AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Estudo das formulações e controle de qualidade in vitro e in vivo de MAG3-99mTc
para aplicação renal em medicina nuclear**

NATANAÉL GOMES DA SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Margareth M. N. Matsuda

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo das formulações e controle de qualidade in vitro e in vivo de MAG3-99mTc
para aplicação renal em medicina nuclear**

NATANAÉL GOMES DA SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:
Profa. Dra. Margareth M. N. Matsuda

#

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2017

Fonte de Financiamento: IPEN-CNEN/SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SILVA, N. G. d. ***Estudo das formulações e controle de qualidade in vitro e in vivo de MAG3-99mTc para aplicação renal em medicina nuclear*** . 2017. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Natanael Gomes da

Estudo das formulações e controle de qualidade in vitro e in vivo de MAG3-99mTc para aplicação renal em medicina nuclear / Natanael Gomes Da Silva; orientadora Margareth Mie Nakamura Matsuda. -- São Paulo, 2017.
94 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017.

1. Estudo das formulações e controle de qualidade in vitro e in vivo de MAG3-99mTc para aplicação renal em medicina nuclear . 2. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações. 3. MAG3-99mTc, Radiofármacos, Marcação, Estabilidade, Túbulos Renais. . I. Matsuda, Margareth Mie Nakamura , orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus, por conceder-me a oportunidade de alcançar esta vitória na realização deste sonho. Pois nele vivo e existo para sua glória e louvor.

À minha princesa e esposa Vanuzia Maria Pereira da Silva. Quero expressar a minha gratidão pela sua companhia ao meu lado, com seu amor, carinho, admiração, compreensão e alegria. Por seu apoio e sua presença em todos os momentos em que pude contar com ela na elaboração desse trabalho. Que Deus a abençoe durante todo o tempo de sua vida com saúde, paz e felicidade. Ter alguém para dividir os sonhos é muito bom, ainda mais quando essa pessoa é quem amamos. Meu amor, não dá para descrever em palavras meus agradecimentos e sentimentos que tenho por você, princesa. Te amo, te admiro, te respeito...

Aos meus filhos Elvis, Kelvin e Willy. Quero também externar minha gratidão pela paciência e compreensão, na cooperação das responsabilidades em casa durante minha ausência na dedicação desse projeto. Agradeço a Deus todos os dias pelos filhos que vocês são. Que as bênçãos de Deus sejam derramadas sobre a vida de vocês em forma de prosperidade, felicidade, saúde e paz, em todo tempo que existirem. Que seus sonhos e objetivos sejam alcançados e conquistados pelo trabalho de vocês. E sempre contem comigo para o que precisarem, pois a felicidade de vocês é a minha alegria. Que vejam em mim um exemplo de dedicação, superação e vitórias. Vocês são a continuidade da nossa geração, amo vocês. Deus os abençoe...

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu Deus, por ser o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio, em todos os momentos; nunca me abandonou; sempre manteve seu anjo ao meu lado, adestrando minhas mãos na realização deste trabalho, para sua glória.
- ❖ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, e à Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN, na direção de seus representantes, que acreditaram no quanto é importante investir em pesquisas em prol da qualidade de vida da sociedade.
- ❖ Ao Centro de Radiofarmácia (CR) na direção do MSc. Jair Mengatti, que sempre acreditou e investiu no desenvolvimento deste trabalho em prol da medicina nuclear, no diagnóstico e tratamento do câncer.
- ❖ À minha orientadora Dra. Margareth M. N. Matsuda, por quem tenho profundo respeito e admiração. Agradeço-a por ter me aceitado como aluno e acreditado no desenvolvimento deste trabalho juntos. Pela paciência, competência, dedicação e atenção. Por seu incentivo, interação e aprimoramento do conhecimento profissional que muito contribuiu para o meu crescimento.
- ❖ À Dra. Neuza T. O. Fukumori, Gerente do Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia - CR, por quem tenho muito respeito e admiração. Por seu apoio e contribuição com sua experiência profissional, na conclusão desse projeto.
- ❖ Aos amigos da produção dos kits liofilizados, Cláudia Castanheira, José Alberto e Fábio Lazzarutti. Pela cooperação na produção dos kits liofilizados desenvolvidos neste trabalho.
- ❖ À Dra. Emiko Muramoto pela contribuição com o seu conhecimento no laboratório biológico e sua experiência na manipulação com animais, desde a marcação do radiofármaco, aplicação e biodistribuição.

- ❖ A todos os amigos do controle de qualidade que contribuíram direta ou indiretamente, Dra. Patricia A. Martins, José L. Silva, Ideli Moraes, Claudia Regina, José Alcides e especialmente ao Antônio C. Freire, companheiro de laboratório, que sempre me ajudou nos ensaios de distribuição biológica e ao Jurandir A. Sousa no ensaio de controle radioquímico.
- ❖ A todos os amigos do CENTIS em Cuba, Dr. Jorge Cruz, Dr. Alejandro Alberti, MSc. Gracys Gonzalés, Minely Barrabí, Marilyn Isaac, Regla, Yoisis, Leide, que muito contribuíram com seus conhecimentos de preparações e controle de marcação dos radiofármacos. Pelo carinho, dedicação e cooperação que a mim foi me dado durante o período que estive em visita pela Agência Internacional (AIEA). O meu muito obrigado, hermanos.
- ❖ A todos os meus amigos que passaram pela radiofarmácia como estagiários e alunos, e que hoje são profissionais liberais, mestres e doutores. Angélica B., Angélica T., Érika V., Elisiane G., Cássia Y, Stella B., Érica Ap., Rodrigo, Eutímio G., Ana F., Ricardo, Felipe M., Adriana M., Daphne S., Renata C., Renata; Priscilla B., Raquel B., Ana C., Danielle M., Daniela C., Guilherme L., Marcelo L.
- ❖ À MSc. Katia Suzi, pelas inúmeras vezes que conversamos, compartilhamos informações e conhecimento, sanando dúvidas de liofilização na produção dos kits durante o desenvolvimento desse trabalho. Por seu conhecimento profissional na área, que muito contribuiu na realização desse projeto.
- ❖ A todos os meus amigos da produção de geradores e de moléculas marcadas, pelo apoio e contribuição na realização desse projeto. Pelo tempo, trabalho e dedicação que investem todos os dias e a importância desse esforço para a produção e pesquisa no desenvolvimento de novos radiofármacos.
- ❖ Aos Professores e Doutores da P&D, que acreditaram na realização desse projeto, com sua gama de conhecimentos e apoio. Dr. João Osso, Dra. Elaine Bortoleti, Dra. Bluma Faintuch, Dra. Maria Tereza Colturato, Dra. Marycel Figols, Dra. Lorena Pozzo, Dra. Regina Carneiro, Dra. Vanessa Gomes, Dra. Dulcila Lessa, MSc. Peterson. A todos os cientistas envolvidos na pesquisa do CR.

- ❖ Aos amigos da Garantia da Qualidade, funcionários e bolsistas. Pelo apoio e orientação nas documentações para o registro do radiofármaco e adequações do produto conforme as especificações das farmacopeias e as legislações perante os órgãos fiscalizadores COVISA e ANVISA.
- ❖ Aos meus amigos Pedro Marcelino e José Ribeiro, que acreditaram no meu sonho desde o início da faculdade até este momento de júbilo. Pela amizade que mantemos há anos com respeito, carinho e boas risadas.
- ❖ Por fim, a todos aqueles que acreditaram na conclusão deste projeto. Tenham a certeza de que Deus sempre estará cooperando para o propósito que pretendemos alcançar. Sem Deus nunca conseguiremos realizar nossos sonhos e atingir nossos objetivos. A Sabedoria Divina é a chave que abre a porta do conhecimento. Obrigado a todos que contribuíram na realização desse projeto.

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra, nem indústria, nem ciência, nem sabedoria alguma (BÍBLIA, Eclesiastes, 9:10).

ESTUDO DAS FORMULAÇÕES E CONTROLE DE QUALIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MAG3-^{99m}Tc PARA APLICAÇÃO RENAL EM MEDICINA NUCLEAR

Natanaél Gomes da Silva

RESUMO

Os radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. São utilizados em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de várias doenças. O tecnécio-99m-mercaptoacetiltriglicina (MAG3-^{99m}Tc) foi primeiramente preparado em 1986 na Universidade de Utah pelo Dr. Alan R. Fritzberg e tem sido utilizado para avaliação da filtração glomerular e dos túbulos renais. O objetivo deste trabalho foi definir as condições de preparação de uma formulação para obtenção de MAG3 na forma de um reagente liofilizado comercial, para ser marcado com ^{99m}Tc. Inicialmente foram preparados lotes teste baseados nas formulações europeia e americana, com pH final 6 e os resultados foram insatisfatórios. A mudança de pH para 12 resultou em aumento na pureza radioquímica, porém sem estabilidade de marcação com ^{99m}Tc em até 4 horas. O teste com a formulação cubana em pH 9,5 resultou em pureza radioquímica (% PRq) maior que 90% até 4 horas de marcação. O limite especificado para % PRq é de 90%. Com base nos resultados anteriores, foram definidos os componentes da formulação IPEN e três lotes do produto liofilizado com 100 frascos cada, foram avaliados quanto à estabilidade radioquímica e biológica até cerca de 9 meses. Quatro lotes piloto produzidos com 230 frascos liofilizados cada, estão em estudo de estabilidade até o presente momento. As atividades de marcação com ^{99m}Tc foram 0,74 - 3700 MBq (5 - 100 mCi), em 3 mL de NaCl 0,9%. A % PRq foi determinada em até 240 minutos de marcação utilizando cromatografia em camada delgada, com 2 sistemas diferentes: Metiletilcetona:acetato de etila 60:40 (v/v) em fita de iTLC-SG para determinação de ^{99m}TcO₄⁻ em R_f = 1 e Acetonitrila:água 50:50 (v/v) em fita Whatman 3MM para determinação de ^{99m}TcO₂ em R_f = 0. Os resultados foram expressos como média % PRq ± desvio padrão considerando-se análises em duplicata de dois frascos para cada um dos tempos de marcação. 0,74 MBq (200 µCi) de atividade mínima ou 129,5 MBq (3500 µCi) de atividade máxima de marcação em 0,1 mL NaCl 0.9% foram administrados em camundongos Swiss e a radioatividade nos rins, fígado e vesícula, estômago, intestino e carcaça foi medida após 45 minutos. Os valores foram expressos como média % DI (Dose Injetada) ± DP. O estudo de toxicidade

aguda foi realizado em um grupo de 10 camundongos machos da linhagem Balb/c, pesando entre 20-30 g, com cerca de dois meses de vida, por um período de 14 dias. Todos os resultados de controle de qualidade atenderam aos critérios especificados. Observou-se que o preparo e a adição dos reagentes, a quantidade de cloreto estanoso e o valor de pH nas etapas intermediárias foram fatores importantes na obtenção de um radiofármaco para marcação com ^{99m}Tc , como no caso do MAG3.

Palavras-chave: MAG3- ^{99m}Tc , Radiofármacos, Marcação, Estabilidade, Túbulos Renais.

STUDY OF THE FORMULATIONS AND *IN VITRO* AND *IN VIVO* QUALITY CONTROL OF ^{99m}Tc -MAG3 FOR RENAL APPLICATION IN NUCLEAR MEDICINE

Natanaél Gomes da Silva

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are pharmaceutical preparations for diagnostic or therapeutic purposes that, when ready for use, contain one or more radionuclides. They are used in Nuclear Medicine for diagnosis and therapy of various diseases. Technetium-99m-mercaptoacetyltriglycine (^{99m}Tc -MAG3) was first prepared in 1986 at the University of Utah by Dr. Alan R. Fritzberg and has been used to assess glomerular filtration and renal tubules. The objective of this work was to define the preparation conditions of the formulation to obtain MAG3 in the form of a commercial lyophilized reagent to be labeled with ^{99m}Tc . Test lots were initially prepared based on the European and American formulations with final pH 6 and the results were unsatisfactory. The change in pH to 12 resulted in an increased radiochemical purity, however without ^{99m}Tc labeling stability in up to 4 hours. Testing with the Cuban formulation at pH 9.5 resulted in radiochemical purity (% PRq) greater than 90% up to 4 hours of labeling. The limit specified for % PRq is 90%. Based on the above results, the components of the IPEN formulation were defined and three batches of the lyophilized product with 100 vials each were evaluated for radiochemical and biological stability up to about 9 months. Four pilot batches produced with 230 freeze-dried vials each are currently in stability studies. The ^{99m}Tc labeling activities were 0.74 – 3,700 MBq (5 - 100 mCi) in 3 mL 0.9% NaCl. The % PRq was determined in up to 240 minutes of labeling using thin layer chromatography with 2 different systems: methyl ethyl ketone:ethyl acetate 60:40 (v/v) on iTLC-SG strip for determination of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in $R_f = 1$ and acetonitrile:water 50:50 (v/v) on Whatman 3MM strip for determination of $^{99m}\text{TcO}_2$ in $R_f = 0$. The results were expressed as mean % PRq $\pm$ Standard Deviation (SD) considering duplicate analyzes of two vials for each of the labeling times. 0.74 MBq (200 μCi) of minimal labeling activity or 129.5 MBq (3,500 μCi) of maximum labeling activity in 0.1 mL 0.9% NaCl were administered in Swiss mice and radioactivity in the kidneys, liver and gallbladder, stomach, intestine and carcass was measured after 45 minutes. Values were expressed as mean % ID (Injected Dose) $\pm$ SD. The acute toxicity study was performed on a group of 10 male Balb/c mice, weighing between 20-30 g with about two month old, for a period of 14 days. All quality control results met the specified criteria. It was found that the preparation and addition of the

reactants, the amount of stannous chloride and the pH value in the intermediate steps were important factors in obtaining a radiopharmaceutical for labeling with ^{99m}Tc as in the case of MAG3.

Keywords: ^{99m}Tc -MAG3, Radiopharmaceuticals, Labeling, Stability, Kidney Tubules.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Histórico do desenvolvimento e aplicação de radiofármacos na avaliação da função renal.	26
Tabela 2 - Aplicação dos radiofármacos segundo os mecanismos de transporte no sistema renal.	30
Tabela 3 - Reagentes utilizados na preparação do RL de MAG3 e de MAG3- ^{99m} Tc.	40
Tabela 4 - Solventes utilizados no controle radioquímico de MAG3- ^{99m} Tc.	40
Tabela 5 - Anestésicos utilizados no controle biológico de MAG3- ^{99m} Tc.	41
Tabela 6 - Equipamentos utilizados na preparação e controle de qualidade do RL de MAG3.	41
Tabela 7 – Parâmetros e limites de %DI em órgãos na biodistribuição com radiofármaco para avaliação renal.	46
Tabela 8 - Especificações de Bz-MAG3 descritas no certificado da ABX e resultados obtidos no CR-IPEN.	49
Tabela 9 - Bandas de absorção (cm ⁻¹) no espectro de IV do MAG3, obtido no CR.	50
Tabela 10 - Formulações comerciais de MAG3.	51
Tabela 11 - Resultados de %PRq de RL preparados com base na formulação E.	53
Tabela 12 - Resultados de %PRq de RL preparados com base na formulação A.	53
Tabela 13 - Efeito do pH na %PRq da formulação A.	54
Tabela 14 - Efeito do pH na %PRq da formulação C.	55
Tabela 15 - Resultados de %PRq e distribuição biológica da formulação C	56
Tabela 16 - Composição da formulação I de MAG3 e parâmetros de marcação com ^{99m} Tc.	57
Tabela 17 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m} Tc, 3700 MBq (100 mCi).	59
Tabela 18 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m} Tc, 3700 MBq (100 mCi).	60

Tabela 19 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	61
Tabela 20 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	62
Tabela 21 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	63
Tabela 22 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	64
Tabela 23 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	67
Tabela 24 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	68
Tabela 25 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	69
Tabela 26 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	70
Tabela 27 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	71
Tabela 28 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	72
Tabela 29 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	73
Tabela 30 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	74
Tabela 31 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	75

Tabela 32 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	76
Tabela 33 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	77
Tabela 34 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	78
Tabela 35 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	82
Tabela 36 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).	83
Tabela 37 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	84
Tabela 38 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Função renal, filtração glomerular e secreção tubular. A Figura 1A mostra a filtração glomerular, onde o sangue passa pelo rim, e cerca de 20% é filtrado pelo glomérulo. A Figura 1B mostra a secreção tubular, onde cerca de 80% do radiofármaco ligado às proteínas transportadoras são secretados para os túbulos proximais contornados, provenientes do fluido no espaço peritubular para ser eliminado via ureteres.	27
Figura 2 - Mecanismos de transporte dos radiofármacos no sistema renal	28
Figura 3 - Fluxograma da síntese do Bz-MAG3.	31
Figura 4 - Esquema simplificado das reações envolvidas na síntese de Bz-MAG3 e MAG3- ^{99m} Tc.	32
Figura 5 - Fórmula estrutural de: a) Bz-MAG3 e b) MAG3- ^{99m} Tc.	33
Figura 6 - Esquema simplificado da reação de transquelação de Bz-MAG3 na obtenção de MAG3- ^{99m} Tc.	33
Figura 7 - Representação do processo de eluição em um gerador de ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc.	39
Figura 8 - Fluxograma das principais etapas do preparo do RL de MAG3.	43
Figura 9 - Fluxograma para obtenção de MAG3- ^{99m} Tc para realização de controle de qualidade radioquímico e distribuição biológica.	44
Figura 10 - Espectro de IV de Bz-MAG3.	50
Figura 11 - Foto de frascos de RL de MAG3, cujas massas dos reagentes foram baseadas na formulação E (lacre amarelo), e formulação A (lacre verde claro).	52
Figura 12 - Foto de camundongos Swiss utilizados na distribuição biológica na formulação C.	57
Figura 13 - Foto de frascos de RL de MAG3 lotes I1, I2 e I3, da esquerda para direita, respectivamente.	58
Figura 14 - Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 17.	59
Figura 15 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m} Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 9 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 18.	60
Figura 16 - Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 19.	61

Figura 17 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 20.	62
Figura 18 - Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 21.	63
Figura 19 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 22.	64
Figura 20 - Foto de frascos de RL de MAG3 lotes IP1, IP3 e IP2.	65
Figura 21 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 23.	67
Figura 22 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 24.	68
Figura 23 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 25.	69
Figura 24 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 26	70
Figura 25 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 27.	71
Figura 26 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 28.	72
Figura 27 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 29.	73
Figura 28 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado	74

com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 30.

