5% das emissões gama devem corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV. B: Espectrômetro de raios gama. Determinar a quantidade de ^{18}F e impurezas radionuclídicas com meia vida maior que 2 horas. A radioatividade total devido as impurezas não é maior que 0,1%	A: Espectrômetro de raios gama. Não menos que 99,5% das emissões gama devem corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV. B: Espectrômetro de raios gama. Determinar a quantidade de ^{18}F e impurezas radionuclídicas com meia vida maior que 2 horas. A radioatividade total devido as impurezas não é maior que 0,1%
Identidade Radioquímica	CCD. O valor de Rf de fludeoxiglicose (^{18}F) corresponde ao obtido com a solução padrão de fludeoxiglicose (^{18}F) obtido no teste de pureza radioquímica.	CLAE. Examinar o cromatograma obtido no teste A para pureza radioquímica. O pico principal no radiocromatograma obtido com a solução teste de fludeoxiglicose (^{18}F) é similar ao Rf do pico obtido com a solução padrão.	CLAE. Examinar o cromatograma obtido no teste A para pureza radioquímica. O pico principal no radiocromatograma obtido com a solução teste de fludeoxiglicose (^{18}F) é similar ao Rf do pico obtido com a solução padrão.
Pureza Radioquímica	CCD. O Rf de FDG- ^{18}F corresponde ao Rf da solução padrão (~0,4); a radioatividade de FDG- ^{18}F não é menor que 90% da radioatividade total.	A: CLAE como descrito para impurezas A. Limites: ^{18}F da forma de FDG- ^{18}F e FDM- ^{18}F : mínimo de 95% da radioatividade total. FDM- ^{18}F : mínimo de 10% da radioatividade total. B: CCD. ^{18}F na forma de FDG- ^{18}F e FDM- ^{18}F : mínimo 95% da radioatividade total.	A: CLAE como descrito para impurezas A. Limites: ^{18}F da forma de FDG- ^{18}F e FDM- ^{18}F : mínimo de 95% da radioatividade total. FDM- ^{18}F : mínimo de 10% da radioatividade total. B: CCD. ^{18}F na forma de FDG- ^{18}F e FDM- ^{18}F : mínimo 95% da radioatividade total.
pH	Entre 4,5 e 7,5	Entre 4,5 e 8,5	Entre 4,5 e 8,5
Endotoxinas Bacterianas	Não mais que 175/V unidades de endotoxinas por mL de injeção.	Menos que 175/V unidades de endotoxinas por mL de injeção.	Menos que 175/V unidades de endotoxinas por mL de injeção.
Pureza Química	A: Aminopoliéter: CCD. O tamanho e intensidade do ponto obtido na solução teste não excede o obtido com a solução padrão. B: CIDG: CLAE. Não mais de 1 mg por dose é encontrado.	A: Teste de impurezas A (CIDG) - CLAE. Limites: área da solução teste não é maior do que a obtida com a solução padrão (0,5 mg/V) B: Aminopoliéter: Spot Test. A porção central do ponto da solução teste é menos intensa que do que o obtido com a solução padrão.	A: Teste de impurezas A (CIDG) - CLAE. Limites: área da solução teste não é maior do que a obtida com a solução padrão (0,5 mg/V) B: Aminopoliéter: Spot Teste. A porção central do ponto da solução teste é menos intensa que do que o obtido com a solução padrão.
Solventes Residuais	CG. Não mais que 0,04% de acetonitrila, 0,5% de éter e 0,5% de etanol.	CG. Porém, não especifica quais solventes procurar. Remete ao capítulo geral 5.4.	CG. Porém, não especifica quais solventes procurar. Remete ao capítulo geral 5.4.
Esterilidade	Teste padrão de esterilidade USP.	Teste padrão de esterilidade BP.	Teste padrão de esterilidade EP.
Radioatividade	Utiliza um sistema calibrado para determinar a radioatividade em MBq (ou mCi/mL)	Utiliza um sistema calibrado para determinar a radioatividade em MBq (ou mCi/mL)	Utiliza um sistema calibrado para determinar a radioatividade em MBq (ou mCi/mL)

Tabela 2: Resultados obtidos na execução dos testes descritos na USP para os lotes FDG001726, FDG001727, FDG001731 e FDG001732.

