

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA OS
RADIOFÁRMACOS MIBI E DTPA EM PRODUTO ACABADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FERNANDA GOBBI DE BITENCOURT

PORTO ALEGRE, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O
RADIOFÁRMACO MIBI E DTPA EM PRODUTO ACABADO

Dissertação apresentada por
Fernanda Gobbi de Bitencourt para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a: Cássia Virginia Garcia

Porto Alegre, 2018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de março de 2018 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Jacqueline Arguello, da Silva

Universidade Federal do rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Ferderal do Rio Grande do sul

Prof Dr. Helder Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bitencourt, Fernanda Gobbi de
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O
RADIOFÁRMACO MIBI E DTPA EM PRODUTO ACABADO /
Fernanda Gobbi de Bitencourt. -- 2018.
114 f.
Orientadora: Cássia Virgina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Validação: método de análise de fármacos . 2.
Radiofármacos. 3. Mibi-tc-99m. 4. Controle de
qualidade de medicamentos. I. Garcia, Cássia
Virgina, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratorio de Controle de Qualidade da empresa MJM Produtos Farmacêuticos e de Radioproteção, LTDA (Grupo RPH).

AGRADECIMENTOS

Registro minha admiração e gratidão à minha orientadora, que me apoiou e acreditou em mim, mesmo sabendo de todas as dificuldades que iríamos percorrer.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus professores e funcionários.

Aos colegas de percurso, com os quais aprendi imensamente.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio nesta trajetória.

Sumário

I.	LISTA DE FIGURAS.....	11
II.	LISTA DE ABREVIATURAS	15
III.	Resumo.....	17
IV.	Abstract	19
INTRODUÇÃO		21
1.	Introdução	24
OBJETIVOS		26
2.	Objetivos	29
2.1.	Objetivos gerais.....	29
2.2.	Objetivos específicos.....	29
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		31
3.	Revisão bibliográfica	34
3.1.	Medicina nuclear.....	34
3.2.	Legislação	36
3.3.	MIBI	38
3.3.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	40
3.4.	DTPA.....	41
3.4.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
CAPÍTULO I – Caracterização do ácido pentético		44
4.	Introdução	48
4.1.	Substância química de referência e amostras	48
4.2.	Caracterização da SQR do ácido pentético	48
4.2.1.	Espectroscopia na região do IV	48
4.2.2.	Espectroscopia de RMN	50
4.2.3.	Espectroscopia na região do UV.....	52
4.2.4.	Espectroscopia de massas	53
4.2.5.	Calorimetria Exploratória Diferencial.....	56
4.3.	Conclusão.....	58
CAPÍTULO II – Desenvolvimento e validação de método analítico para o produto acabado MIBI		62
5.	Introdução	65
5.1.	Parte experimental	66
5.1.1.	Equipamentos e reagentes	66

5.1.2.	Condições cromatográficas	66
5.1.3.	Preparo das soluções	67
5.1.4.	Validação do método analítico	68
5.2.	Resultados e discussões	72
5.2.1.	Desenvolvimento do método por CLAE	72
5.2.2.	Estudo de estabilidade da solução estoque	73
5.2.3.	Conformidade do sistema	73
5.2.4.	Seletividade	74
5.2.5.	Linearidade	79
5.2.6.	Precisão	82
5.2.7.	Exatidão	83
5.2.8.	Robustez	84
CAPÍTULO III – Desenvolvimento e validação de método analítico para a		
matéria prima ácido pentético		
		90
6.	Introdução	94
6.1.	Validação do método para o ativo ácido pentético	94
6.1.1.	Desenvolvimento do método	95
6.2.	Parte experimental	95
6.2.1.	Equipamentos e reagentes	95
6.2.3.	Preparo das soluções	97
6.2.4.	Validação do método analítico	97
6.3.	Resultados e discussão	100
6.3.1.	Parte experimental do desenvolvimento	101
6.3.2.	Validação do método para matéria prima ácido pentético por CLAE..	103
6.3.3.	Seletividade	103
6.3.4.	Linearidade	105
6.3.5.	Precisão	108
6.3.6.	Exatidão	108
6.3.7.	Robustez	109
Considerações Finais		
		112
7.	Considerações finais	115
Perspectivas		
		119
8.	Perspectivas	123
Referências		
		126
9.	Referencias	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do radiofármaco Sestamibi-Tc-99m

Figura 2. Estrutura do ácido pentético, ativo do radiofármaco DTPA-Tc-99m

Figura 3. Espectro na região do IV do DTPA SQR.