Figura 29 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 31. 75

Figura 30 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 32. 76

Figura 31 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 33. 77

Figura 32 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 34. 78

Figura 33 - Foto de frascos de RL de MAG3 lotes IP4, que após a marcação apresentou pH de 7,5. 80

Figura 34 – Foto mostrando a disposição de frascos de RL de MAG3 lote IP4, para simular condição de estresse no transporte. 81

Figura 35 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 35. 82

Figura 36 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 36. 83

Figura 37 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP4 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 37. 84

Figura 38 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP4 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 38 85

Figura 39 - Imagens planares obtidas em camundongo Swiss, 45 minutos após da administração da dose 111 MBq (3 mCi) em 0,1 mL de MAG3-^{99m}Tc. 86

Figura 40 - Imagens planares (b1,b2,b3) em 3D obtidas em camundongo Swiss durante o tempo de 60 minutos com dose administrada de 111MBq (3 mCi) em 0,1mL de MAG3-^{99m}Tc. 87

Figura 41 – Imagens dinâmicas planares obtidas em camundongo Swiss durante o tempo de 60 minutos, após administração da dose 111 MBq (3 mCi) em 0,1mL de MAG3-^{99m}Tc. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear
CR - Centro de Radiofarmácia
DCB - Denominação Comum Brasileira
DI – Dose Injetada
DMSA – Ácido Dimercaptossuccínico
DP – Desvio Padrão
DTPA – Ácido Dietileno Triamino Pentacético
EC – L,L-Etilenodicisteína
FDA - Food and Drug Administration
HPLC - Cromatografia a líquido de alta eficiência
IAEA - International Atomic Energy Agency
IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
iTLC-SG - Cromatografia instantânea de camada fina em sílica gel
IV – Infravermelho
LAL - Limulus ameobocyte lysate
MAG3 – Mercaptoacetiltriglicina
MBq - Mega Becquerel
mCi – mili Curie
PF – Ponto de Fusão
% PRq – % Pureza Radioquímica
RL – Reagente Liofilizado
SPC – Extração por Solvente
SPECT - Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único
TFG – Taxa de Filtração Glomerular
TIO – Tioglicolato
TSB - Caldo Tripticaseína de Soja
USP - United States Pharmacopeia
WHATMAN 3MM– Papel para cromatografia Whatman 3MM
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVO	25
4 REVISÃO DA LITERATURA	26
4.1 Radiofármacos de Uso Renal	26
4.2 Mecanismos de Transporte Renal	27
4.2.1 Filtração Glomerular	28
4.2.2 Secreção Tubular	29
4.3 Síntese de Benzoilmercaptoglicilglicilglicina (Bz-MAG3) e tecnécio- 99m-mercaptoacetilglicina (MAG3- ^{99m} Tc)	31
4.3.1 Importância do Bz-MAG3	34
4.3.2 Vantagens do MAG3- ^{99m} Tc	36
4.3.3 Métodos de controle de qualidade do MAG3- ^{99m} Tc	37
4.4 Características do ^{99m} Tc	38
4.5 Gerador de ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 Materiais para preparação do RL de MAG3 e MAG3- ^{99m} Tc	40
5.2 Equipamentos	41
5.3 Métodos	42
5.3.1 Identificações da pureza química do reagente MAG3	42
5.3.2 Preparo do RL de MAG3	42
5.4 Controles de qualidade	44
5.4.1 Radiomarcagem do MAG3- ^{99m} Tc	44
5.4.2 Pureza Radioquímica do MAG3- ^{99m} Tc	45
5.4.3 Controle Biológico	46
5.4.4 Controle de esterilidade e endotoxinas bacterianas	47
5.4.5 Ensaios de toxicidade aguda	47
5.4.6 Estudo de estabilidade	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Resultados dos Ensaios de Identificação do MAG3	49
6.2 Formulações Comerciais de RL de MAG3	51
6.3 Formulações Iniciais de RL de MAG3	52
6.3.1 Efeito da massa de cloreto estanho	52

6.3.2 Efeito do pH final da formulação	54
6.4 Estudo de estabilidade do RL de MAG3 lotes I1, I2 e I3	58
6.5 Preparação e Controle dos Lotes Pilotos IP1, IP2 e IP3	65
6.5.1 Resultados Microbiológicos dos RL de MAG3 lotes IP1, IP2 e IP3	66
6.5.2 Estudo de Toxicidade Aguda de Bz-MAG3	66
6.5.3 Resultados %PRq e %DI dos Kits RL de MAG3 lotes IP1, IP2 e IP3	66
6.6 Avaliação do pH de marcação na estabilidade do RL de MAG3 lotes IP4	80
6.6.1 Avaliação do estudo de estresse em transporte	81
6.6.2 Resultados do RL de MAG3 do lote IP4	82
7 CONCLUSÕES	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica atinge cerca de 10% da população mundial e afeta pessoas de todas as idades e etnia. A estimativa é que a enfermidade afete um em cada cinco homens e uma em cada quatro mulheres com idade entre 65 e 74 anos, sendo que metade da população com 75 anos ou mais sofre algum grau da doença. (PORTAL BRASIL, 2015). Estudos populacionais em diferentes países têm demonstrado prevalência de doença renal crônica de 7,2% para pessoas acima de 30 anos e 28% a 46% em indivíduos acima de 64 anos. Em pacientes em tratamento de hemodiálise, a mortalidade eleva-se de forma assustadora: uma pessoa de 30 anos tem a mesma chance de morrer que uma de 80 anos (SBN, 2012).

No Brasil, cerca de dez milhões de pessoas têm alguma disfunção renal. A prevalência de doença renal crônica é de 50/100.000 habitantes, inferior ao encontrado nos Estados Unidos (110/100.000) e no Japão (205/100.000), o que sugere que seja uma doença subdiagnosticada no país. De acordo com o censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) de 2012, publicado no site Portal Brasil em 2015, existem em torno de 100 mil brasileiros em diálise, com uma taxa de internação hospitalar de 4,6% ao mês e uma taxa de mortalidade de 17% ao ano. A grande maioria dos pacientes falece sem sequer ter acesso a essa terapia, por falta de diagnóstico (SBN, 2012).

A doença renal crônica pode ser facilmente diagnosticada por meio de um exame de urina e da dosagem de creatinina no sangue e pode ser efetivamente tratada, retardando a progressão da doença e reduzindo as mortes. Programas de prevenção precisam ser incentivados e executados de maneira contínua, incluindo orientação da população de profissionais de saúde e de órgãos das diversas esferas governamentais (SBN, 2012).

O censo da SBN de 2012 revelou também os índices das causas das doenças renais crônicas: 35,2% para hipertensão, 27,5% para diabetes, 12,6% para glomerulonefrites, 4,2% para doença renal policística e 20,5% para outros diagnósticos. Os principais fatores de risco são a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, sobrepeso, tabagismo, idade acima de 50 anos, história familiar de doença renal e o histórico pessoal de algum tipo de doença renal (SBN, 2012).

Uma das principais dificuldades no diagnóstico é que a doença renal é silenciosa e pode não apresentar sinais ou sintomas durante muito tempo. A

descoberta em fases avançadas pode levar a alterações irreversíveis: a necessidade de realizar exames para avaliar a função renal, como urina e dosagem de creatinina sérica, hipertensão e diabetes são as principais causas de perda de função dos rins. Hoje, o número de brasileiros (100 mil) que fazem diálise não para de crescer. Atualmente, cerca de 5,5 mil pacientes são submetidos à transplante renal por ano no Brasil (MARTINS, 2015).

Os principais sintomas da doença renal crônica são falta de apetite, cansaço, palidez cutânea, inchaços nas pernas, aumento da pressão arterial, alteração dos hábitos urinários como urinar mais à noite e urina com sangue ou espumosa. As recomendações das entidades médicas para reduzir o risco ou para evitar que o quadro se agrave incluem manter hábitos alimentares saudáveis, controlar o peso, praticar atividades físicas regularmente, controlar a pressão arterial, beber água, não fumar, não tomar medicamentos sem orientação médica, controlar a glicemia quando houver histórico na família e avaliar regularmente a função dos rins em casos de diabetes, hipertensão arterial, obesidade, doença cardiovascular e histórica de doença renal crônica na família (PORTAL BRASIL, 2015).

A taxa de filtração glomerular (TFG) é a melhor maneira de fazer a avaliação da função renal e a mais facilmente compreendida pelos médicos e pacientes. Ela é definida como a capacidade dos rins de eliminar uma substância do sangue e é expressa como o volume de sangue que é completamente depurado em uma unidade de tempo. Normalmente, o rim filtra o sangue e elimina os produtos finais do metabolismo proteico, enquanto preserva solutos específicos, proteínas (particularmente albumina) e componentes celulares. Na maioria das doenças renais progressivas, a TFG diminui com o tempo como resultado da diminuição no número total de néfrons ou redução na TFG por néfron, decorrentes de alterações fisiológicas e farmacológicas na hemodinâmica glomerular. A TFG pode estar reduzida bem antes do início dos sintomas e se correlaciona com a gravidade da doença renal crônica (BASTOS E KIRSZTAJN, 2011).

Na década de 50, iniciou-se a investigação da disfunção renal diagnosticada por traçado de histograma auxiliado por sonda externa; posteriormente, com emprego de RX, foi possível determinar a velocidade de transferência do contraste administrado no sistema urinário em função do tempo. Com o advento dos radionuclídeos e do avanço tecnológico e computacional, vários compostos foram e estão sendo investigados com finalidade diagnóstica e terapêutica. A imagem

cintilográfica passou a complementar as informações estruturais obtidas por ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética. A cintilografia permite o estudo de fluxo sanguíneo total, da função renal, da anatomia e da integridade do sistema coletor (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

O radiofármaco MAG3 foi introduzido na medicina nuclear da comunidade europeia sob o nome comercial de TechneScan MAG3 (Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Holanda), e desde então foram feitas algumas modificações na sua preparação e utilização. Em junho de 1990, o FDA (Food and Drug Administration) dos EUA finalmente aprovou o kit TechneScan MAG3 TM (Mallinckrodt Medical, Inc., St. Louis, Mo., EUA) para uso clínico. Atualmente existem kits de reagentes liofilizados (RL) comerciais de MAG3 produzidos na Europa, EUA, México, Chile, Argentina e Cuba, entre outros. No Brasil, mertiatida (^{99m}Tc) é o nome DCB do radiofármaco. Neste trabalho, o radiofármaco será representado por MAG3- ^{99m}Tc . As principais diferenças entre os kits produzidos na Europa e nos EUA já foram descritas em um trabalho publicado por Hung, sendo uma delas a possibilidade de utilizar maior atividade de ^{99m}Tc para a marcação do RL, sendo 3,7 GBq (100 mCi) no kit TechneScan MAG3 dos EUA e 925-1110 MBq (25-30 mCi), para o kit do mesmo fabricante, mas produzido na Europa (HUNG, 1992).

2 JUSTIFICATIVA

O programa de pesquisa e desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia (CR) tem como objetivo ampliar a produção e comercialização de novos radiofármacos destinados às clínicas e hospitais na área de medicina nuclear com finalidade de diagnóstico ou de terapia. O desenvolvimento da formulação do reagente liofilizado (RL) de MAG3 para marcação com ^{99m}Tc , para avaliação da função renal, visa ampliar o espectro de produtos comercializados pelo IPEN e atender à demanda de radiofármacos para avaliação da excreção tubular, hoje representado apenas pelo Etilenodicisteína (CIS-TEC produzido no IPEN).

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma formulação de MAG3 na forma de um RL comercial, para marcação com ^{99m}Tc , cujos resultados de controle radioquímico, biológico e estabilidade do MAG3- ^{99m}Tc atendam aos requisitos de qualidade de um radiofármaco para diagnóstico na obtenção da imagem renal, na avaliação da filtração glomerular e fluidez sanguínea pelos túbulos renais, o que será de grande valia para a comunidade médica na área da medicina nuclear brasileira.

Objetivos específicos:

- Preparar e avaliar formulações de MAG3 baseadas em fórmulas apresentadas em produtos comercializados no mundo.
- Avaliar a estabilidade do produto formulado no IPEN, em condições de prateleira.
- Avaliar a estabilidade do produto por 6 meses considerando as variações de temperatura e umidade, a que o produto está sujeito durante o transporte do IPEN ao usuário final.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Radiofármacos de uso renal

Os radionuclídeos têm sido usados para avaliar a função renal desde 1950 (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Os radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos (ANVISA, 2017). Para uso diagnóstico em medicina nuclear, são utilizados radiofármacos que apresentam na sua constituição radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) penetrante, que conseguem atravessar os tecidos e através do uso de SPECT (Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único) é possível obter imagens do órgão alvo (OLIVEIRA et al., 2006).

O histórico do uso de radionuclídeos na avaliação da função renal está descrito na Tabela 1 (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Tabela 1 – Histórico do desenvolvimento e aplicação de radiofármacos na avaliação da função renal.

Ano	Radiofármaco	Exame diagnóstico
1952	Lopax- ¹³¹ I	Contagem da urina
1956	Diodrast- ¹³¹ I	Renograma
1960	Hippuran- ¹³¹ I	Renograma
1968	Hippuran- ¹³¹ I	Renograma com furosemida
1968	Cl ₂ ²⁰³ Hg	Função renal individual
1969	Gluconato- ^{99m} Tc	Cintilografia renal
1970	DTPA- ^{99m} Tc	Cintilografia renal, TFG
1971	Hippuran- ¹³¹ I	TFG única
1974	DMSA- ^{99m} Tc	Cintilografia renal
1984	Hippuran- ¹³¹ I	Renograma com captopril
1986	MAG3- ^{99m} Tc	Cintilografia renal

Fonte: THRALL e ZIESSMAN (2003).

4.2 Mecanismos de Transporte Renal

Determinadas substâncias são eliminadas do organismo pelos mecanismos de secreção tubular após metabolização no fígado. Os processos de reabsorção e de secreção ativa dos túbulos distais são influenciados por hormônios, pela quantidade total de solutos, pela dieta, pelo equilíbrio ácido-base e pelo fluxo do filtrado. O filtrado glomerular que alcança os túbulos do néfron flui através do túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e canal coletor, até atingir a pelve renal. Ao longo desse trajeto mais de 99% da água filtrada no glomérulo é reabsorvida, e o líquido que penetra na pelve renal constitui a urina propriamente dita. O túbulo proximal é responsável pela reabsorção de cerca de 65% da quantidade de água filtrada nos capilares glomerulares, sendo o restante reabsorvido na alça de Henle e no túbulo distal. O fluxo plasmático renal (FPR) é de aproximadamente 600 mL/min. Deste volume, 20% (120 mL/min) são filtrados pelos glomérulos. Os 80% restante do plasma não filtrado entram no fluido peritubular, onde são secretados ativamente pelas células epiteliais tubulares para os túbulos renais, conforme Figura 1 (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Figura 1 - Função renal, filtração glomerular e secreção tubular. A Figura 1A mostra a filtração glomerular, onde o sangue passa pelo rim, e cerca de 20% é filtrado pelo glomérulo. A Figura 1B mostra a secreção tubular, onde cerca de 80% do radiofármaco ligado às proteínas transportadoras são secretados para os túbulos proximais contornados, provenientes do fluido no espaço peritubular para ser eliminado via ureteres.