USP				
Lotes				
Testes	FDG001726	FDG001727	FDG001731	FDG1732
t ½ (min)	107,58	110,15	107,21	111,11
Pureza Radionuclídica	532 e 1040 keV 99,91%	534 e 1048 keV 99,79%	518 e 1012 keV 99,87%	534 e 1044 keV 99,93%
Identidade Radioquímica (Rf FDG-¹⁸F)	Rf 0,455	Rf : 0,427	Rf: 0,558	Rf: 0,598
Pureza Radioquímica (Rf FDG-¹⁸F e radioatividade)	Rf 0,455 95,74%	Rf 0,427 98,59%	Rf: 0,558 91,09%	Rf: 0,598 92,33%
pH	5,5	5,5	5,8	5,5
Aminopoliéter	< 50 µg/mL	< 50 µg/mL	< 50 µg/mL	< 50 µg/mL
CIDG	Rt padrão: 11,38 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 11,38 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 11,28 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 11,28 min Rt amostra: não detectável
Éter	0 ± 0%	0 ± 0%	0 ± 0%	0 ± 0%
Acetonitrila	0,002 ± 0%	0,002 ± 0,001%	0,003 ± 0,001%	0,003 ± 0,001%
Etanol	0,072 ± 0,1%	0,104 ± 0,043%	0,123 ± 0,021%	0,139 ± 0,000%
Esterilidade	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Endotoxinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Radioatividade	278,8 mCi	62,5 mCi	192,4 mCi	104,2 mCi

Tabela 3: Resultados obtidos na execução dos testes descritos na BP e EP para os lotes FDG001726, FDG001727, FDG001731 e FDG001732.

BP e EP				
Lotes				
Testes	FDG001726	FDG001727	FDG001731	FDG001732
t ½ (min)	107,58	110,15	107,21	111,11
Pureza Radionuclídica	516 keV	520 keV	522 keV	520 keV
Impurezas	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%
Identidade Radioquímica (min)	Rt FDG: 9,07 Rt FDG-18F: 8,38	Rt FDG: 9,07 Rt FDG-18F: 8,37	Rt FDG: 8,55 Rt FDG-18F: 8,34	Rt FDG: 8,55 Rt FDG-18F: 8,48
Pureza Radioquímica (CLAE e CCD)	FDG- ¹⁸ F: 97,15% FDM- ¹⁸ F: 0,42% FDG- ¹⁸ F: 98,67% Derivados: 0,25%	FDG- ¹⁸ F: 99,21% FDM- ¹⁸ F: 0,44% FDG- ¹⁸ F: 99,51% Derivados: 0,25%	FDG- ¹⁸ F: 98,22% FDM- ¹⁸ F: 0,37% FDG- ¹⁸ F: 98,99% Derivados: 0,33%	FDG- ¹⁸ F: 99,32% FDM- ¹⁸ F: 0,14% FDG- ¹⁸ F: 99,52% Derivados: 0,18%
pH	5,5	5,5	5,8	5,5
Aminopoliéter	< 0,2 mg/ml	< 0,2 mg/ml	< 0,2 mg/ml	< 0,2 mg/ml
CIDG (min)	Rt padrão: 9,10 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 9,10 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 9,10 min Rt amostra: não detectável	Rt padrão: 9,10 min Rt amostra: não detectável
FDG	Rt: 9,07	Rt: 9,07	Rt: 8,55	Rt: 8,55
FDG-¹⁸F	Rt: 8,38	Rt: 8,37	Rt: 8,34	Rt: 8,48
FDM-¹⁸F	Rt: 7,46	Rt: 7,48	Rt: 7,43	Rt: 7,54
Éter	-	-	-	-
Acetonitrila	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,00 mg/mL	0,01 mg/mL
Etanol	0,35 mg/mL	0,34 mg/mL	0,26 mg/mL	0,34 mg/mL
Esterilidade	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Endotoxinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Radioatividade	278,8 mCi	62,5 mCi	192,4 mCi	104,2 mCi