Figura 4. Apresenta o espectro de RMN ¹H e a relação dos deslocamentos químicos observados.

Figura 5. Espectro de RMN ¹³C do ácido pentético SQR em água deuterada.

Figura 6. Espectro de UV, na concentração de 0,5 mg/mL da molécula ácido pentético SQR em água.

Figura 7. Espectro de massas do ácido pentético SQR.

Figura 8. Estrutura molecular do ácido pentético SQR.

Figura 9. Curva de aquecimento obtida por DSC.

Figura 10a. Cromatograma do placebo (todos os excipientes sobrepostos) e cromatograma dos excipientes isolados: 10b. Cloreto estanoso 10c. Citrato de sódio 10d. Manitol 10e. Placebo (todos os excipientes sem o ativo).

Figura 11. Cromatograma do diluente (água ultrapura).

Figura 12. Cromatograma da fase móvel: metanol : tampão sulfato de amônio 0,025M : acetonitrila 20:20:60.

Figura 13. Cromatograma do Sestamibi SQR a 0,2 mg/mL em fase móvel (metanol : tampão sulfato de amônio 0,025M : acetonitrila 20:20:60) com fluxo de 1,5 mL/min.

Figura 14. Gráfico demonstrando a interpolação das curvas obtidas por CLAE, concentração x área.

Figura 15. Cromatograma do produto após a manipulação e antes da liofilização do produto acabado DTPA.

Figura 16. Cromatograma da fase móvel e do padrão de DTPA na concentração de 1,0 mg/mL sobrepostos.

Figura 17. Cromatograma da fase móvel.

Figura 18. Amostras analisadas após passarem por teste de estresse: hidrólise ácida, hidrólise básica e exposição a UV.

Figura 19. Gráfico demonstrando a interpolação das curvas obtidas por CLAE para a SQR DTPA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de análise encontrados na literatura referentes ao radiofármaco ^{99m}Tc -Sestamibi.

Tabela 2. Resumo das referências encontradas para o DTPA (ativo) e para o EDTA com os parâmetros fase móvel e coluna.

Tabela 3. Interpretação das principais bandas do espectro de IV do ácido pentético SQR.

Tabela 4. Resumo dos dados do espectro RMN ^1H do ácido pentético SQR em água deuterada.

Tabela 5. Resumo dos dados do espectro RMN ^{13}C do ácido pentético SQR em água deuterada.

Tabela 6. Interpretação do espectro de massas do ácido pentético SQR.

Tabela 7. Segundo a RDC 166/2017, métodos validados devem atender aos seguintes parâmetros.

Tabela 8. Composição por frasco de produto acabado MIBI.

Tabela 9. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para o produto MIBI.

Tabela 10. Parâmetros de conformidade recomendados e obtidos experimentalmente (SHABIR, 2003).

Tabela 11. Valores experimentais da concentração para as três curvas padrão de MIBI obtidas por CLAE.

Tabela 12. Valores experimentais das áreas para as três curvas padrão de MIBI obtidas por CLAE.

Tabela 13. Equações das retas das três curvas padrão de referência MIBI.

Tabela 14. Teste de análise da variância para o ajuste do modelo linear. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de MIBI por CLAE.

Tabela 15. Resultados da precisão por CLAE para análise de MIBI em produto acabado.

Tabela 16. Resultados do estudo de exatidão por CLAE para o produto MIBI.

Tabela 17. Resultados do teste de robustez para método proposto por CLAE para o produto acabado MIBI. Os resultados são a média de 4 resultados.

Tabela 18. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE.

Tabela 19. Parâmetros de adequabilidade do sistema para a matéria prima ácido pentético a 1 mg/mL.

Tabela 20. Resumo dos métodos testados para o radiofármaco DTPA (*cold kit*).