Fonte: THRALL e ZIESSMAN (2003).

Uma classificação funcional dos principais radiotraçadores é baseada na capacidade de captação do radiofármaco, conforme relacionado na Figura 2 (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Vários têm sido os radiofármacos usados ao longo do tempo para avaliar a função renal, o que é explicado a seguir e resumido na Tabela 2 (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Figura 2 - Mecanismos de transporte dos radiofármacos no sistema renal.

Fonte: THRALL e ZIESSMAN (2003).

4.2.1 Filtração Glomerular

Um radiofármaco destinado à avaliação da filtração glomerular renal não é reabsorvido nem secretado pelos túbulos renais. Sua característica é fluir livremente, preferencialmente, sem nenhuma ligação às proteínas plasmáticas. Aproximadamente 20% da função renal é resultante da filtração glomerular. Vários traçadores diferentes têm sido usados para fins de investigação ou para propósitos de quantificação (exemplo iotalamato-¹²⁵I); entretanto, clinicamente, o radiofármaco mais importante para obter o gráfico do renograma (Curva de atividade/tempo gerada a partir de regiões de interesse desenhadas sobre a imagem renal) é o DTPA-^{99m}Tc. Este radiofármaco é quase totalmente filtrado pelos glomérulos em cerca de 60 minutos (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

4.2.2 Secreção Tubular

A secreção tubular atua em direção oposta à reabsorção. As substâncias são transportadas do interior dos capilares para os túbulos, de onde são eliminadas na urina. Os mecanismos de secreção tubular, à semelhança aos mecanismos de reabsorção, podem ser ativos ou passivos, onde incluem a utilização de energia pela célula para a sua execução ou não. Os processos mais importantes estão relacionados à secreção tubular de íon hidrogênio, potássio e amônia. Os radiofármacos apresentam diferentes mecanismos de captação e excreção renal, incluindo filtração glomerular, secreção tubular e fixação tubular (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Através de técnicas não invasivas da medicina nuclear como o PET (tomografia por emissão de pósitron) e SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fótons de energia única), estudo de farmacocinética de drogas têm sido realizadas. A determinação segura da ligação dos radiofármacos marcados com ^{99m}Tc às proteínas do plasma e constituintes das células sanguíneas poderá ajudar a entender a localização dos radiofármacos em tecidos e órgãos alvos. Uma vez que vários fatores podem alterar esta ligação, este conhecimento é útil na realização e interpretação dos exames cintilográficos. Desse modo, uma melhor avaliação do órgão poderá ser feita, evitando, que o exame seja repetido e o paciente e a equipe biomédica sejam submetidos a uma dose de radiação desnecessária. Quando um radiofármaco é administrado a um paciente, sempre uma fração do mesmo é encontrada ligada às proteínas plasmáticas. É bem conhecido que esta ligação proteica pode influenciar na distribuição dos traçadores radioativos nos compartimentos intersticial e celular do corpo (ALEIXO et al., 2002).

Tabela 2 – Aplicação dos radiofármacos segundo os mecanismos de transporte no sistema renal.

Radiofármacos	Mecanismo de Captação		
DTPA-^{99m}Tc	----	5 -10% Ligação plasmática	100% Filtração glomerular
DMSA-^{99m}Tc	50% Ligação cortical	90% Ligação plasmática	----
Glucoheptonato-^{99m}Tc	20% Ligação cortical	----	80% Filtração glomerular
EC-^{99m}Tc	Secreção tubular	30% Ligação plasmática	Filtração glomerular
Hippuran-^{131/123}I (OIH-^{131/123}I)	80% Secreção tubular	60% Ligação plasmática	20% filtração glomerular
MAG3-^{99m}Tc	100% Secreção tubular	90% Ligação plasmática.	<3 % Filtração glomerular

Fonte: THRALL e ZIESSMAN (2003), BEIKI (2008).

4.3 Síntese de Benzoilmercaptoglicilglicilglicina (Bz-MAG3) e tecnécio-^{99m}-mercaptoacetilglicilglicina (MAG3-^{99m}Tc)

O esquema das etapas para obtenção da benzoilmercaptoglicilglicilglicina (Bz-MAG3) proposta por FRITZBERG et al. (1986) está representado no fluxograma da Figura 3.

Os principais reagentes, numerados de (I) a (V), e as reações envolvidas na obtenção de Bz-MAG3 e MAG3-^{99m}Tc são apresentados nas Figuras 3 e 4.

A fórmula estrutural de Bz-MAG3 e MAG3-^{99m}Tc está representada, em destaque, na Figura 5 e o esquema simplificado da reação de transquelação Bz-MAG3 na obtenção de MAG3-^{99m}Tc está mostrado na Figura 6.

Figura 3 - Fluxograma da síntese do Bz-MAG3.

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos de FRITZBERG et al. (1986)

O resíduo sólido isolado por filtração após lavagem com clorofórmio resultou em um composto com o enxofre protegido pelo grupo benzoila, conhecido comercialmente como bertiatida e representado por Bz-MAG3 (Figura 4) (FRITZBERG et al., 1986; Bormans et al., 1995). O processo de cristalização em metanol resultou em 1,25 g (90%) do produto purificado. As características do Bz-MAG3 foram confirmadas realizando PF (195 - 196 °C), espectro de RMN (em DMSO-d₆) e análise elementar, confirmando a fórmula C₁₅H₁₇N₃O₆S (FRITZBERG et al., 1986).

Figura 4 - Esquema simplificado das reações envolvidas na síntese de Bz-MAG3 e MAG3-^{99m}Tc (CHEMDRUG, 2016).

Fonte: CHEMDRUG (2016)

A hidrólise do Bz-MAG3 (Figura 5a), de nome químico (N-[N-[N-[(benzoiltio) acetil] glicil] glicil] glicina) na presença de uma solução de pertecnetato, SnCl₂ e gluconato originou o radiofármaco cujo nome DCB é mertiatida (^{99m}Tc), representado por MAG3-^{99m}Tc (Figura 5b) ou {[N-[N-[N-(mercaptoacetil)glicil]glicil]glicinato(2-)-N,N', N'',S] oxotecnetato(2-)-dissódico}}, e é, também conhecido como tecnécio-99m-mercaptoacetiltriglicina, originalmente obtido em 1986 na Universidade de Utah, nos Estados Unidos da América (EUA) pelo Dr. Alan R. Fritzberg e colaboradores (FRITZBERG et al., 1986).

Figura 5 – Fórmula estrutural de: a) Bz-MAG3 e b) MAG3-^{99m}Tc

Fonte: MALLINCKRODT (2017).

O primeiro passo para a obtenção de MAG3-^{99m}Tc consiste na formação de um complexo do ^{99m}Tc com um ligante fraco como gluconato ou tartarato de sódio, em meio aquoso, durante o processo de aquecimento (Figura 6), (FRITZBERG et al., 1986; ESHIMA e TAYLOR, 1992). O Bz-MAG3, por ser um ligante pouco solúvel para ser complexado com o ^{99m}TcO₄⁻ (pertechnetato de sódio), precisa passar por uma etapa de formação do complexo de tartarato-^{99m}Tc, por redução do ^{99m}TcO₄⁻ com íon estanoso, para então ocorrer a reação da troca, durante a etapa de ebulição, e resultar no MAG3-^{99m}Tc (SAHA, 1998; BORMANS et al., 1995).

Figura 6 - Esquema simplificado da reação de transquelação de Bz-MAG3 na obtenção de MAG3-^{99m}Tc.

Fonte: PERALES (2017).

A marcação de Bz-MAG3 na forma de pó liofilizado, estéril e apirogênico com o eluato de pertecnetato de sódio, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, estéril, resulta em um produto para administração intravenosa, que tem sido utilizado por vários países, na área de medicina nuclear para uso diagnóstico em pacientes com insuficiência renal, para avaliação da filtração glomerular e dos túbulos renais (FRITZBERG et al., 1986; MALLINCKRODT, 2017).

4.3.1 Importância do Bz-MAG3

O radiofármaco foi submetido a ensaios clínicos em 1987 (TAYLOR et al., 1987) e passou pelos testes da Fase III em 1988 (AL-NAHHAS et al., 1988; DeMets et al., 2010; ANVISA, 2017).

Nowotnik (1990) e Theobald (1990) indicaram que o rendimento de marcação deve ser superior a 90%. Atualmente, a Farmacopeia Americana, USP 39 (2016) e a Farmacopeia Europeia 8.0 (2014) estabelecem que 90% devem estar na forma de mertiatida (^{99m}Tc).

Estudos com $\text{MAG3-}^{99m}\text{Tc}$ indicaram uma taxa de excreção mais rápida do que para o Hippuran- ^{131}I , permitindo obter uma imagem de melhor qualidade, com a vantagem de poder administrar uma dose menor (TAYLOR et al., 1987; AL-NAHHANAS et al., 1988). A especificidade do $\text{MAG3-}^{99m}\text{Tc}$ para a excreção renal foi de 85%, comparada com 69% para o produto marcado com ^{131}I (TAYLOR et al., 1986). O $\text{MAG3-}^{99m}\text{Tc}$ é eliminado muito rapidamente por secreção tubular na primeira passagem pela parte distal do túbulo proximal. Na função renal, a secreção tubular corresponde a 80% enquanto a filtração glomerular é responsável por cerca de 20% (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Noll et al. (1992) e Bormans et al. (1995) mostraram que variações na estrutura de MAG3 influenciaram na marcação com ^{99m}Tc . A fim de garantir a formação de $\text{MAG3-}^{99m}\text{Tc}$, a proporção de Bz-MAG3 em relação ao íon Sn^{2+} deve ser suficiente. Segundo Fritzberg et al. (1986), a pureza radioquímica (%PRq) é maior quando a concentração de Sn^{2+} é de cerca de 0,03 mM. Em 1990, Bubeck et al. indicaram que a %PRq da mertiatida (^{99m}Tc) deveria ser maior que 95% para se obter valores precisos de depuração renal.

Seetharaman, Sosabowski & Ballinger (2007) investigaram alguns parâmetros na radiomarcagem de $\text{MAG3-}^{99m}\text{Tc}$, a saber, efeito da atividade,

concentração radioativa, tempo entre a adição do eluato ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) e o início do aquecimento, o tempo de aquecimento e a estabilidade do produto, e observaram que, quando a ebulição foi tempo menor que 10 minutos, a %PRq foi insuficiente, de cerca de 60%. O trabalho de Millar & O'Brien (1998) mostrou que a %PRq não foi influenciada pelo eluato do gerador ou diluição do mesmo com NaCl 0,9%, agitação ou adição de ar no frasco. A estabilidade da marcação de $\text{MAG3-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, obtida com o kit dos EUA foi maior do que a do produto europeu, 6 horas versus 4 horas, respectivamente (JAFRI et al., 1988).

Bz-MAG3 é um composto sensível à luz, e deve ser embalado em frascos âmbar. A recomendação para se evitar a exposição à luz é encontrada somente no kit TechneScan MAG3 dos EUA, sendo que na embalagem do produto europeu esta informação está ausente. Outras diferenças entre a formulação europeia e a americana do RL de MAG3 são a temperatura de armazenamento e utilização de 20 mg de lactose monoidratada como excipiente no kit de MAG3 dos EUA (HUNG, 1992).

$\text{MAG3-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ está disponível no mercado desde o início de 1990, e tornou-se o principal traçador tubular. Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas (90%), o que confere a ele uma pequena TFG (menor que 3%). Após a administração por via intravenosa, seu clareamento sanguíneo é rápido e bifásico, sendo rapidamente excretado por secreção tubular renal (THRALL e ZIESSMAN, 2003; SAHA, 1998; FRITZBERG et al., 1986; ESHIMA e TAYLOR, 1992), permitindo a avaliação não só da estrutura, mas da função e da perfusão, e da integridade do sistema coletor, além da monitorização da insuficiência renal, da obstrução dos canais colectores e de refluxo de urina. O pico máximo de atividade renal deve mostrar-se ao redor de 4 a 30 minutos, em que cerca de 70% da dose é excretada pelos rins, e após três horas, 95% da dose encontra-se na bexiga (JURRISSON et al., 1993). Cerca de 1-3% da dose é excretada através do sistema hepatobiliar. Sua fração de extração é de 40-50%, o que faz com que seja o radiofármaco de escolha em pacientes com suspeita de obstrução, com déficit de função renal e especialmente em crianças. A dose estimada para um adulto de 70 kg é de cerca de 5-10 mCi (185-370 MBq) e o órgão crítico é a bexiga (TAYLOR et al., 1988).

4.3.2 Vantagens do MAG3-^{99m}Tc

A principal vantagem do MAG3-^{99m}Tc sobre o Hippuran-¹³¹I reside na energia emitida com o ^{99m}Tc, resultando em melhores imagens, menor dosimetria de radiação, além de fornecer informação de grande valia sobre fluxo plasmático renal efetivo, potencialidade do sistema coletor e função cortical renal. O mecanismo de depuração renal do Hippuran-¹³¹I é de cerca de 20% pela TFG e cerca de 80% por secreção tubular. O uso do Hippuran-¹³¹I tem diminuído significativamente desde a introdução da indicação do MAG3-^{99m}Tc. MAG3-^{99m}Tc é também uma alternativa ao EC-^{99m}Tc, proporcionando qualidade de imagem semelhantes (BEIKI et al., 2008).

O EC-^{99m}Tc foi desenvolvido como agente para estudo dinâmico tubular cuja forma de excreção renal se faz por filtração glomerular e secreção tubular ativa, não apresentando nenhum percentual de reabsorção; uma hora após a sua administração endovenosa, 70% estão presentes na urina. A fração de ligação plasmática do EC-^{99m}Tc é de 30%, significativamente menor que no MAG3-^{99m}Tc (90%) e Hippuran-¹³¹I (60%). EC-^{99m}Tc apresenta a vantagem de a marcação ser facilmente realizada em temperatura ambiente (BEIKI et al., 2008; CHEN et al., 1993).

Já o DTPA-^{99m}Tc apresenta 100% de filtração glomerular, com baixa ligação proteica (<5%), depuração plasmática rápida para o espaço extracelular e distribuição através dos rins. A concentração nos rins atinge o pico em 3-4 minutos após a injeção com 50% excretada via renal em 2 horas e 95% após 24 horas (BEIKI et al., 1993).

No caso do DMSA-^{99m}Tc, este é absorvido pelos rins, sendo que 75-90% permanece ligado às proteínas plasmáticas, o que impede significativa filtração glomerular. Da atividade administrada, 25% é excretada com a urina durante a primeira hora. A retenção corporal total de DMSA-^{99m}Tc é muito maior, provocando dose de radiação maior ao paciente (BEIKI et al., 1993).

4.3.3 Métodos de controle de qualidade do MAG3-^{99m}Tc

Para uso nas clínicas de medicina nuclear, faz-se necessária a realização dos controles de qualidade adequados para os radiofármacos, em que se incluem análises físico-químicas, físicas, químicas, microbiológicas, biológicas e de estabilidade (HEMERT et al., 2005; THEOBALD, 1990). No caso de radiofarmácias que produzem os RL, devem ser atendidos os critérios de Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos RDC 17/2010 acrescidos dos específicos, estabelecidos na RDC 63/2009 (ANVISA, 2009); e no caso das clínicas de medicina nuclear e radiofarmácias hospitalares que utilizam estes radiofármacos, devem ser realizados os ensaios preconizados na RDC 38/2008 (ANVISA, 2008)

O método bastante utilizado para determinar a %PRq da mertiatida (^{99m}Tc) é a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC), que é, porém, demorado e dispendioso, pois requer um equipamento não disponível em clínicas de medicina nuclear. A bula do kit produzido na Europa descreve dois métodos para determinar a %PRq do produto marcado, HPLC e extração por solvente (SPE), enquanto a bula do kit produzido nos EUA descreve o uso de algumas modificações no método de SPE (Extração por solvente) (SEETHARAMAN et al., 2006).