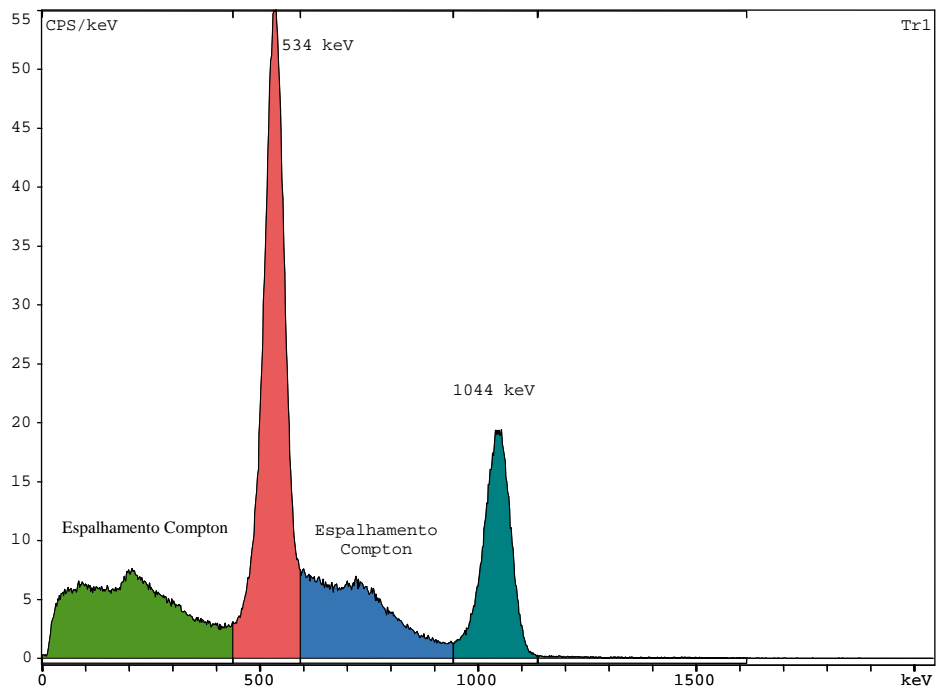


Figura 2: Espectro de raios gama do lote FDG001732, segundo a metodologia da USP, mostrando os picos nas zonas de 534 keV, 1044 keV e espalhamento Compton. Aquisição efetuada foi de forma circular.

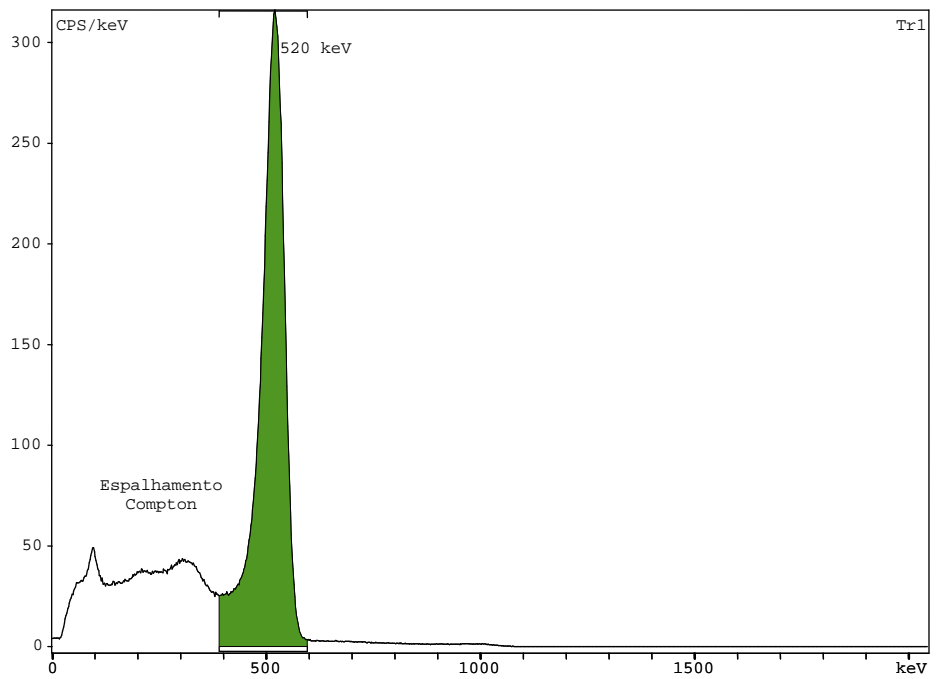


Figura 3: Espectro de raios gama do lote FDG001732 segundo metodologia da BP e EP, mostrando o pico na região de 520 keV e espalhamento Compton. Aquisição efetuada de forma planar.