Tabela 21. Valores experimentais das áreas das curvas da matéria prima ácido pentético.

Tabela 22. Equações das retas das três curvas padrão do SQR ácido pentético.

Tabela 23. Teste de análise da variância para o ajuste do modelo linear. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de ácido pentético por CLAE.

Tabela 24. Resultados da precisão por CLAE para a matéria prima ácido pentético.

Tabela 25. Resultados do estudo de exatidão por CLAE para a matéria prima ácido pentético

Tabela 26. Resultados do teste de robustez para método proposto por CLAE. Os resultados são a média de 4 resultados.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de variância

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

COLD KIT – radiofármaco (medicamento liofilizado) sem a adição da radiação

DPR – Desvio padrão relativo

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

FDA – Food and Drug Administration

ICH – International Conference on Harmonization

IV – Infravermelho

N – Número de pratos

PF – Ponto de fusão

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear do Carbono 13

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear do Hidrogênio

SESTAMIBI - 2-Metoxi-Isobutil-Isonitrila

SQR – Substância química de referência

TEA - Trietilamina

TFA – Ácido trifluoracético

TMAH – Hidróxido de tetrametilamônio

USP – The United State Pharmacopeia

UV – Ultravioleta

Resumo

Radiofármacos são compostos radioativos que podem ser usados tanto para diagnóstico como para terapia. O radiofármaco ^{99m}Tc -MIBI é a formação de um complexo contendo o radionúclideo Tecnécium- 99m e seis moléculas de Sestamibi, usado principalmente para cintilografias do miocárdio, sendo o procedimento mais realizado dentro da medicina nuclear, por consequência, o radiofármaco mais comercializado. Já o radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA é composto também pelo mesmo radioisótopo e por uma molécula de ácido pentético, a qual tem característica de um quelante com afinidade pelos rins, por isso, é possível fazer avaliação do sistema renal. Como os radiofármacos são considerados medicamentos, estão sujeitos às mesmas normativas, logo o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia de doseamento destes insumos ativos antes da complexação com o radionúclideo através da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Dois métodos simples e eficientes foram desenvolvidos e validados para o MIBI em produto acabado e para a matéria-prima ácido pentético (DTPA), utilizando-se misturas de solvente orgânico e tampão. Os parâmetros de validação foram avaliados, obtendo resultados satisfatórios. Um teste de estabilidade para o radiofármaco MIBI em solução foi realizado e o resultado indicou uma preservação das características de aproximadamente 60 dias, e quando liofilizado de mais de 12 meses. Sendo assim, os métodos propostos foram considerados adequados para utilização na rotina da indústria farmacêutica. Como perspectivas, novas condições serão testadas para obter método de quantificação para o radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA em produto acabado.

PALAVRAS-CHAVE: radiofármaco, DTPA, MIBI, *cold kit*, metodologia analítica.

Abstract

Radiopharmaceuticals are radioactive compounds that can be used for diagnostic and therapeutic purposes. Technetium (^{99m}Tc) sestamibi is a radiopharmaceutical including a coordination complex consisting of the radioisotope technetium-99m bound to six Sestamibi ligands, which is mainly used to image the myocardium via scintigraphy. This is the most common nuclear medicine procedure, making Technetium (^{99m}Tc) sestamibi the most commercialized radiopharmaceutical. Technetium (^{99m}Tc)-DTPA in turn is composed by the same radioisotope plus a molecule of Pentetic Acid, which, by its chelating properties, is used to scan renal system. As radiopharmaceuticals are regarded as drugs, they are subject to the same regulations; therefore, the objective of this study is to develop quantification methodology for these both active pharmaceutical ingredients before their complexation with the radioisotope by employing high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology. Two simple, efficient methods were developed and validated for Sestamibi at its final form as well as for DTPA's raw material by using buffer and organic solvent mixtures. The validation parameters were evaluated with satisfactory results. A stability test was carried out for Sestamibi, indicating the preservation of characteristics for nearly 60 days, and for over 12 months when at its freeze-dried form. The proposed methods were thus considered adequate for pharmaceutical industries. As perspectives, new conditions shall be tested to obtain a quantification method for Technetium (^{99m}Tc)-DTPA at its final form.