Chen et al. (1993) propuseram um método mais simples por cromatografia em camada delgada (CCD - iTLC-SG), que se mostrou eficiente na determinação da porcentagem de ^{99m}TcO₂. O tempo necessário para realizar a análise foi menor do que 20 minutos. O sistema iTLC-SG mostrou-se especialmente adequado para o controle de qualidade da preparação da mertiatida (^{99m}Tc), para uso rotineiro, por ser simples e rápido, além de confiável. A USP 39 (2016) descreve 2 métodos, sendo o método 1 por CCD para determinação de ^{99m}TcO₂ ou ^{99m}Tc hidrolisado ou coloidal, e método 2 por HPLC para pertecnetato livre (^{99m}TcO₄⁻) e mertiatida (^{99m}Tc).

Fritzberg et al. (1986) realizaram estudos de biodistribuição em camundongos, e estudos de depuração plasmática e determinação de parâmetros farmacocinéticos em ratos. Okarvi et al. (2002) sintetizaram uma série de derivados de MAG3 e estudaram as características biológicas utilizando camundongos e babuínos. A porcentagem da dose injetada (%DI) no sistema urinário, rins, fígado, intestino e sangue após 30 minutos foi de 89%, 2%, 2%, 5%, 1%, respectivamente. A avaliação biológica em ratos mostrou que a excreção da mertiatida (^{99m}Tc) é

ligeiramente mais rápida que a do Hippuran-¹³¹I, e é quantitativamente secretada pelos rins, mesmo na presença de um inibidor, como a probenecida. Medidas da eficiência da excreção resultaram em valores de 85%, sendo 75% devido à secreção tubular, enquanto no Hippuran-¹³¹I a porcentagem foi de 69% com 43% devido à secreção tubular.

4.4 Características do ^{99m}Tc

O ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais usado em medicina nuclear por apresentar propriedades físicas e químicas ideais para ser destinado à produção de imagens cintilográficas, a saber: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama pura de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radionuclídeo a partir de um sistema de gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (⁹⁹Mo/^{99m}Tc), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON et al., 1993; SAHA, 1998). O tecnécio é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-3 a +7). A estabilidade desses estados de transição depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são os mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, 1990; SAHA, 1998).

O íon pertecnetato ^{99m}TcO₄⁻ apresenta estado de oxidação +7, tornando-o uma espécie não reativa e incapaz de se ligar a algum composto, sendo, portanto, necessária a utilização de um agente redutor para levá-lo a um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II (SnCl₂ · 2H₂O) é o agente redutor mais comumente utilizado na preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc. O ^{99m}Tc reduzido é uma espécie quimicamente reativa, o qual se liga com uma grande variedade de agentes quelantes, que geralmente são doadores de elétrons e formam com o ^{99m}Tc uma ligação covalente coordenada. Existem muitos compostos capazes de se ligar ao ^{99m}Tc, sendo usados em medicina nuclear para avaliar a função e/ou a morfologia de um órgão e, podendo detectar algum estado patológico em pacientes. A radiomarcagem de fármacos específicos permite também a detecção e rastreamento de tumores benignos ou malignos (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 1998).

4.5 Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Os geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ são constituídos por uma coluna de alumina, ou por uma resina de troca iônica, na qual se fixa o radionuclídeo "pai" de tempo de meia-vida física longo. Por decaimento deste último, forma-se o radionuclídeo "filho", que é separado por eluição, com um eluente adequado. O eluato pode ser utilizado diretamente em aplicações clínicas, constituindo, neste caso, a substância radiofarmacêutica, ou pode servir para preparar radiofármacos mais complexos. O eluato deve ser obtido na forma estéril pelo uso de filtros de 0,22 μm e isento de pirogênicos (OLIVEIRA et al., 2006).

Figura 7 - Representação do processo de eluição em um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Fonte: Desenho do autor com dados extraídos de SAHA, (1998).

No caso do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, a atividade do radionuclídeo "filho" ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) vai aumentando à medida que o radionuclídeo "pai" (^{99}Mo) vai decaindo. O ^{99}Mo , na forma química de MoO_4^{2-} , encontra-se adsorvido numa coluna de alumina e por eluição com soro fisiológico (NaCl 0,9%) apenas o eluato $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ é recolhido em um frasco sob vácuo, enquanto o $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ fica retido na coluna (Figura 7) (OLIVEIRA et al., 2006).

Um gerador ideal deverá ter uma proteção de chumbo para minimizar a exposição à radiação do operador, deverá ser simples, rápido de utilizar e originar eluato isento do radionuclídeo "pai", do material que constitui a coluna, assim como isento de outros possíveis radionuclídeos contaminantes (OLIVEIRA et al., 2006).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais para preparação do RL de MAG3 e MAG3-^{99m}Tc

Tabela 3 - Reagentes utilizados na preparação do RL de MAG3 e de MAG3-^{99m}Tc.

Reagentes	Fórmula molecular	Fabricante	Função
Pertecnetato de sódio	$[\text{Na}^+(\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4)^-]$	IPEN	Material radioativo
Bz-MAG3 ou S-benzoil-MAG-3 (bertiatida)	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	ABX	Princípio ativo
Cloreto estanoso diidratado P.A.	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Química Moderna	Excipiente, agente redutor
Tartarato dissódico diidratado P.A.	$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck Millipore	Pré-quelante
Hidrogenofosfato de sódio P.A.	Na_2HPO_4	Merck Millipore	Estabilizante /Tampão
Cloreto de sódio P.A.	NaCl	Merck Millipore	Excipiente
Ácido clorídrico P.A.	HCl	Merck Millipore	Acerto de pH
Hidróxido de sódio P.A.	NaOH	Merck Millipore	Acerto de pH
Água para injetáveis (API)	H_2O	Irvine Scientific	Diluyente
Gás nitrogênio 5.0	N_2	White Martins	Gás inerte

Tabela 4 - Solventes utilizados no controle radioquímico de MAG3-^{99m}Tc.

Solventes	Fórmula molecular	Fabricante	Função
Acetato de etila (AcOEt)	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Sigma Aldrich	Solvente para cromatografia
Acetonitrila (ACN)	CH_3CN	Merck Millipore	Solvente para cromatografia
Metiletilcetona (MEC)	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	Merck Millipore	Solvente para cromatografia

Tabela 5 - Anestésicos utilizados no controle biológico de MAG3-^{99m}Tc.

Anestésico	Fórmula molecular	Fabricante	Função
Uretana	C ₃ H ₇ NO ₂	Sigma Aldrich	Anestésico
Ketamina	C ₁₃ H ₁₆ NCIO	Sespo	Anestésico
Xilazina	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S	Rhobifarma	Anestésico

5.2 Equipamentos

Tabela 6 - Equipamentos utilizados na preparação e controle de qualidade do RL de MAG3.

Equipamento (Modelo e Fabricante)	Uso
Ponto de fusão Optimelt, SRS; Infravermelho FTL 2000 ABB	Controle físico-químico da matéria-prima
Balança de precisão Mettler Toledo; Micropipetas Eppendorf; Agitador magnético Fisatom; Béqueres de vidro Laborglas; Balão volumétrico Laborglas; pHmetro Orion Thermo Scientific; Frasco de vidro âmbar com rolha de borracha Schott Brasil; tampa de borracha; Lacre; Liofilizador IMA, JMA Edwards.	Preparo das formulações dos Kits de RL de MAG3
Aquecedor tipo bloco seco Hot Pot, Molekuler G.T. Sanayl A.S; Cubas de vidro com tampa, Fitas de iTLC-SG de 10 segmentos Varian; Fitas de papel Whatman 3MM com 10 segmentos; Papel indicador de pH Merck; Eluato de gerador de ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc-IPEN; Contador gama Cobra II Perkin Elmer; Câmara climática PSC022 Gallenkamp Pharmaceutica	Controle de qualidade radioquímico
Camundongos Swiss e Balb/c machos e adultos, com 20 e 30 g, fornecidos pelo biotério do IPEN; Seringas de 0,5 mL descartáveis, Tesouras Golgran, Guilhotina Harvard Apparatus, Frascos de polietileno para contagem da atividade nos órgãos; Pinças Stark Medright; Calibrador de dose Capintec CRC 15R; Gama câmara Nucline TH Mediso, Equipamento micro PET/SPECT/CT Albira	Controle de qualidade biológico
Micropipetas e ponteiras estéreis e apirogênicas, Tubos com meios de cultura TIO e TSB; Fluxo laminar ESCO; Equinox para esterilidade por filtração por membrana, Merck Millipore; Estufas a 22,5 °C e 32,5 °C, Tubos com LAL; Banho a 37 °C.	Controle microbiológico

5.3 Métodos

5.3.1 Identificação da pureza química do reagente Bz-MAG3

As análises de ponto de fusão (PF) e espectro de infravermelho (IV) da matéria-prima Bz-MAG3 produzida pela empresa ABX, foram realizadas no Controle de Qualidade no CR do IPEN.

5.3.2 Preparo do RL de MAG3

Bz-MAG3, tartarato de sódio diidratado, cloreto estanoso diidratado e hidrogeno fosfato de sódio diidratado foram utilizados sem purificação prévia.

Todas as soluções foram preparadas com água API continuamente nitrogenada. Para a obtenção do RL, Bz-MAG3 e tartarato de sódio foram solubilizados em água, e esta mistura foi adicionada à solução de cloreto estanoso e hidrogenofosfato de sódio. O pH foi ajustado com solução de HCl ou NaOH 1N.

Foram preparadas formulações baseadas nas massas de reagentes descritas nas bulas dos RL: formulação produzida pela ROTOP na Europa, representada por (E), formulação produzida pela Mallinckrodt nos EUA, representada por (A), formulação em CUBA pelo CENTIS (C), descrita no Relatório Técnico da Agência Internacional AIEA (IAEA, 2008), e formulação desenvolvida no CR do IPEN, representada por (I).

A solução final foi fracionada, colocando-se 1 mL por frasco. Os frascos foram arrolhados com tampa de borracha, liofilizados conforme programa padrão, e lacrados. Foram separados frascos para os controles microbiológico, radioquímico e biológico, e o restante dos frascos contendo o material liofilizado foi mantido em temperatura de 2-8 °C, para serem utilizados no estudo de estabilidade, durante alguns meses após a fabricação do RL conforme os resultados obtidos.

Figura 8 - Fluxograma das principais etapas do preparo do RL de MAG3.

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos da IAEA (2008).

Foram feitos estudos para avaliar o efeito da massa de cloreto estanoso, pH da preparação final e pH do produto marcado.

5.4 Controles de qualidade

5.4.1 Radiomarcção do MAG3- ^{99m}Tc

Foram realizados ensaios de controles radioquímico e biológico do MAG3 liofilizado marcado com ^{99m}Tc (USP, 2016; WHO, 2008) conforme o fluxograma descrito na Figura 9.

Dois frascos do RL MAG3 foram utilizados para marcação com ^{99m}Tc . Foram reconstituídos com eluato de pertecnetato de sódio obtido de gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN), diluído com NaCl 0,9% para obter volume final de 3 mL. Os frascos de RL foram marcados com baixa e alta atividade, 185 e 3700 MBq (5 e 100 mCi), respectivamente. O aquecimento dos frascos à ebulição foi feito em um equipamento tipo bloco seco durante 15 minutos e depois estes foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos, para dar início aos controles radioquímico e biológico.

Figura 9 - Fluxograma para obtenção de MAG3- ^{99m}Tc para realização de controle de qualidade radioquímico e distribuição biológica.

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos da USP (2016), EP (2014), WHO (2008).

5.4.2 Pureza Radioquímica do MAG3-^{99m}Tc

As impurezas radioquímicas do processo de marcação MAG3-^{99m}Tc são ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻.

Cada impureza apresenta um R_f (fator de retardamento). R_f é definido pela relação entre as distâncias percorridas pela impureza e pelo solvente (Eq. 1) (SAHA, 1998).

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad (\text{Equação 1})$$

O controle da % PRq foi realizado utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), com uso de 2 sistemas: Sistema 1: Metiletilcetona: acetato de etila 60:40 (v/v) em fita de papel iTLC-SG para determinação de ^{99m}TcO₄⁻ em R_f = 1; Sistema 2: Acetonitrila: água 50:50 (v/v) em fita de papel Whatman 3MM para determinação de ^{99m}TcO₂ em R_f = 0 (CHEN et al., 1993).

Após a corrida cromatográfica, as fitas de CCD com 10 segmentos foram secas, cortadas em segmentos de 1 cm de comprimento cada e a radioatividade foi medida (em cpm) em contador gama Perkin Elmer.

A % PRq foi determinada pelo cálculo da % impureza e pela equação de balança de massa, subtraindo de 100 a soma das impurezas (Eq. 2 e 3) (SAHA, 1998). Os resultados foram expressos como média da % PRq ± desvio padrão (DP) considerando-se análises em triplicata de dois frascos (N=6) marcados com atividades baixa e alta, 30, 60 e 240 minutos após a marcação do RL com ^{99m}Tc.

$$\% \text{ Impureza} = \frac{\text{Contagem radioatividade Rf impureza}}{\text{Contagem radioatividade total}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

$$\% \text{ Pureza Radioquímica} = 100 - \text{soma das \% Impurezas} \quad (\text{Equação 3})$$

O pH de ambos os frascos após a marcação com ^{99m}Tc foi verificado com papel indicador de pH após retirada de amostra do último tempo de marcação (240 minutos). O produto marcado também foi avaliado quanto à presença de partículas com a solubilização do RL com NaCl 0,9%.

5.4.3 Controle Biológico

A pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos exigidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde - CONEP/CNS/MS (ANVISA, 2017), com número de projeto 85/11.

Os ensaios de distribuição biológica foram efetuados após certificar que a %PRq de MAG3-^{99m}Tc foi superior a 90%.

Doses de 0,74 MBq (200 uCi)/0,1 mL da atividade mínima ou 129,5 MBq (3500 uCi)/0,1 mL da atividade máxima de marcação foram administrados na cauda do animal por via intravenosa em 6 camundongos Swiss, sendo 3 para cada atividade de marcação (baixa e alta) (FRITZBERG et al., 1986; OKARVI et al., 2002). Após 45 minutos, os animais foram anestesiados para obtenção das imagens cintilográficas na Gama Câmara para pequenos animais e MicroSPECT-CT, e em seguida submetidos à eutanásia e os órgãos retirados para obtenção dos dados foram: rins, fígado e vesícula, estômago, intestino e carcaça. Os parâmetros e limites de %DI nos órgãos na análise da biodistribuição de radiofármaco para avaliação renal estão relacionados na Tabela 7.

No microSPECT-CT, a imagem foi reconstruída com o uso de dois softwares, PMOD e 3D Volview. Na gama câmara para pequenos animais, as imagens foram adquiridas a cada 2 minutos no processo de obtenção de imagem no modo dinâmico.

Tabela 7– Parâmetros e limites de %DI em órgãos na biodistribuição com radiofármaco para avaliação renal.

Parâmetro / Órgãos	Especificação / % DI
Tempo para biodistribuição, após injeção	1 hora, WHO (2008) 30 minutos, IAEA (2008)
Animais	Camundongos, WHO (2008) Ratos, IAEA (2008)
Rins	< 5%, WHO (2008) ≤ 2%, IAEA (2008)
Urina, Bexiga + urina	≥ 80% WHO e IAEA (2008)
Fígado	> 1%, WHO (2008) ≤ 2%, IAEA (2008)

Fonte: IAEA e WHO (2008).

Os órgãos e a carcaça foram colocados em contador tipo poço para contagem da atividade em μCi . A atividade de um padrão preparado no momento da injeção da amostra no animal foi utilizada para cálculo da %DI, considerando-se o decaimento, de acordo com os procedimentos de controle de qualidade do CR do IPEN (USP, 2016; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; WHO, 2008). Os resultados foram expressos como média %DI $\pm$ DP (SAHA, 1998; ROBLES et al., 2003).

5.4.4 Controle de esterilidade e endotoxinas bacterianas

O ensaio de esterilidade foi realizado utilizando método de filtração por membrana com incubação da amostra em meio de cultura TSB em estufa a $22,5 \pm 2,5$ °C, e em meio de cultura de Tioglicolato (TIO) a $32,5 \pm 2,5$ °C, por um período de 14 dias.

O ensaio de endotoxinas bacterianas foi realizado em triplicata pelo método LAL de formação de gel, com diluição de 100 vezes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

5.4.5 Ensaios de Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com um grupo de 10 camundongos machos da linhagem Balb/c, pesando entre 20-30 g, com cerca de dois meses de vida, por um período de 14 dias. A massa de Bz-MAG foi correspondente a 100 vezes a massa administrada normalmente em 0,1mL. Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: respiração, atividade motora, reflexos, sinais oculares (lacrimejamento), fezes, presença ou não de salivação, piloereção, analgesia, tônus musculares, presença de lesão na pele (OGA et al., 2008).