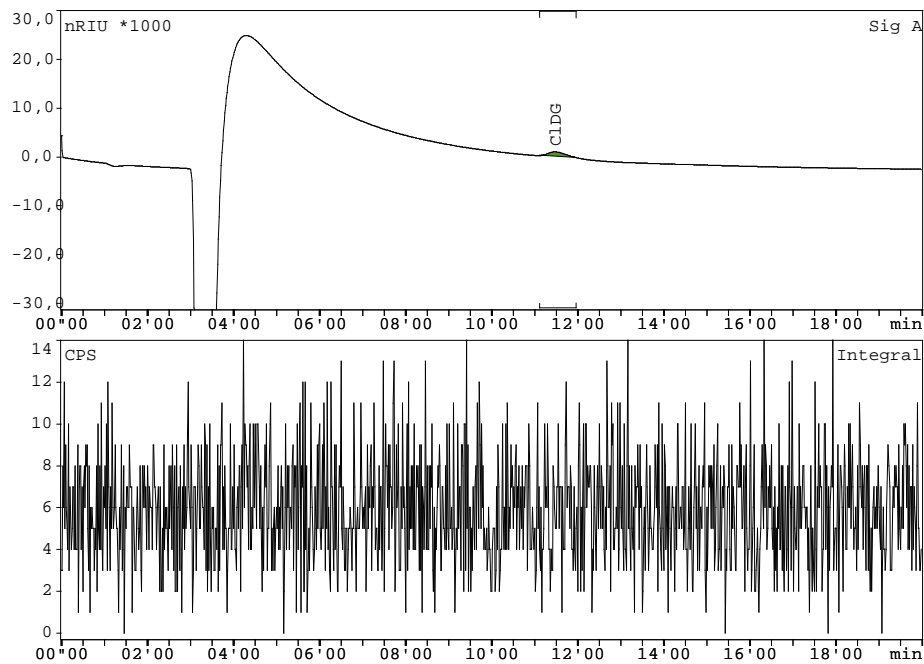


Figura 4: Cromatograma do padrão de CIDG, obtido através da metodologia da USP. O gráfico superior mostra o pico do CIDG obtido através do detector de índice refrativo. O cromatograma inferior, obtido pelo detector iodeto de sódio mostra o resultado do padrão que não é radioativo.