KEYWORDS: radiopharmaceutical, DTPA, MIBI, *cold kit*, analytical methods.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A validação de ensaios de controle de qualidade é essencial na fabricação de produtos farmacêuticos, registro de novos medicamentos, bem como em laboratórios de controle de qualidade, pois é uma ferramenta que assegura e permite realizar a análise de insumos e produtos farmacêuticos com segurança. Segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 2010, os estudos de validação constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM) e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos. Além disso, devem ser elaborados e mantidos os relatórios com os resumos dos resultados obtidos e conclusões (BRASIL, 2010).

O termo radiofármaco apresenta diferentes definições. De acordo com SAHA (2003) um “radiofármaco é um composto radioativo utilizado para o diagnóstico ou tratamento terapêutico de doenças humanas.” Já a RDC 64/2009 estabelece que radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Ainda nessa RDC que dispõe sobre registro de radiofármacos versa “radionuclídeo ou radioisótopo são isótopos instáveis os quais sofrem decaimento radioativo e transmudam-se em novo elemento. Compreendem também os componentes não-radioativos para marcação (*cold kits*) e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos (BRASIL, 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008), radiofármacos são produtos farmacêuticos e podem ser classificados em quatro categorias: produtos radioativos prontos para o uso; geradores de radionuclídeos; componentes não-radioativos (reagentes liofilizados) e precursores utilizados para marcação de outras substâncias antes da administração. Sendo considerados medicamentos, estão sujeitas as mesmas regulações que os outros tipos de medicamentos, com exceção a quantificação de produtos de degradação, conforme RDC 53/2015 (BRASIL, 2015).

Tanto o radiofármaco $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ (formação de um complexo constituído do radionúclídeo ^{99m}Tc e seis moléculas de Sestamibi) quanto o $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ (composto pelo mesmo radionúclídeo e por uma molécula de ácido pentético) são radiofármacos encontrados em todo o mundo, produzidos por diferentes fabricantes, como exemplo Curium, GE Healthcare. No Brasil, encontramos apenas um fabricante estatal localizado em São Paulo no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e um privado localizado em Porto Alegre/RS, Grupo RPH.

No que diz respeito à avaliação dos radiofármacos, encontrou-se relatos dos ativos pela função de quelante que também possuem, mas como *cold kit*, a bibliografia é escassa. No final do ano de 2017 foi adicionada na Farmacopeia Brasileira as monografias para os radiofármacos $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ e $^{99m}\text{Tc-MDP}$, e, entrou em processo de consulta pública a monografia para o $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, porém apenas para os produtos já complexados com o radionúclídeo Tecnécio ^{99m}Tc -metaestável. Para os ativos dos *cold kits*, a Farmacopeia Europeia, 2017 apresenta monografia para o Sestamibi e para ácido medrônico, referente aos radiofármacos citados acima, respectivamente. Já a Farmacopeia Americana 2017 traz monografia para o ácido pentético, referente ao ativo do $^{99m}\text{Tc-DTPA}$.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver e validar metodologias analíticas para avaliar qualitativa e quantitativamente os radiofármacos MIBI e DTPA em produto acabado não marcado (*cold kit*).

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) de DTPA pelas técnicas analíticas de espectrofotometria na região de Infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).
- Desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação e determinação quantitativa de MIBI em produto acabado;
- Desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação e determinação quantitativa de DTPA em matéria prima.
- Realizar estudo preliminar de estabilidade de MIBI em diferentes condições de estresse.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão bibliográfica

3.1. Medicina nuclear

A área da saúde caracterizada por utilizar radionuclídeos como fontes de radiação é denominada de medicina nuclear. Essas fontes são administradas ao paciente diferentes vias: inalação, endovenosa, oral, intradérmico, intratecal e ocular, sendo distribuídas especificamente na área em que se tem interesse. A medicina nuclear é um método seguro, gera informações para diagnóstico que não seriam possíveis a partir de outros exames. As doses de radiação usadas para os exames de medicina nuclear são mínimas. Os radioisótopos utilizados para diagnóstico emitem radiações gama, e tem tempo de meia vida muito curta, essencial para sua aplicação nessa área (SBMN, 2017).