5.4.6 Estudo de estabilidade

Para estabelecer a validade do RL resultante da formulação I de MAG3 desenvolvida neste trabalho, foram preparados e liofilizados lotes I1, I2 e I3, contendo 100 frascos cada lote. A %PRq e a distribuição biológica de cada lote foi

verificada por 9, 8 e 7 meses, para os lotes I1, I2 e I3, respectivamente, sendo os RL marcados com alta atividade, 3700 MBq (100 mCi), em volume final de 3 mL.

As formulações de IP1, IP2, IP3 e IP4 foram liofilizadas, com 230 frascos por lote. A %PRq e a distribuição biológica de cada lote foi verificada por 8, 7, 6 e 4 meses, respectivamente. Os RL foram marcados com alta atividade, 3700 MBq (100 mCi) e baixa atividade 185 MBq (5 mCi), em volume final de 3 mL.

Alguns frascos, na embalagem primária do RL de MAG3 lote IP4 foram segregados, imediatamente após a liofilização e mantidos por 48 horas em 40 °C e 75% de umidade relativa na câmara climática. Após o estudo de estresse, os frascos foram colocados em temperatura controlada de 2-8 °C, e no 4º mês, foram determinadas a % PRq e a distribuição biológica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Resultados dos Ensaios de Identificação de MAG3

Na Tabela 8 encontram-se relacionadas as especificações de Bz-MAG3 descritas no certificado do fabricante ABX e os resultados obtidos no CR-IPEN.

Tabela 8 - Especificações de Bz-MAG3 descritas no certificado da ABX e resultados obtidos no CR-IPEN.

Parâmetro	Método	Especificação	Resultado ABX	Resultado IPEN
Característica física	Aspecto	Cristal Incolor	Conforme	Cristal Incolor
PF (°C)	Temperatura de fusão	192 – 205	191 – 195	191 – 192

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos do fornecedor ABX (2017).

Na avaliação da qualidade do MAG3, os critérios obtidos pela ABX para a aparência física e PF foram atendidos quando os ensaios foram repetidos no IPEN.

A Figura 10 mostra o espectro de IV de Bz-MAG3 obtido no IPEN e a Tabela 9 relaciona as bandas de absorção mais intensas utilizadas para identificar o material.

Figura 10 - Espectro de IV de Bz-MAG3.

Fonte: Infravermelho IPEN (2016).

Tabela 9 – Bandas de absorção (cm⁻¹) no espectro de IV do MAG3 obtido no CR.

Absorções no espectro de IV (cm ⁻¹)		
Atribuições	Especificação ¹	Resultados IPEN
Deformação axial de -N-H	3300	3299,6
Deformação axial de -OH	3100	3090,5
Deformação axial de -N-CH ₂	2850	2297.05
Deformação axial de -C=O de ácido	1700	1703,9
Deformação axial de -NH de amida	1550	1660,3

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos da IAEA (2008).

6.2 Formulações Comerciais de RL de MAG3

Encontram-se comercialmente disponíveis para uso na medicina nuclear, algumas formulações de MAG3, a saber: Mertioscan, produzido pela ROTOP Pharmaka AG, na Alemanha, Technescan produzido pela Mallinckrodt nos Estados Unidos da América (EUA) (NOSCO, 1993), e NefroGBT produzido por CENTIS em Cuba, na América Central, entre outros. A empresa ROTOP produz o RL de MAG3 em vários países da Europa, com nome comercial variado, a saber: Áustria, Portugal (Mertioscan), Bélgica, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Hong Kong, Hungria, Luxemburgo, Suécia Noruega (NephroMAG), Alemanha (MAG-3), Irlanda, Reino Unido (IELMAG3), Itália (MAG3-ROTOP), Suíça (ROTOP-MAG-3).

No Brasil até o momento não existe produção nacional de MAG3 como RL para marcação com ^{99m}Tc .

Na Tabela 10, encontram-se relacionadas algumas formulações com as massas dos reagentes nos respectivos RL.

Tabela 10 - Formulações comerciais de MAG3.

Composição das formulações	Mertioscan(E)	Technescan(A)	NefroGBT(C)
Bz-MAG3 (S-benzoil-MAG-3 ou bertiatida) MAG3 (mertiatide)	0,2 mg	1 mg	0,65 mg
Cloreto de estanho (II) diidratado	0,4 mg	0,05-0,2 mg	0,1 mg
Gluconato de sódio	-	-	16,0 mg
Cloreto de sódio	-	-	5,0 mg
Tartarato de sódio diidratado	16,9 mg	40 mg	-
Hidrogenofosfato de sódio diidratado	-	-	0,95 mg
Solução tampão	Frasco separado	-	
Lactose monoidratada	-	20 mg	-
pH final	7,1 - 7,5	5 - 6	7,5
Volume final	4-10 mL	10 mL	4-5 mL
Atividade máxima de marcação do RL	1520 MBq (33,78 mCi)i	3700 MBq (100 mCi)	1850 MBq (50 mCi)

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos da ROTOP, MALLINCKRODT e CENTIS (2017).

6.3 Formulações iniciais de RL de MAG3

6.3.1 Efeito da massa de cloreto estanoso

Neste trabalho foram preparadas formulações de MAG3 com composição baseada em alguns RL comercialmente disponíveis. Uma das formulações foi baseada nas massas dos reagentes da formulação europeia e foi denominada por E e outra na formulação americana e foi indicada por A (Tabela 10). As preparações foram liofilizadas. A Figura 11 mostra a foto de frascos contendo liofilizados de MAG3.

Figura 11 – Foto de frascos de RL de MAG3, cujas massas dos reagentes foram baseadas na formulação E (lacre amarelo), e formulação A (lacre verde claro).

Fonte: Fotografia do autor.

Entre as diferenças nas formulações, podem-se destacar a massa de cloreto estanoso, do reagente para transquelação, tartarato de sódio, presença de lactose e pH.

Na preparação de ambas as formulações não foi feito o acerto de pH nas etapas intermediárias de adição dos reagentes. O pH foi acertado com solução de NaOH ou HCl 0,1 N para faixa de 5-6 (Tab. 10), valor definido na bula do Technescan, apenas no final da preparação (NOSCO,1993).

Nas preparações E1a e E2a, a massa de cloreto estanoso por frasco foi mantida em 0,4 mg. Na preparação A1 a quantidade do agente redutor foi de 0,1 mg e na A2 foi de 0,4 mg. Os resultados de %PRq das preparações liofilizadas das formulações E e A, após marcação com ^{99m}Tc , estão relacionados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Resultados de %PRq de RL preparados com base na formulação E.

Tempo de marcação (minutos)	% PRq (Média + DP)	
	Formulação E1 ^a	Formulação E2 ^a
	pH 5,3	pH 5,2
30	87,44 ± 2,82	88,08 ± 1,04
60	87,70 ± 2,85	86,95 ± 0,97
120	83,97 ± 3,21	85,20 ± 1,51
240	71,95 ± 5,09	76,61 ± 3,65

N=6; A quantidade de frascos total foi de 100; mSnCl₂ 2H₂O: formulação a) 0,4 mg.

Especificação (USP, 2016): % Pureza Radioquímica ≥ 90%

Tabela 12 – Resultados de %PRq de RL preparados com base na formulação A.

Tempo de marcação (minutos)	% PRq (Média + DP)	
	Formulação A1 ^a	Formulação A2 ^b
	pH 5,3	pH 5,2
30	94,84 ± 0,03	86,66 ± 1,37
60	96,01 ± 0,59	86,48 ± 1,09
120	89,18 ± 1,04	84,54 ± 1,50
240	75,92 ± 5,56	78,75 ± 3,95

N=6; A quantidade de frascos total foi de 100; mSnCl₂ 2H₂O: formulação a) 0,1 mg; b) 0,4 mg.

Especificação (USP, 2016): % Pureza Radioquímica ≥ 90%

A formulação A1 apresentou resultados de %PRq acima de ≥90% nos tempos de 30 e 60 minutos após a marcação com ^{99m}Tc, mas não manteve a estabilidade até 240 minutos. No lote A2, mesmo com o aumento da massa de cloreto estano de 0,1 mg para 0,4 mg, em todos os tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos, os resultados de %PRq apresentaram-se abaixo da especificação de 90%. No caso da formulação A1, quando a massa de cloreto estano por frasco foi de 0,1 mg, a %PRq ficou abaixo de 90% devido ao aumento da %^{99m}TcO₄⁻. Com o aumento da massa para 0,4 mg, houve aumento da %^{99m}TcO₂, indicando que existe uma massa de agente redutor ótima para se obter resultado que atenda ao especificado.

Os resultados de %PRq das formulações E e A foram considerados insatisfatórios, abaixo de 90% (USP 39, 2016).

Outro fator que pode ter influenciado a %PRq e a estabilidade da marcação dos RL E1a, E1b, A1a e A1b foi a preparação da solução de cloreto estânico. Nesta etapa do trabalho, utilizou-se preparação do reagente em HCl mol L^{-1} , e posteriormente passou-se a utilizar 1 mL da solução nitrogenada, para evitar a oxidação de Sn(II) a Sn(IV) . Outros fatores como ordem de adição dos reagentes, tempo de homogeneização, pH das etapas de preparação, tempo de fracionamento, tempo de liofilização, armazenamento e temperatura também podem influenciar a estabilidade da marcação dos RL.

6.3.2 Efeito do pH final da formulação

A apresentação do RL da Rotop é composta por 2 frascos, sendo que 1 frasco contém 0,2 mg do reagente MAG3 (mertiatida) e 1 frasco contém 2,5 mL de tampão fosfato. A composição exata dos reagentes não é descrita, mas esta informação indica que há acerto de pH no momento da marcação do RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ROTOP, 2017).

Para avaliar o efeito do pH final na marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, foram feitos testes com a formulação A1. Em um frasco de solução de NaCl 0,9% contendo 6 mL, teve o pH alterado de 6 para 12, pela adição de solução de NaOH 1 mol/L para ser utilizado para acerto do pH da formulação, antes da marcação do RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Após o aquecimento do RL para a marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o pH do produto marcado foi medido. Os resultados de %PRq e pH estão indicados na Tabela 13.

Tabela 13 - Efeito do pH na %PRq da formulação A.

Tempo de marcação (minutos)	%PRq (Média + DP)	
	Formulação A1 ^a	Formulação A1 ^a
	Produto Marcado pH 8	Produto Marcado pH 9
30	92,11 ± 1,79	99,71 ± 0,03
60	91,18 ± 2,99	98,81 ± 0,32
120	95,93 ± 0,68	93,71 ± 0,07
240	NR	96,99 ± 0,40

N=6; a quantidade total de frascos foi de 100; m $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: formulação a) 0,4 mg.

Especificação (USP, 2016): % Pureza Radioquímica $\geq 90\%$.

Os resultados de %PRq foram superiores a 90%, até 4 horas, em ambos os frascos (Tabela 13) de RL que tiveram o pH alterado pela adição de solução de NaCl 0,9% com pH 12, ajustado com NaOH 1 mol/L antes da marcação com ^{99m}Tc . Este fato indicou que o pH é um dos fatores críticos na obtenção do RL e na estabilidade de marcação.

Para verificação do efeito de pH, foram feitas duas preparações não liofilizadas baseadas na formulação de Cuba (C). Em uma das preparações, o pH foi de 9,0, e em outra foi de 9,5. Foi realizado teste de marcação com ^{99m}Tc e o ensaio de %PRq. Após 4 horas de marcação, o pH foi novamente verificado e os resultados estão indicados na Tabela 14.

Tabela 14 - Efeito do pH na %PRq da formulação C.

Tempo de marcação (minutos)	% PRq (Média + DP)	
	Formulação C1 ^a	Formulação C1 ^a
	Antes da marcação pH 9	Antes da marcação pH 9,5
	Pós-marcação pH 8	Pós-marcação pH 7,5
30	84,34 ± 0,60	99,10 ± 0,03
60	85,35 ± 0,27	99,07 ± 0,07
120	80,64 ± 3,34	98,43 ± 0,22
240	84,33 ± 0,54	96,59 ± 0,61

N=6; a quantidade total de frascos foi de 100; m $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: formulação a) 0,1 mg.
Especificação (USP, 2016): % Pureza Radioquímica $\geq 90\%$.

Observou-se variação do pH inicial durante o período de estabilidade de marcação. A formulação C com pH 9,0 apresentou %PRq abaixo de 90%, enquanto que a preparação em pH 9,5 foi acima de 99% após 30 minutos, mantendo-se em 96% após 4 horas de marcação (Tabela 14).

Os resultados relacionados nas Tabelas anteriores indicaram que é importante controlar o valor de pH da formulação final antes da marcação com ^{99m}Tc para obter valores de %PRq que atendam à especificação.

Considerando-se que a formulação C atendeu à especificação de % PRq e manteve estabilidade da marcação até 4 horas, foi feito o controle biológico para avaliar a biodistribuição em animais. Os resultados de %PRq e biodistribuição encontram-se relacionados na Tabela 15.

Não se encontra descrito na Farmacopeia Americana (USP, 2016) e na Farmacopeia europeia (EP, 2014), um método de controle biológico para o MAG3- ^{99m}Tc . A Farmacopeia Internacional (WHO, 2008) e a publicação da Agência Internacional AIEA Technical Report Series nº 466 Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits (IAEA, 2008) apresentam valores de referência de distribuição biológica. Ambos estabeleceram que a %DI bexiga + urina deve ser maior ou igual a 80%, mas a WHO (2008) estabelece que %DI rins deve ser menor que 5% e a %DI fígado deve ser maior que 1%. Este limite deve estar com erro de interpretação, pois se espera que a captação no fígado seja mínima. Na publicação da Agência Internacional (AIEA, 2008), a %DI nos rins deve ser menor que 2% e a %DI fígado pode ser maior, entre 2 e 5%. O trabalho de Okarvi et al. (2002) indicou valores de %DI de 2% para ambos os órgãos, quando o estudo foi feito com camundongos.

Tabela 15 - Resultados de %PRq e distribuição biológica da formulação C.

Tempo de marcação (minutos)	%PRq (Média + DP)	Distribuição biológica	
		% DI Órgão (Média + DP)	
30	99,58 ± 0,07	Rins	1,76 ± 0,13
60	99,43 ± 0,07	Fígado	2,42 ± 0,62
120	98,81 ± 1,17	Carcça	2,89 ± 0,55
240	97,55 ± 1,36	Bexiga + Urina	92,09 ± 1,39

Os valores de %PRq atenderam ao especificado até 4 horas após a marcação da formulação C de MAG3 com ^{99m}Tc . O valor de pH manteve-se estável em 7,5, conforme o valor estabelecido pelo fabricante, durante o período de 4 horas. Os resultados de distribuição biológica em camundongos Swiss (Figura 12) atenderam ao especificado para %DI bexiga+urina $\geq 80\%$ e rins $< 5\%$, estabelecidos pela WHO (2008).

Figura 12 – Foto de camundongos Swiss utilizados na distribuição biológica na formulação C.

Fonte: Fotografia do autor.

Os resultados de $\%PRq \geq 90\%$ e de distribuição biológica obtidos com a formulação C foram importantes para a definição das massas dos reagentes da formulação I de MAG3, que estão relacionados na Tabela 16.

Tabela 16 – Composição da formulação I de MAG3 e parâmetros de marcação com ^{99m}Tc .

Composição da formulação I e parâmetros de marcação com ^{99m}Tc	
Reagentes	Massas
MAG3	1 mg
Cloreto de estanho (II) diidratado	0,1 mg
Tartarato de sódio diidratado	40 mg
Hidrogenofosfato de sódio diidratado	0,14 mg
pH da formulação I após a marcação com ^{99m}Tc	7,1 – 7,5
Atividade máxima de marcação com ^{99m}Tc	3700 MBq (100 mCi)
Volume de marcação (mL)	3

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos ROTOP, MALLINCKRODT e CENTIS (2017).

6.4 Estudo de estabilidade do RL de MAG3 lotes I1, I2 e I3

A Figura 13 mostra a foto de frascos contendo RL preparado conforme formulação I de MAG3.

Figura 13 – Foto de frascos de RL de MAG3 lotes I1, I2 e I3, da esquerda para direita, respectivamente.

Fonte: Fotografia do autor.

No estudo de estabilidade, a %PRq e a distribuição biológica do lote I1 foram avaliadas por 9 meses, o lote I2, por 8 meses e o lote I3, por 7 meses. Os 3 lotes do RL de MAG3 foram marcados utilizando-se a atividade máxima de 3700 MBq (100 mCi) de ^{99m}Tc e volume final de 3 mL. Os resultados de % PRq e % DI dos lotes I1, I2 e I3 estão relacionados nas Tabelas 17 a 22 e nas Figuras 14 a 17.