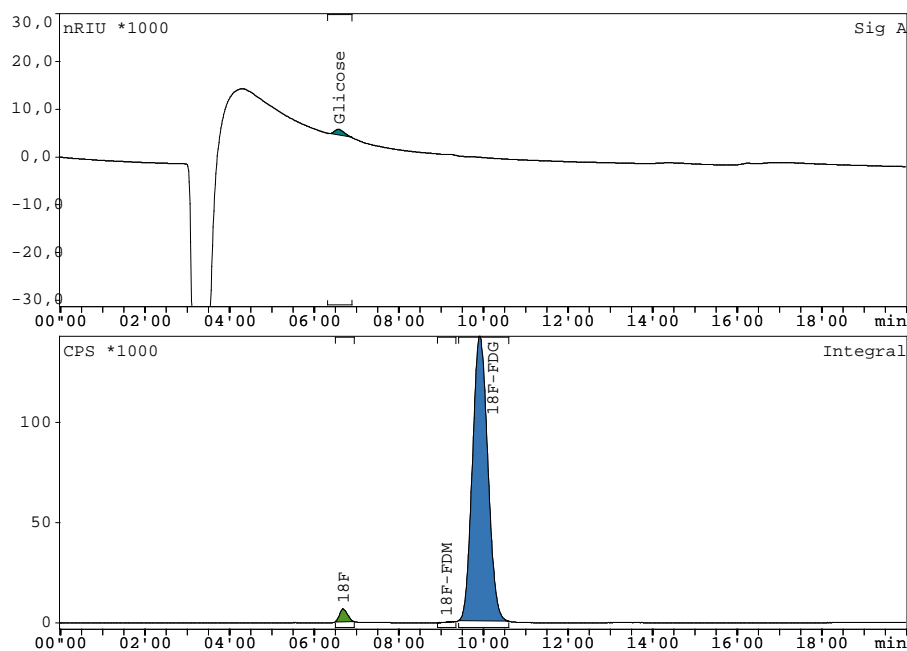


Figura 5: Cromatograma do lote FDG001732, obtido através da metodologia da USP. O cromatograma inferior, obtido pelo detector de iodeto de sódio mostra as substâncias marcadas com o ^{18}F , como FDM- ^{18}F e FDG- ^{18}F . Já o superior, mostra um pico referente a substância glicose, através do detector de índice refrativo.

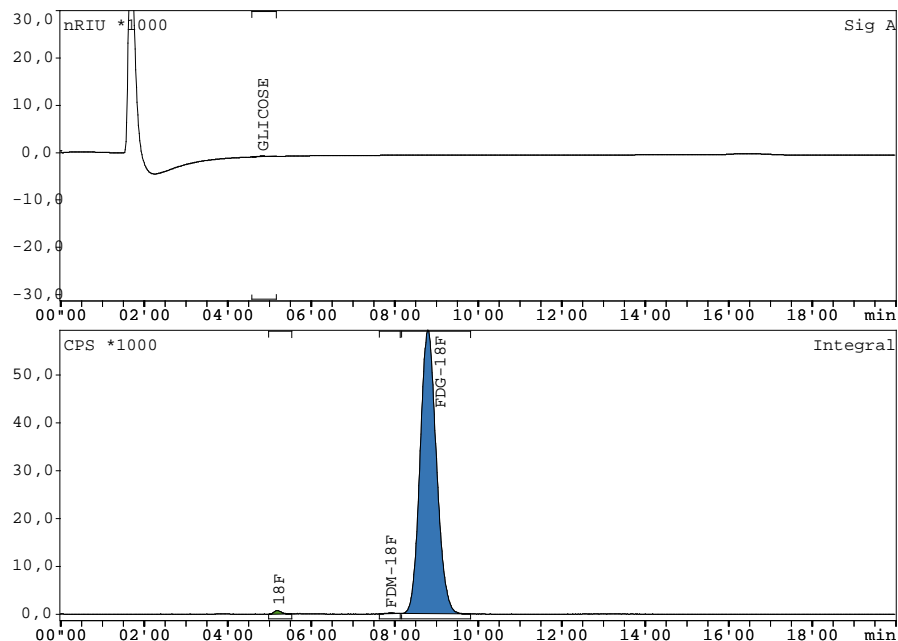


Figura 6: Cromatograma do lote FDG001732, obtido com a metodologia da BP e EP. O cromatograma inferior, obtido pelo detector de iodeto de sódio mostra as substâncias marcadas com o ^{18}F , como FDM- ^{18}F e FDG- ^{18}F . Já o superior, mostra um pico referente a substância glicose, através do detector de índice refrativo.