Tabela 17 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	7º mês	9º mês
30	97,71 ± 0,13	98,02 ± 0,19	97,83 ± 0,35	99,08 ± 0,15	99,35 ± 0,21	97,90 ± 0,14	96,02 ± 0,84	97,97 ± 0,01
60	97,82 ± 0,05	97,14 ± 0,22	96,32 ± 0,44	99,20 ± 0,08	98,77 ± 0,10	96,85 ± 1,26	94,21 ± 0,60	97,36 ± 0,22
120	96,70 ± 0,50	94,02 ± 1,41	93,56 ± 0,56	99,09 ± 0,11	98,22 ± 0,69	97,19 ± 0,39	96,98 ± 0,06	96,98 ± 0,40
240	91,71 ± 1,59	95,15 ± 0,64	92,90 ± 1,26	96,11 ± 1,15	95,68 ± 0,77	92,26 ± 0,20	95,89 ± 0,33	95,15 ± 0,78

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 14 – Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 17.

Tabela 18 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 9 meses, do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	7º mês	9º mês
Rins	1,37 ± 0,31	1,72 ± 0,22	1,72 ± 0,12	1,53 ± 0,34	1,01 ± 0,17	2,47 ± 0,66	1,33 ± 0,72	1,65 ± 0,12
Fígado	1,17 ± 0,29	1,29 ± 0,06	1,32 ± 0,32	1,54 ± 0,69	1,03 ± 0,25	1,67 ± 0,23	1,60 ± 0,04	0,69 ± 0,05
Estômago	0,05 ± 0,04	0,20 ± 0,09	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,06	0,08 ± 0,00	0,34 ± 0,06	0,61 ± 0,30	0,12 ± 0,01
Intestino	7,26 ± 1,69	5,19 ± 0,59	7,42 ± 3,16	9,82 ± 0,41	6,43 ± 0,62	11,31 ± 2,28	11,91 ± 1,41	6,37 ± 2,29
Carcaça	2,47 ± 0,54	1,68 ± 0,06	1,97 ± 0,52	1,95 ± 0,27	2,35 ± 0,50	2,94 ± 0,46	2,74 ± 1,57	2,96 ± 0,32
Bexiga	87,69 ± 2,35	89,93 ± 0,71	87,46 ± 3,51	85,06 ± 0,46	89,11 ± 0,42	81,27 ± 1,78	81,81 ± 1,96	88,21 ± 2,60
Bexiga + urina	89,06 ± 2,10	91,65 ± 0,75	89,18 ± 3,47	86,59 ± 0,12	90,12 ± 0,58	83,74 ± 2,43	83,14 ± 2,48	89,86 ± 2,66

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008).

Figura 15 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 9 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 18.

Tabela 19 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)						
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	6º mês	8º mês
30	98,48±	97,89 ±	97,57 ±	98,19 ±	98,36 ±	97,96 ±	97,74 ±
	0,13	0,09	0,44	0,10	0,19	0,07	0,06
60	97,73±	97,32 ±	96,91 ±	97,87 ±	98,07 ±	97,80 ±	98,28 ±
	0,35	0,15	0,71	0,15	0,19	0,09	0,07
120	94,46 ±	95,92 ±	93,31 ±	96,89 ±	95,59 ±	96,65 ±	95,41 ±
	0,60	1,42	0,93	1,12	0,38	0,18	0,04
240	96,56 ±	95,49 ±	90,71 ±	95,10 ±	92,21 ±	94,53 ±	96,04 ±
	1,91	0,28	4,13	0,49	0,09	0,18	0,07

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 16 - Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 19.

Tabela 20 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)						
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	6º mês	8º mês
Rins	1,75 ± 0,11	1,39 ± 0,41	1,59 ± 0,49	1,46 ± 0,22	1,21 ± 0,18	1,54 ± 0,46	1,56 ± 0,37
Fígado	1,51 ± 0,23	0,86 ± 0,19	1,12 ± 0,34	0,78 ± 0,26	1,03 ± 0,21	1,02 ± 0,29	0,88 ± 0,09
Estômago	0,32 ± 0,20	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,08	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,18 ± 0,14
Intestino	11,72 ± 2,05	5,65 ± 0,1	7,90 ± 0,85	9,29 ± 3,79	8,94 ± 0,96	8,55 ± 2,38	4,49 ± 0,84
Carcaça	3,30 ± 0,19	2,18 ± 3,33	1,80 ± 0,24	1,43 ± 0,11	1,82 ± 0,15	2,63 ± 0,48	1,78 ± 0,22
Bexiga	81,41 ± 0,19	89,86 ± 2,33	87,55 ± 1,24	86,92 ± 0,89	86,92 ± 0,81	86,21 ± 3,14	91,09 ± 0,98
Bexiga + urina	83,16 ± 1,45	91,25 ± 2,39	89,14 ± 0,77	88,38 ± 0,72	88,12 ± 0,75	87,75 ± 2,81	92,66 ± 0,64

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008).

Figura 17 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 20.

Tabela 21 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)					
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	5º mês	7º mês
30	98,16 ±	97,83 ±	98,68 ±	99,11 ±	97,91 ±	98,20 ±
	0,18	0,16	0,03	0,17	0,43	0,17
60	98,20 ±	98,09 ±	98,50 ±	99,09 ±	97,95 ±	96,39 ±
	0,55	0,35	0,44	0,12	0,44	1,70
120	96,14 ±	97,62 ±	98,71 ±	98,01 ±	97,39 ±	96,02 ±
	0,56	0,85	0,05	0,21	0,36	0,60
240	95,82 ±	94,53 ±	96,75 ±	96,14 ±	97,44 ±	95,80 ±
	1,60	1,03	0,27	0,52	0,23	0,82

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 18 - Gráfico dos resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 21.

Tabela 22 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)					
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	5º mês	7º mês
Rins	3,09 ± 0,56	2,59 ± 0,42	2,66 ± 0,21	1,73 ± 0,10	3,82 ± 0,47	1,54 ± 0,09
Fígado	1,62 ± 0,06	1,61 ± 0,17	1,65 ± 0,16	1,28 ± 0,25	2,44 ± 0,59	1,60 ± 0,47
Estômago	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,10	0,19 ± 0,09	0,44 ± 0,36	0,13 ± 0,05	0,14 ± 0,09
Intestino	11,10 ± 0,57	7,42 ± 0,50	10,33 ± 2,94	9,40 ± 0,91	12,11 ± 1,79	5,64 ± 1,00
Carcaça	3,74 ± 0,24	2,32 ± 0,24	2,21 ± 0,57	2,00 ± 0,21	2,95 ± 0,09	2,29 ± 0,35
Bexiga	80,27 ± 0,28	85,89 ± 0,37	82,96 ± 2,89	85,16 ± 1,06	78,54 ± 2,88	88,79 ± 1,31
Bexiga + urina	83,36 ± 0,29	88,48 ± 0,35	85,62 ± 3,02	86,88 ± 0,98	82,37 ± 2,43	90,33 ± 1,22

Especificação: % DI Rins $\leq$ 2%, Bexiga e urina $\geq$ 80% e Fígado $\leq$ 2%, (IAEA, 2008).

Figura 19 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do RL de MAG3 lote I3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc (3700 MBq ou 100 mCi), obtidos no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 22.

Os resultados de estabilidade, em que estão incluídas a %PRq e a distribuição biológica dos lotes I1, I2 e I3 apresentados nas Tabelas 17 a 22, atenderam ao especificado pelas farmacopeias (USP, 2016; EP, 2014; WHO, 2008).

Os resultados de %PRq foram acima de 90% até 240 minutos após a marcação do RL com ^{99m}Tc , durante todo o período de acompanhamento. Na distribuição biológica, os lotes I1, I2 atenderam aos valores especificados de %DI para rins, bexiga + urina e fígado; o lote I3 apresentou no 3º e 7º mês, valores de %DI nos rins acima de 2%.

6.5 Preparação e Controle dos Lotes Pilotos IP1, IP2 e IP3

Diante dos resultados de controle radioquímico e distribuição biológica dos lotes I1, I2 e I3 que atenderam ao especificado, foram preparadas 3 novas formulações de MAG3, IP1, IP2 e IP3, que foram liofilizadas, gerando 230 frascos de cada lote. Nos 3 lotes Pilotos (IP), foram realizados o ensaio de solubilidade, controle microbiológico, teste de endotoxinas bacterianas, e também o estudo de toxicidade aguda.

A Figura 20 mostra a foto de frascos de RL dos lotes IP1, IP2 e IP3, com pastilha circular bem definida que foram preparados com formulação I desenvolvida neste trabalho.

Figura 20 – Foto de frascos de RL de MAG3 lotes IP1, IP3 e IP2.

Fonte: Fotografias do autor.

6.5.1 Resultados de esterilidade e endotoxinas bacterianas de RL de MAG3 lotes IP1, IP2 e IP3

Os resultados de controle microbiológico encontram-se descritos a seguir.

Após a reconstituição de 3 frascos de RL de MAG3 com 3 mL de NaCl 0,9%, a solução apresentou-se com aspecto límpido, incolor e ausência de partículas.

O ensaio de esterilidade por filtração por membrana em sistema fechado Millipore foi realizado com 10 frascos, para lote com 230 frascos do RL de MAG3. Após 14 dias de incubação dos meios de cultura TIO e TSB em estufas com temperatura controlada em 32,5 °C e 22,5 °C, respectivamente, não foi observado crescimento microbiano.

No ensaio de endotoxinas bacterianas pelo método de formação de gel, a amostra diluída de 100 vezes foi incubada durante 60 minutos em banho-maria com temperatura controlada de 37 °C e não houve formação de gel nas condições analisadas.

6.5.2 Estudo de Toxicidade Aguda de Bz-MAG3

Para realizar os estudos de toxicidade aguda, foi calculada a massa de Bz-MAG3 correspondente a 100 vezes àquela utilizada na formulação I. 0,1 mL de uma solução contendo 100 vezes a massa de Bz-MAG3 frio (sem atividade de marcação), foram injetados em cada um dos 10 camundongos da raça Balb/c. Após 10 dias de observação e avaliação, não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos (respiração, atividade motora, reflexos, sinais oculares (lacrimejamento), fezes, salivação, piloereção, analgesia, tônus musculares, presença de lesão na pele).

6.5.3 Resultados de %PRq e %DI dos Kits RL de MAG3 lotes IP1, IP2 e IP3

Os lotes de RL de MAG3 IP1, IP2 e IP3 foram marcados com atividade baixa de 185 mBq (5 mCi) e atividade alta de 3700 MBq (100 mCi) de ^{99m}Tc em 3 mL de volume final e os resultados de %PRq e distribuição biológica durante 8 meses estão apresentados nas Tabelas 23 a 34 e nas Figuras 21 a 30.

Tabela 23 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	8º mês
30	97,73 ± 0,13	97,21 ± 0,46	96,79 ± 0,04	96,75 ± 0,07	97,64 ± 0,22	96,85 ± 0,06	98,12 ± 0,28	96,95 ± 0,01
60	96,62 ± 0,33	97,62 ± 0,05	96,48 ± 0,19	96,89 ± 0,06	97,36 ± 0,76	96,80 ± 0,16	98,04 ± 0,10	97,02 ± 0,13
120	96,64 ± 0,19	96,57 ± 0,35	95,91 ± 0,15	96,47 ± 0,35	97,38 ± 0,57	96,56 ± 0,42	97,93 ± 0,11	97,19 ± 0,49
240	97,22 ± 0,53	97,23 ± 0,17	93,88 ± 0,28	97,20 ± 0,34	97,35 ± 0,51	96,72 ± 0,27	97,93 ± 0,13	97,11 ± 0,29

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 21 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 23.

Tabela 24 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	8º mês
Rins	1,48 ± 0,37	1,40 ± 0,26	2,39 ± 0,23	2,07 ± 0,30	1,60 ± 0,15	1,50 ± 0,15	1,58 ± 0,27	2,17 ± 0,10
Fígado	0,98 ± 0,31	0,67 ± 0,18	1,12 ± 0,35	1,05 ± 0,18	1,08 ± 0,29	1,03 ± 0,13	0,57 ± 0,06	1,22 ± 0,05
Estômago	0,22 ± 0,11	0,20 ± 0,17	0,26 ± 0,14	0,09 ± 0,04	0,32 ± 0,32	0,36 ± 0,17	0,94 ± 0,17	0,25 ± 0,03
Intestino	7,91 ± 2,46	6,44 ± 0,62	8,21 ± 2,65	6,43 ± 0,84	7,88 ± 1,01	7,08 ± 0,44	8,24 ± 1,28	6,12 ± 1,14
Carcaça	2,20 ± 0,39	1,74 ± 0,08	3,28 ± 0,25	3,23 ± 0,49	2,22 ± 0,23	2,01 ± 1,25	1,99 ± 0,09	2,78 ± 0,19
Bexiga	87,21 ± 3,57	89,55 ± 0,30	84,73 ± 1,80	87,12 ± 1,64	86,82 ± 1,31	87,94 ± 1,83	86,68 ± 1,64	87,46 ± 1,40
Bexiga + urina	88,69 ± 3,20	90,95 ± 0,42	87,13 ± 2,03	89,19 ± ±1,44	88,50 ± ±1,26	89,51 ± ±1,77	88,26 ± ±1,44	89,63 ± ±1,36

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008).

Figura 22 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 24.

Tabela 25 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	8º mês
30	97,97	97,06	95,82	95,71	96,49	97,29	96,29	96,11
	± 0,13	± 0,06	± 0,38	± 0,12	± 0,32	± 0,09	± 0,23	± 0,12
60	98,09	96,81	96,17	95,71	97,18	97,13	96,02	96,22
	± 0,23	± 0,05	± 0,19	± 0,13	± 0,39	± 0,12	± 0,06	± 0,11
120	97,22	95,63	95,51	96,08	95,10	97,27	96,12	96,23
	± 0,31	± 0,25	± 0,33	± 0,14	± 1,19	± 0,21	± 0,13	± 0,31
240	97,26	96,40	94,06	96,03	96,26	96,93	96,15	95,57
	± 0,30	± 0,29	± 0,32	± 0,24	± 0,21	± 0,29	± 0,13	± 0,63

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 23 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 25.

Tabela 26 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP1, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)							
	Início	1ºmês	2ºmês	3ºmês	4ºmês	5ºmês	6ºmês	8ºmês
Rins	2,26 ± 0,33	2,66 ± 0,84	2,40 ± 0,22	2,69 ± 0,56	2,10 ± 0,38	2,31 ± 0,46	2,61 ± 0,09	2,48 ± 0,19
Fígado	1,29 ± 0,11	1,36 ± 0,32	1,25 ± 0,40	1,14 ± 0,21	1,35 ± 0,38	1,24 ± 0,11	1,43 ± 0,10	1,41 ± 0,06
Estômago	0,71 ± 0,33	0,44 ± 0,42	0,06 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,48 ± 0,49	0,16 ± 0,01	0,42 ± 0,26	0,26 ± 0,17
Intestino	8,07 ± 1,81	6,77 ± 0,08	8,69 ± 1,23	4,52 ± 1,04	5,52 ± 1,20	7,43 ± 1,92	9,10 ± 1,93	9,65 ± 1,11
Carcaça	2,56 ± 0,13	2,91 ± 0,23	3,21 ± 0,52	4,13 ± 1,24	2,93 ± 0,67	2,64 ± 0,03	2,84 ± 0,11	3,28 ± 0,04
Bexiga	85,11 ± 1,65	85,86 ± 0,53	84,38 ± 0,43	87,46 ± 1,51	87,63 ± 1,00	86,22 ± 2,35	83,60 ± 2,00	82,92 ± 0,97
Bexiga + urina	87,37 ± 1,72	88,52 ± 0,40	86,78 ± 0,46	90,15 ± 0,96	89,73 ± 1,09	88,53 ± 1,91	86,20 ± 1,90	85,40 ± 0,94

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008).

Figura 24 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 8 meses do RL de MAG3 lote IP1 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 26.

Tabela 27 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
30	98,71± 0,07	98,40 ± 0,34	97,99 ± 0,41	98,34 ± 0,11	98,24 ± 0,19	98,73 ± 0,07	98,16 ± 0,06	98,16 ± 0,14
60	98,41± 0,12	98,35 ± 0,05	97,66 ± 0,09	98,12 ± 0,15	97,96 ± 0,19	98,70 ± 0,09	98,31± 0,07	97,88 ± 0,06
120	98,97 ± 0,35	97,74 ± 0,26	97,20 ± 0,29	96,75 ± 1,27	97,91 ± 0,38	98,29 ± 0,18	98,32 ± 0,04	98,23 ± 0,03
240	97,80 ± 0,21	94,96 ± 0,46	96,06 ± 0,77	97,86 ± 0,39	98,35 ± 0,09	98,35 ± 0,18	98,56 ± 0,07	98,01 ± 0,19

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 25 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 27.

Tabela 28 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 8 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
Rins	1,37 ± 0,29	1,84 ± 0,17	1,40 ± 0,05	0,94 ± 0,11	1,12 ± 0,13	1,23 ± 0,04	1,31 ± 0,08	1,22 ± 0,01
Fígado	1,02 ± 0,33	0,80 ± 0,19	0,78 ± 0,05	0,85 ± 0,31	0,70 ± 0,05	1,21 ± 0,11	1,09 ± 0,09	1,00 ± 0,13
Estômago	0,57 ± 0,08	0,23 ± 0,19	0,34 ± 0,04	0,17 ± 0,14	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,03	0,19 ± 0,12	0,07 ± 0,03
Intestino	6,34 ± 0,30	10,61 ± 0,1	6,82 ± 0,84	9,10 ± 2,57	8,74 ± 1,71	7,84 ± 0,76	9,51 ± 0,33	6,74 ± 0,56
Carcaça	1,42 ± 0,16	2,49 ± 3,33	1,60 ± 0,08	1,39 ± 0,29	1,86 ± 0,31	1,78 ± 0,13	1,72 ± 0,15	2,31 ± 0,29
Bexiga	89,29 ± 0,90	84,02 ± 2,33	89,05 ± 0,69	87,55 ± 3,26	87,49 ± 2,09	87,86 ± 0,62	86,17 ± 0,41	88,65 ± 0,41
Bexiga + urina	90,66 ± 0,64	85,88 ± 2,39	90,45 ± 0,74	88,49 ± 3,16	88,62 ± 1,97	89,09 ± 0,63	87,48 ± 0,42	89,88 ± 0,40

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008)

Figura 26 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 28.

Tabela 29 - Resultados do estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

Tempo (min.)	% Pureza Radioquímica (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
30	98,25 ± 0,03	98,12 ± 0,11	98,51 ± 0,01	98,78 ± 0,08	97,99 ± 0,02	98,03 ± 0,07	98,03 ± 0,19	97,95 ± 0,14
60	98,16 ± 0,08	97,82 ± 0,17	98,34 ± 0,08	98,73 ± 0,06	97,89 ± 0,11	98,10 ± 0,08	98,27 ± 0,03	97,95 ± 0,03
120	98,09 ± 0,25	97,76 ± 0,39	97,22 ± 0,61	98,14 ± 0,45	97,64 ± 0,26	97,79 ± 0,20	98,00 ± 0,30	98,18 ± 0,10
240	97,49 ± 0,43	97,07 ± 0,58	96,94 ± 0,25	98,26 ± 0,39	98,28 ± 0,16	97,94 ± 0,21	98,25 ± 0,02	98,23 ± 0,19

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 27 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 29.

Tabela 30 - Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 7 meses, do RL de MAG3 lote IP2, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)							
	Início	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
Rins	1,87 ± 0,06	1,45 ± 0,13	1,18 ± 0,26	1,06 ± 0,13	1,22 ± 0,24	1,79 ± 0,06	1,42 ± 0,02	1,13 ± 0,04
Fígado	1,25 ± 0,36	0,93 ± 0,24	0,66 ± 0,03	0,79 ± 0,12	0,82 ± 0,23	1,55 ± 0,35	0,87 ± 0,28	1,22 ± 0,05
Estômago	0,57 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,08	0,51 ± 0,09	0,07 ± 0,04	0,01 ± 0,01
Intestino	0,46 ± 1,19	9,01 ± 0,82	6,72 ± 0,26	9,01 ± 1,61	6,81 ± 1,31	7,51 ± 1,14	4,34 ± 0,80	6,70 ± 0,11
Carcaça	2,09 ± 0,24	1,85 ± 0,28	1,81 ± 0,13	1,54 ± 0,16	1,59 ± 0,07	2,19 ± 0,09	2,71 ± 0,10	2,80 ± 0,21
Bexiga	85,74 ± 1,69	86,73 ± 1,10	89,53 ± 0,53	87,55 ± 1,24	89,37 ± 1,23	86,45 ± 1,45	90,60 ± 1,14	88,12 ± 0,30
Bexiga + urina	87,61 ± 1,66	88,18 ± 1,01	90,71 ± 0,31	88,60 ± 1,36	90,59 ± 1,03	88,24 ± 1,41	92,01 ± 1,16	89,26 ± 0,28

Especificação: % DI Rins $\leq 2\%$, Bexiga e urina $\geq 80\%$ e Fígado $\leq 2\%$, (IAEA, 2008).

Figura 28 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 7 meses do RL de MAG3 lote IP2 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 30.

Tabela 31 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

% Pureza Radioquímica (Média + DP)						
Tempo (min.)	Início	1º mês	2º mês	4º mês	5º mês	6º mês
30	99,20 ±	99,40 ±	99,27 ±	99,46 ±	99,13 ±	99,40 ±
	0,07	0,08	0,02	0,04	0,05	0,05
60	99,21 ±	99,18 ±	99,41 ±	99,40 ±	99,14 ±	99,39 ±
	0,06	0,29	0,03	0,03	0,04	0,03
120	98,49 ±	99,34 ±	99,20 ±	99,45 ±	99,13 ±	99,37 ±
	0,28	0,09	0,11	0,05	0,03	0,04
240	98,14 ±	99,07 ±	98,70 ±	98,91 ±	98,74 ±	99,19 ±
	0,54	0,13	0,39	0,36	0,09	0,03

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016)

Figura 29 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 31.

Tabela 32 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com alta atividade de ^{99m}Tc , 3700 MBq (100 mCi).

Órgão	%DI (Média + DP)					
	Início	1º mês	2º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Rins	0,65 ± 0,29	0,43 ± 0,15	1,15 ± 0,21	1,36 ± 0,12	0,58 ± 0,12	0,65 ± 0,06
Fígado	0,65 ± 0,21	0,43 ± 0,08	0,74 ± 0,07	0,58 ± 0,17	0,89 ± 0,12	0,70 ± 0,00
Estômago	0,32 ± 0,20	0,10 ± 0,10	0,30 ± 0,09	0,22 ± 0,12	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,02
Intestino	6,35 ± 1,35	7,74 ± 0,54	5,46 ± 0,69	6,96 ± 0,90	6,45 ± 1,37	6,09 ± 1,53
Carcaça	0,96 ± 0,16	0,80 ± 0,18	2,12 ± 0,47	1,07 ± 0,17	1,03 ± 0,04	1,24 ± 0,04
Bexiga	91,07 ± 1,30	90,50 ± 0,58	90,24 ± 1,26	89,82 ± 0,59	91,00 ± 1,30	91,21 ± 1,62
Bexiga + urina	91,72 ± 1,01	90,93 ± 0,57	91,39 ± 1,12	91,18 ± 0,71	91,57 ± 1,41	91,86 ± 1,56

Especificação: % DI Rins $\leq$ 2%, Bexiga e urina $\geq$ 80% e Fígado $\leq$ 2%, (IAEA, 2008).

Figura 30 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 32.

Tabela 33 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

% Pureza Radioquímica (Média + DP)						
Tempo (min.)	Início	1º mês	2º mês	4º mês	5º mês	6º mês
30	99,17 ± 0,10	99,11 ± 0,06	99,08 ± 0,11	99,21 ± 0,06	99,09 ± 0,11	98,68 ± 0,10
60	99,23 ± 0,08	99,07 ± 0,18	99,32 ± 0,08	99,23 ± 0,06	99,11 ± 0,04	98,70 ± 0,03
120	99,69 ± 0,20	99,12 ± 0,11	99,28 ± 0,04	99,24 ± 0,08	99,08 ± 0,06	98,59 ± 0,06
240	98,85 ± 0,20	98,71 ± 0,38	98,31 ± 0,20	98,67 ± 0,06	98,83 ± 0,09	98,62 ± 0,51

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$, (USP, 2016).

Figura 31 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 33.

Tabela 34 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 6 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

Órgãos	%DI (Média + DP)					
	Início	1º mês	2º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Rins	0,57 ± 0,13	0,66 ± 0,13	0,85 ± 0,13	0,53 ± 0,04	0,57 ± 0,02	1,05 ± 0,05
Fígado	0,77 ± 0,26	0,64 ± 0,11	1,06 ± 0,07	0,85 ± 0,16	0,79 ± 0,25	0,81 ± 0,08
Estômago	0,20 ± 0,05	0,23 ± 0,27	0,27 ± 0,13	0,09 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,24 ± 0,07
Intestino	7,70 ± 0,59	3,93 ± 0,74	6,52 ± 0,32	8,39 ± 0,25	5,90 ± 1,60	6,58 ± 0,59
Carcaça	1,39 ± 0,83	1,09 ± 0,19	2,10 ± 0,51	2,04 ± 0,35	1,07 ±0,31	2,27 ± 0,23
Bexiga	89,37 ± 1,27	93,45 ± 1,27	89,19 ± 0,14	88,11 ± 0,39	91,65 ± 1,69	89,05 ± 0,54
Bexiga + urina	89,94 ± 1,20	94,11 ± 1,17	90,05 ± 0,01	88,64 ± 0,40	92,23 ± 1,71	90,10 ± 0,49

Especificação: % DI Rins $\leq$ 2%, Bexiga e urina $\geq$ 80% e Fígado $\leq$ 2%, (IAEA, 2008).

Figura 32 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 34.

Os resultados de estabilidade de % PRq e a distribuição biológica dos lotes IP1, IP2 e IP3 apresentados nas Tabelas 23 a 34, atenderam ao especificado pelas farmacopeias (USP, 2016; EP, 2014 e WHO, 2008), igualmente ao que havia sido observado quando lotes (I1, I2 e I3) com quantidades menores de frascos foram preparados. Os resultados de %PRq foram acima de 90% em até 240 minutos após a marcação do RL com ^{99m}Tc , durante todo o período de acompanhamento. Na distribuição biológica, o lote IP1 marcado com alta atividade (3700 MBq ou 100 mCi), a %DI nos rins no 2º, 3º e 8º meses foi acima de 2%, menor do que o valor especificado por WHO (2008) e maior do que o valor estabelecido pela IAEA (2008), que é menor ou igual a 2%. Valores de %DI nos rins acima de 2%, porém abaixo do limite especificado de 5% estabelecido pela WHO (2008) também foram observados entre o início da estabilidade até o 8º mês para o lote IP1 quando a atividade de marcação foi baixa (185 MBq ou 5 mCi). Este fato indicou que provavelmente na preparação do lote IP1 pode ter havido alguma ocorrência que não foi caracterizada, fazendo com que a eliminação do radiofármaco se tornasse mais lenta, e ao final de 45 minutos a %DI ficasse acima de 2%. Os resultados de distribuição biológica dos lotes IP2 e IP3 atenderam aos limites de especificação estabelecidos por WHO e IAEA (2008).

6.6 Avaliação do pH de marcação na estabilidade do RL de MAG3 lotes IP4

Para avaliar o efeito do pH da preparação do RL no pH do produto final e na estabilidade da formulação I, foi preparado o lote IP4.

Procurou-se ajustar o pH da formulação a fim de obter pH final de 7,5, valor estabelecido na farmacopeia americana (USP, 2016). O pH do produto final nos lotes I1, I2 e I3 e IP1, IP2 e IP3 apresentaram valores entre 7,5 e 7,8. A Figura 33 mostra a foto de frascos do lote IP4 que foram preparados com formulação I, desenvolvida neste trabalho.

Figura 33 – Foto de frascos de RL de MAG3 lotes IP4, que após a marcação apresentou pH de 7,5.

Fonte: Fotografia do autor.

No estudo de estabilidade realizado por um período de 4 meses, a %PRq e a distribuição biológica do lote IP4 marcado com alta e baixa atividade de ^{99m}Tc estão relacionadas nas Tabelas 35 a 38, e nas Figuras 34 a 37.

6.6.1 Avaliação do estudo de estresse em transporte

A Figura 34 mostra a foto interna da Câmara climática PSC022 Gallenkamp Pharmaceutica, com a disposição de frascos de RL de MAG3 lote IP4, para simular condição de estresse no transporte.

Figura 34 – Foto mostrando a disposição de frascos de RL de MAG3 lote IP4, para simular condição de estresse no transporte.

Fonte: Fotografia do autor.

No quarto mês de avaliação da estabilidade do lote IP4, foi estudado o efeito do aumento de temperatura e umidade na %PRq e biodistribuição. O objetivo deste estudo foi avaliar se uma condição adversa de temperatura como, por exemplo, 2 dias em temperatura de 40 °C e 75 % de umidade poderiam afetar a marcação do RL de MAG3 durante a validade do produto. A temperatura à qual um medicamento é submetido durante o transporte pode ser um fator crítico na qualidade final do produto, principalmente se considerarmos que, no Brasil, há uma amplitude relativamente alta na temperatura. A distância percorrida desde o local de produção até o local de recebimento, a embalagem de acondicionamento e o armazenamento correto podem minimizar ou não a variação de temperatura à qual o medicamento pode ser submetido, assim é importante avaliar o efeito da temperatura e umidade na qualidade de um radiofármaco.

6.6.2 Resultados do RL de MAG3 do lote IP4

As Tabelas 35 a 38 mostram os resultados de %PRq e distribuição biológica de MAG3-^{99m}Tc resultantes da marcação do lote de MAG3 IP4 com alta e baixa atividade de ^{99m}Tc.

Tabela 35 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4 preparado com formulação I e marcado com 3700 MBq (100 mCi).

% Pureza Radioquímica (Média + DP)				
Tempo min.	Início	1º mês	3º mês	4º mês Estresse
30	99,21 ± 0,04	98,68 ± 0,04	98,66 ± 0,08	98,91 ± 0,07
60	99,18 ± 0,06	98,78 ± 0,07	98,49 ± 0,08	99,11 ± 0,12
120	99,27 ± 0,06	98,73 ± 0,10	98,82 ± 0,01	98,76 ± 0,24
240	98,31 ± 0,22	98,48 ± 0,16	98,35 ± 0,48	98,12 ± 0,18

Especificação: Pureza Radioquímica ≥90%, (USP, 2016).

Figura 34 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 35.

Tabela 36 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP3, preparado com formulação I e marcado com 3700 MBq (100 mCi).

%DI (Média + DP)				
Órgãos	Início	1º mês	3º mês	4º mês estresse
Rins	0,65 ± 0,08	0,76 ± 0,42	1,27 ± 0,17	1,28 ± 0,13
Fígado	0,56 ± 0,11	0,37 ± 0,09	1,02 ± 0,16	1,11 ± 0,11
Estômago	0,18 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,08	0,09 ± 0,01
Intestino	6,21 ± 0,22	4,53 ± 0,68	6,28 ± 0,59	7,83 ± 0,93
Carcaça	0,97 ± 0,02	0,96 ± 0,03	1,80 ± 0,23	1,93 ± 0,25
Bexiga	91,43 ± 0,39	93,36 ± 0,26	89,48 ± 0,74	87,75 ± 1,42
Bexiga + urina	92,08 ± 0,31	94,12 ± 0,64	90,75 ± 0,57	89,03 ± 1,28

Especificação: % DI Rins ≤ 2%, Bexiga e urina ≥ 80% e Fígado ≤ 2%, (IAEA, 2008).

Figura 35- Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 6 meses do RL de MAG3 lote IP3 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 36.

Tabela 37 – Resultados do estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

% Pureza Radioquímica (Média + DP)				
Tempo (min.)	Início	1º mês	3º mês	4º mês estresse
30	98,76 ± 0,10	98,83 ± 0,03	98,24 ± 0,14	98,08 ± 0,03
60	98,91 ± 0,12	98,85 ± 0,06	98,73 ± 0,01	99,10 ± 0,07
120	98,74 ± 0,14	98,78 ± 0,04	98,85 ± 0,14	98,90 ± 0,16
240	97,75 ± 0,54	98,92 ± 0,09	98,48 ± 0,26	98,57 ± 0,18

Especificação: Pureza Radioquímica $\geq 90\%$

Figura 36 - Gráfico dos resultados de %PRq do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP4 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 37.

Tabela 38 – Resultados de distribuição biológica no estudo de estabilidade realizado por 4 meses, do RL de MAG3 lote IP4, preparado com formulação I e marcado com baixa atividade de ^{99m}Tc , 185 MBq (5 mCi).