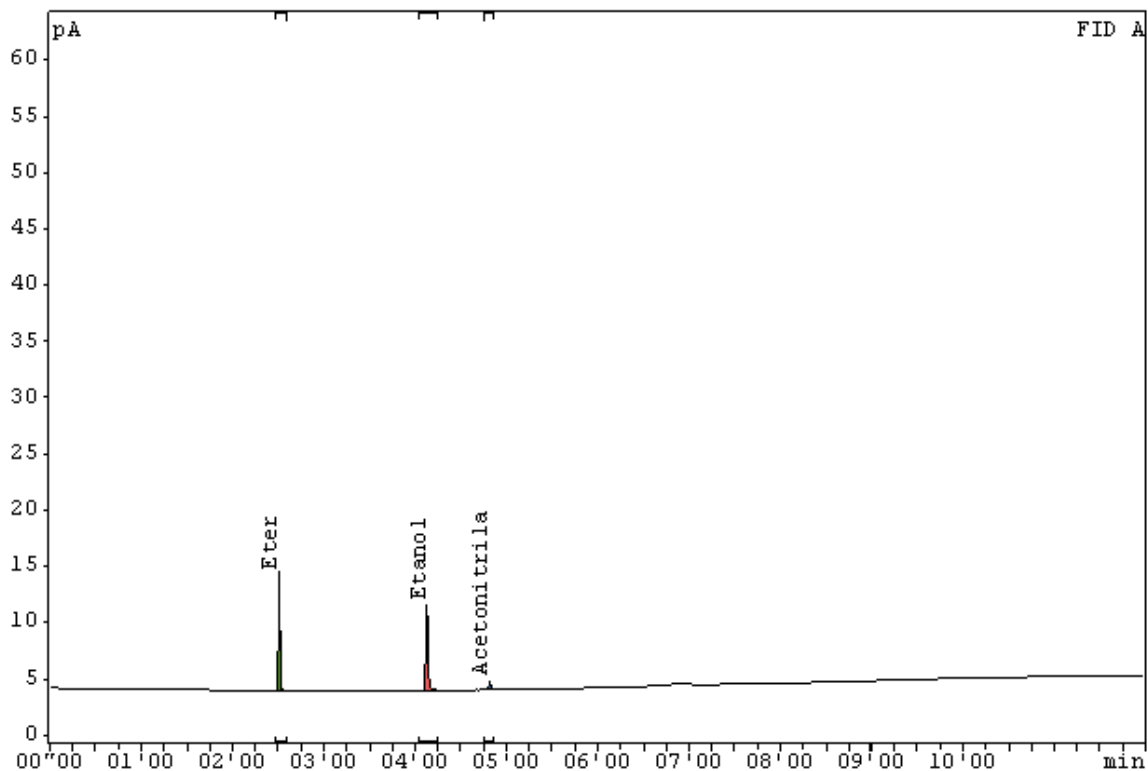


Figura 7: Cromatograma do padrão de solventes residuais segundo metodologia da USP, com os solventes éter e etanol na concentração de 0,1% e acetonitrila na concentração de 0,01%.