%DI (Média + DP)				
Órgãos	Início	1º mês	3º mês	4º mês estresse
Rins	1,19 ± 0,37	0,93 ± 0,21	0,97 ± 0,03	1,68 ± 0,45
Fígado	0,62 ± 0,15	0,71 ± 0,04	1,10 ± 0,03	1,34 ± 0,16
Estômago	0,18 ± 0,14	0,27 ± 0,35	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Intestino	6,82 ± 0,63	5,83 ± 0,30	6,89 ± 0,23	8,84 ± 0,44
Carcaça	1,36 ± 0,26	1,59 ± 0,08	2,56 ± 0,19	2,39 ± 1,08
Bexiga	89,83 ± 0,63	90,67 ± 0,42	88,40 ± 0,29	85,73 ± 1,75
Bexiga + urina	91,02 ± 0,73	91,60 ± 0,57	89,37 ± 0,27	87,42 ± 1,41

Especificação: % DI Rins ≤ 2%, Bexiga e urina ≥ 80% e Fígado ≤ 2% (IAEA, 2008)

Figura 37 - Gráfico dos resultados de distribuição biológica do estudo de estabilidade realizado por 4 meses do RL de MAG3 lote IP4 preparado com formulação I, cujos dados encontram-se relacionados na Tabela 38

Os resultados de %PRq e distribuição biológica de MAG3-^{99m}Tc resultantes da marcação do lote de MAG3 IP4 com alta e baixa atividade de ^{99m}Tc e apresentados nas Tabelas 35 a 38 atenderam aos limites especificados pelas principais farmacopeias, no período de 4 meses. A %PRq manteve-se acima de 90% até 4 horas da marcação. No ensaio de distribuição biológica, a %DI para os órgãos de interesse atenderam aos limites especificados: rins < 2%, bexiga + urina ≥ 80% e fígado < 5%, como mostram as Figuras 34 a 37.

A formulação também atendeu ao especificado nas farmacopeias (USP, 2016; EP, 2014 e WHO, 2008) no que se refere ao pH, pois o valor de 7,5 manteve-se estável durante o período do estudo de estabilidade.

As Figuras 39, 40 e 41 mostram as imagens obtidas de camundongo Swiss em microSPECT-CT e em Câmara Gama, de MAG3 lote: IP4 marcado com ^{99m}Tc na alta atividade, administrado via intravenosa através da cauda do animal.

Figura 39 - Imagens planares obtidas em camundongo Swiss, 45 minutos após administração da dose 111 MBq (3 mCi) em 0,1 mL de MAG3-^{99m}Tc.

Fonte: MicroSPECT-CT/Albira, IPEN.

Figura 40 - Imagens planares (b1, b2, b3) em 3D, obtidas em camundongo Swiss, 45 minutos após administração da dose 111 MBq (3 mCi) em 0,1 mL de MAG3- ^{99m}Tc .

Fonte: MicroSPECT-CT/Albira, IPEN.

Figura 41 – Imagens dinâmicas planares obtidas em camundongo Swiss durante o tempo de 60 minutos, após administração da dose 111 MBq (3 mCi) em 0,1 mL de MAG3-^{99m}Tc.

Fonte: Gama-câmara Nucline TH Mediso, IPEN.

No microSPECT-CT, as Figuras 39 e 40 confirmaram a rápida excreção renal, e após 45 minutos da administração da dose somente foi observada atividade na bexiga e ureter. A Figura 40 mostra as imagens adquiridas na Gama Câmara a cada 2 minutos no processo de Imagem Dinâmica. No tempo de 4 minutos, pode-se observar que o radiofármaco atingiu o máximo de atividade, para então iniciar a eliminação do produto marcado pela bexiga, de maneira muito rápida. Nas Figuras 39, 40 e 41 também não foram observadas captação hepática e intestinal.

7 CONCLUSÕES

Os RL comercialmente disponíveis serviram de base para o desenvolvimento de uma formulação I, com quantidades diferenciadas dos reagentes.

Procurou-se utilizar as metodologias de controle de qualidade e as especificações das farmacopeias internacionais para avaliar a formulação em desenvolvimento. Os métodos de controle de matéria-prima e do radiofármaco final foram avaliados e definidos.

Observou-se que a forma de preparo das soluções, a ordem de adição dos reagentes, a quantidade de cloreto estanoso, o pH nas etapas iniciais, intermediárias e final foram fatores críticos na obtenção de um RL de MAG3, que após marcação com ^{99m}Tc resultasse em %PRq > 90%.

Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade dos lotes de RL de MAG3 I1, I2 e I3 e IP1, IP2, IP3 e IP4 indicaram que o pH do produto marcado entre 7,1 e 7,5 ocasionaram %PRq e distribuição biológica que não diferiram entre si e atenderam aos limites especificados.

Neste trabalho, foram definidas as condições de preparação da formulação para obtenção de MAG3 na forma de um RL pronto para marcação com ^{99m}Tc , para ser utilizado em diagnóstico na obtenção da imagem renal, para avaliação da filtração glomerular e fluidez sanguínea pelos túbulos renais, para a comunidade médica na área da medicina nuclear no Brasil.

Diante dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, podemos afirmar que esta fase do desenvolvimento da formulação IPEN de MAG3 está concluída.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABX. Advanced Biochemical Compounds. Chemicals Product List of ABX. Disponível em: <<http://abx.de/chemicals/product-list.html>> Acesso em: 01 Fev. 2017.

AL-NAHHAS, A. A; JAFRI, R.A; BRITTON, K.E; SOLANKI, K; BOMANJI, J; MATHER, S; CARROLL, M. A; AL-JANABI, M; FRUSCIANTE, V; AJDINOWIC, B; FIORE, F; DEMENA, S; NIMMON, C.C. Clinical experience with 99mTc-MAG3, mercaptoacetyl triglycine, and a comparison with 99mTc-DTPA. Eur. J. Nucl. Med., v. 14, p. 453-462, 1988.

ALEIXO, L. C. M. ; R.S.Freitas ; G.L.Lima-Filho ; M. Bernardo-Filho . Estudo In vivo e in vitro da Ligação do Radiofármaco 99mTc-DMSA aos Elementos do sangue. In: International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2002, Rio de Janeiro. INAC 2002.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pesquisa Clínica. Definição de Fase III. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>> Acesso em: 24 Jan. 2017.

ANVISA. RDC 38, DE 4 DE JUNHO DE 2008. Disponível em: <<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-38-de-4-de-junho-de-2008>> Acesso em: 06 Fev. 2017.

ANVISA. RDC Nº 63, DE 18 DE DEZEMBRO DE 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=224250&_101_type=document> Acesso em: 06 Fev. 2017

ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 64, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259619/RDC+64-2012.pdf/d7b477b0-462e-42be-9ef0-714832f4f011>> Acesso em: 28 Fev. 2017

ANVISA. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 – Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017_16_04_2010.pdf/b9a8a293-f04c-45d1-ad4c-19e3e8bee9fa> Acesso em: 06 Fev. 2017.

BASTOS, M. G; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. J. Bras. Nefrol., v. 33, p. 93-108, 2011

BEIKI, D.; EFTEKHARI, M.; FALLAHI, B.; GHEISARI, F.; HOZHABROSADATI, M.; FARD-ESFAHANI, A.; TAKAVAR, A.; GHOLAMREZANEZHAD, A.; SAGHARI, M.; ANSARI GILAN, I K. Comparative scintigraphic study of renal function with 99mTc-

Mercaptoacetyl-triglycine and ^{99m}Tc -Ethylenedicysteine. J. Pharm. Sci., v.16, p. 41-46, 2008.

BÍBLIA. Eclesiastes, 9, 10. REFERÊNCIA BÍBLIA. A. T. Eclesiastes. In: BÍBLIA. Português. Bíblia sagrada: contendo o velho e o novo testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. Revista e Corrigida. Ed. 1995. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 1995. p.474.

BORMANS, G.; CLEYNHENS, B.; ADRIAENS, P.; VANBILLOEN, H.; ROO, M.; VERBRUGGEN, P. Investigation of the labeling characteristics of ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycine. Nucl. Med. Bio. v. 22, n. 3, p. 339-349, 1995

BUBECK, B.; BRANDAU, W.; WEBER, E.; KALBLE, T.; PAREKH, N.; GEORGI, P.R. Pharmacokinetics of Technetium- ^{99m} -MAG3 in Humans. J. Nucl. Med.; v 31, p.1285 – 1293, 1990.

CENTIS. Centro de isótopos. NefroGBT-Sn para marcaje con ^{99m}Tc , maio/2010 Disponível em:< http://www.centis.edu.cu/documentos/especificacion/car_en225.pdf w.centis.edu.cu/productos_en.php> Acesso em: 12 Fev. 2017.

CHEMDRUG. Disponível em:
<<http://www.chemdrug.com/article/8/3285/16420725.html>> Acesso em 06 Fev.2017

CHEN, F.; DECRISTOFORO, C.; ROHRBACHER, B.; RICCABONA, G. A simple two-strip method to determine the radiochemical purity of technetium- ^{99m} mercaptoacetyltriglycine. Eur. J. Nucl. Med., v. 20, p. 334-8, 1993.

CONEP/CNS/MS Disponível em:
<http://conselho.saude.gov.br/Web_comissoes/conep/aquivos/CNS%20%20Norma%20Operacional%20001%20-%20conep%20finalizada%2030-09.pdf> acesso em: 06 Fev. 2017.

DEMTS. D.; FRIEDMAN, L.; FUBERG, C. Fundamentals of Clinical Trials. 4. ed. New York: Springer, 2010. p. 445.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals. Sem. Nucl. Med., v. 20, p. 5-27, 1990.

EP. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 8.0 Council of Europe Strasbourg, 2014.

ESHIMA, D.; TAYLOR, A. Technetium- ^{99m} (^{99m}Tc) Mercaptoacetyltriglycine: Update on the new ^{99m}Tc renal tubular function agent. Sem. Nucl. Med., v. 22, 61-73, 1992.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília; 5ª ed., volume 1. ANVISA, 2010, p.373.

FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium- ^{99m} MAG3 as a Hippuran replacement. J. Nucl. Med., v. 27, p. 111-116, 1986.

HEMERT; F. J. V.; LENTHE, H.V.; SCHIMMEL, K. J.M.; ECKSMIT, B.L.F. V. Preparation, radiochemical purity control and stability of ^{99m}Tc -mertiatide (Mag-3). *An. Nucl. Med.*, v. 19, p. 345–349, 2005.

HUNG, J. C. Comparison of technetium-99m MAG3 kit formulations in Europe and the USA. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 19, p. 990-992, 1992.

IAEA. International Atomic Energy Agency. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits Technical Report Series, 2008 p.466. Disponível em:

<http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs466_web.pdf> Acesso em: 06 Jan. 2017.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Disponível em:

<https://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?secao_id=632> Acesso em: 05 Jan. 2017.

JAFRI, R.A.; BRITTON, K. E.; NIMMON, C.C.; SOLANKI, K.; A1-NAHHAS, A.; BOMANJI, J.; FETTICH, J.; HAWKINS, L.A.; Technetium-99m MAG3, a comparison with Iodine-123 and Iodine-131 orthiodohippurate, in patients with renal disorders. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 147-158, 1988.

JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. *Chem. Rev.*, v. 93, p. 1137-1156, 1993.

MALLINCKRODT PHAMACEUTICALS. Technescan MAG3™ Kit for the Preparation of Technetium Tc 99m Mertiatide. Full US Prescribing Information. Disponível em:

<<http://www2.mallinckrodt.com/Templates/Pages/productdetail.aspx?id=618#sthash.LNECqipm.dpuf>> Acesso em: 08 Mar. 2017.

MARTINS, C.T.B. Entrevista concedida pela Presidente da Sociedade Brasileira de Nefrologia, Campanha para rins saudáveis. Publicação da Sociedade Brasileira de Nefrologia, ano 22, Nº 101, São Paulo. Jan. Fev. Mar. 2015.

MILLAR, A. M; O'BRIEN, L. M. Preparation of ^{99m}Tc -MAG3: no confirmation that sodium chloride injections from plastic containers affect radiochemical purity. *Nucl. Med. Commun.*, v. 19, p. 475-477, 1998.

NOLL, B.; JOHANNSEN, B.; MAY, K. and SPIES, H. Preparation of the Renal Function and Imaging Agent ^{99m}Tc -MAG3 Starting from S-unprotected Mercaptoacetyl triglycine. *Appl. Radiat. Isot.* v. 43, p. 899-901, 1992.

NOSCO, D.L.; ROBERT, G.; WOLFANGEL, M. J.; BUSHMAN, G.D.; GRUMMON, M.; MARMION, E.; PIPES, D. W. Technetium-99m MAG3 : Labeling Conditions and Quality Control, *J. Nucl. Med. Techno*; v.21, p. 69-74, 1993

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. Textbook of Radiopharmacy Theory and

Practice: Gordon and Breach Science Publishers S.A. v.3, C.3. New York, 1990, p. 53-72.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 3 Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OKARVI, S.M.; VERBEKE, K.; ADIAENS, P.; VERBRUGGEN, A.M. Synthesis, labelling and biological characteristics of derivatives of mercaptoacetyltriglycine with two amide functions. J. Label. Compd. Radiopharm, v. 45, p. 115-137, 2002.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Rev. Bras. Cienc. Farm. v. 42, p. 151-165, 2006.

PERALES, J. L. G.; Radiofarmacia em pdf. Disponível em: <https://radiofarmacia.files.wordpress.com/2013/06/radiofarmacia_150216.pdf> Acesso em: 02 Mar. 2017.

PORTAL BRASIL. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/doenca-renal-cronica-atinge-10-da-populacao-mundial>> Acesso em: 10 Fev. 2017.

ROBLES, B. R.; HERRERA, J.; CABALLERO, J.; OTERO, M. Purificación del benzoil-mercaptoacetil triglicina complementado con evaluaciones biológicas. Alasbimn Journal, v. 5, n. 21, 2003

ROTOP. Pharmaka GmbH. unsere-produkte/99m-tc-kits/mag-3-kit/. MERTIOSCAN 0,2 mg: Fachinformation (SmPC. Disponível em: < http://www.rotop-pharmaka.de/fileadmin/user_upload/GFIs/MAG-3/PL-MAG3-AT-deu-01.pdf> Acesso em: 05 Jan. 2017.

SAHA, G. B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 4ª ed. New York, N.Y.: Springer-Verlag, 1998. p.358.

SBN. Sociedade Brasileira de Nefrologia. O Brasil se ilumina no Dia Mundial do Rim. ANO 18, Nº 89, São Paulo. Jan. Fev. Mar. 2012.

SEETHARAMAN, S.; BALLINGERC, J. R.; SOSABOWSKIB, M. H. Simplified method for determining the radiochemical purity of 99mTc-MAG3. J. Nucl. Med. Technol, v. 34, p.179–183, 2006.

SEETHARAMAN, S.; SOSABOWSKIB, M. H.; BALLINGERC, J. R. Validation of alternative methods of preparing 99mTc-MAG3. Appl. Radiat. Isot., v.65, p. 1240-1243, 2007.

TAYLOR, A. Jr; ESHIMA, D.; CHRISTIAN, P. E.; MILTON, W. Evaluation of Tc-99m mercaptoacetyltriglycine in patients with impaired renal function. Radiology, v. 162, p. 365-370, 1987.

TAYLOR, A. Jr; ESHIMA, D; FRITZBERG, AR; CHRISTIAN, P.E; KASINA, S. Comparison of iodine-131 OIH and technetium-99m MAG 3 renal imaging in volunteers. J. Nucl. Med., v. 27, p. 795-803, 1986.

TAYLOR, A.; ESHIMA, D.; ALAZRAKI, N. 99mTc-MAG3, a new renal imaging agent: preliminary results in patients. Eur. J. Nucl. Med., v. 121, p. 510-514, 1987.

TAYLOR, JR. A.; ESHIMA, D.; CHRISTIAN, P.E.; WOOTEN, W.W.; LORI, H. L.; MCELVANY, K. Technetium-99m MAG3 Kit Formulation: Preliminary Results in Normal Volunteers and Patients with Renal Failure. J. Nucl. Med., v. 29, p. 616-622, 1988.

THEOBALD, A. E. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. Textbook of Radiopharmacy Theory and Practice. Gordon and Breach Science Publishers S. A., v.3, C.7, New York, 1990. p. 115-148.

THRALL, J.H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 39. ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2016.

WHO. World Health Organization. Radiopharmaceuticals – Final text for addition to the International Pharmacopoeia. Document QAS/08.262/Final, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Radgenmono.pdf>> Acesso em: 06 Fev. 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**