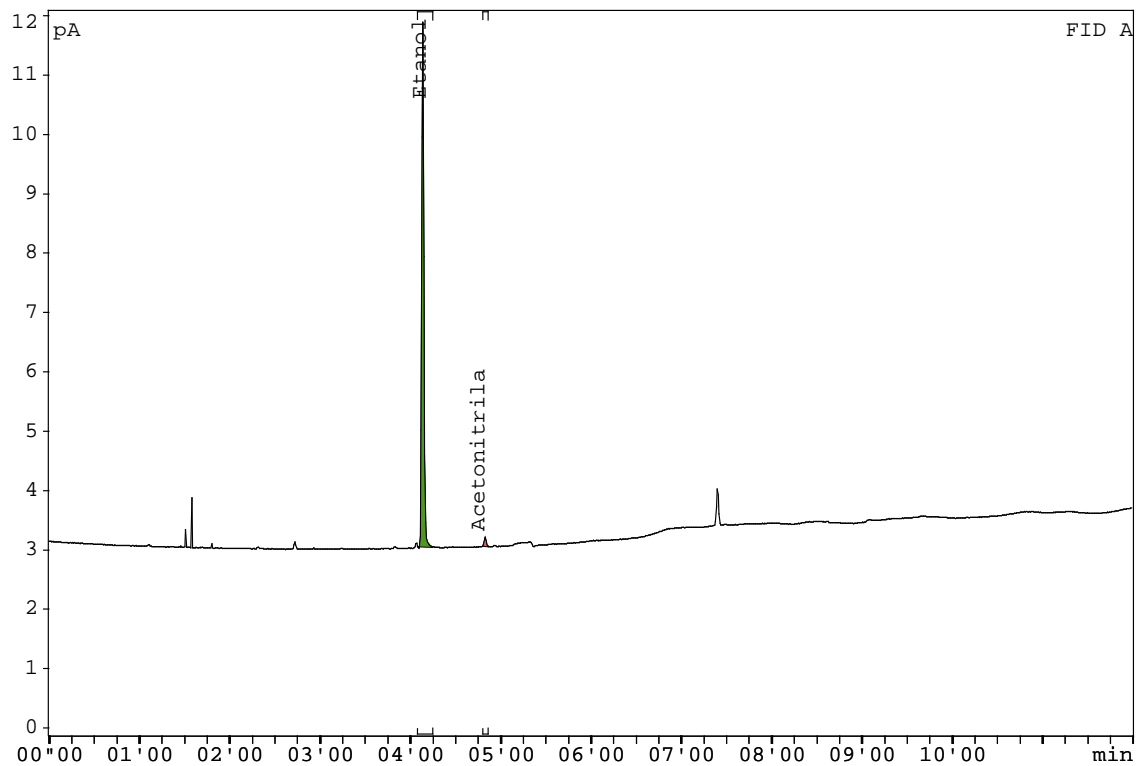


Figura 8: Cromatograma de solventes residuais do lote FDG001732, obtido através da metodologia da USP. Foram identificados os solventes etanol e acetonitrila nesta amostra, através da comparação do tempo de retenção com o espectro da solução de referência.

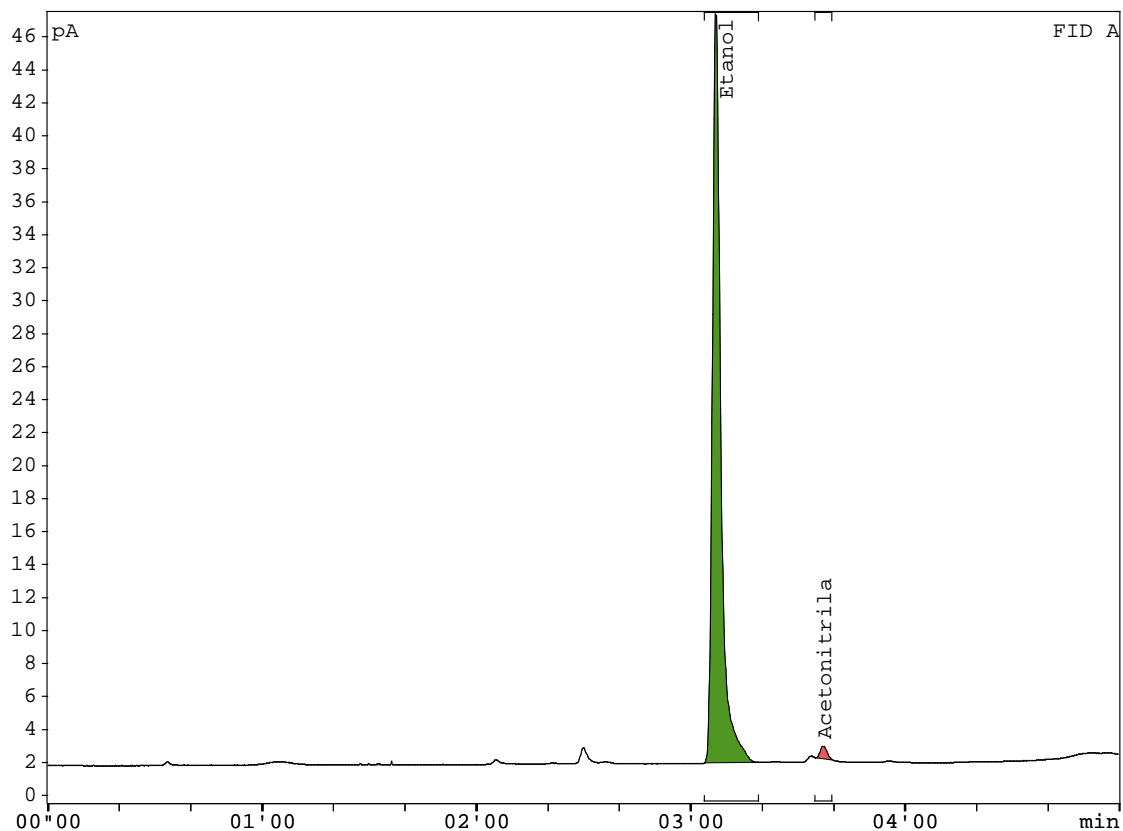


Figura 9: Cromatograma da amostra FDG001732, obtido através da metodologia da BP e EP. Foram identificados os solventes etanol e acetonitrila através da comparação do tempo de retenção com o espectro de solução padrão.