Essa área da saúde utiliza a radiação em conjunto com um fármaco (*cold kit*) para avaliar o funcionamento de órgãos e tecidos, onde, diferentemente do exame de Raio X convencional, no qual a fonte é emitida de fora para dentro do paciente e chega ao detector, na cintilografia a emissão ocorre de dentro para fora para ser captada, sendo detectada após atravessar a estrutura que se deseja avaliar, formando a imagem pela interação da energia com os tecidos biológicos (NOBREGA, 2011; COELHO, et al, 2006).

O radionuclídeo mais utilizado é o Tecnécio na sua forma metastável (^{99m}Tc), este é gerado pelo decaimento do Molibdênio (radionuclídeo pai). O Tecnécio é amplamente utilizado por conter características essenciais para obtenção de um bom resultado no exame como: tempo de meia vida curto, emissão de radiação Gama (NOBREGA, 2011; COUTO, et al., 2004), fácil associação à solução salina (formação do pertecnetato de sódio após eluição do gerador) e de fácil interação com a estrutura a ser avaliada (órgão/tecido alvo), além disso, pelo tipo de radiação emitida (não corpuscular) deposita no tecido uma dose muito baixa comparada a outras fontes (NOBREGA, 2011).

Os radiofármacos aplicados em medicina nuclear são substâncias marcadas, que depois de injetadas ao paciente visam mapear a estrutura, tecido ou órgão e permite visualizar o funcionamento ou detectar alguma anormalidade como patologias, sendo usado como meio de diagnóstico e

também como tratamento em algumas situações. Logo, uma vantagem dessa técnica diagnóstica é a de ser um procedimento não invasivo que possibilita uma avaliação anatômica ou morfológica dos órgãos e, principalmente, uma avaliação funcional dos mesmos (ARAUJO, 2005; NOBREGA, 2011).

Para realização de exames em medicina nuclear (cintilografias) são usados os radiofármacos: complexação de fármacos, que são substâncias com características farmacêuticas e elementos radioativos, radioisótopos ou radionuclídeos que transferem suas características aos fármacos, tornando os radioativos (MELO, 2009).

Radiofármacos usados para diagnósticos, representam a maior parte dos exames, tem como vantagem a capacidade de minimizar a dose absorvida pelo paciente devido a sua facilidade em penetrar em tecidos com baixo poder de ionização (emissão de radiação gama) se comparado núcleos muito reativos que emitem partículas alfa e beta negativo (α ou β^-), que são usados em situações de destruição de tumores, pois possuem alta energia e baixa penetrabilidade ionizando o meio que atravessam e causando uma série de efeitos que resultam na morte das células tumorais (CNEN, 2017; ARAUJO, 2005). Como exemplo de radionuclídeos emissores de radiação β^- utilizados em terapia, podemos citar o iodo-131, ítrio-90, lutécio-177, rênio-188, estrôncio-90 e o samário-153, entre outros (ARAUJO, 2005).

Na forma de pertecnetato de sódio, o Tecnécio apresenta estado de oxidação 7+, bastante estável em solução aquosa. Nesse estado de oxidação o radionuclídeo não pode se complexar às moléculas de interesse. Então, se faz necessária a redução deste elemento para estados de oxidação mais baixos, principalmente 3+, 4+ ou 5+. O cloreto estânico (SnCl_2) é o agente redutor mais usado nos *cold kits*, os íons de estanho (Sn^{+2}) promovem a redução do Tc^{+7} para estados de oxidação mais favoráveis que poderá se ligar a uma ou mais moléculas do ligante, formando assim, complexos. (MURPHY E FERRO FLORES, 2003).

3.2. Legislação

A importância do registro de medicamentos pode ser atribuída à necessidade da avaliação das propriedades do medicamento em relação aos seus efeitos adversos e ao interesse da vigilância sanitária do país dispor de informações detalhadas sobre os produtos comercializados (SAID, 2004). Ainda que, no Brasil, a regulamentação dos radiofármacos seja recente (RDC nº 63 e 64 de 2009), sua produção nacional é da década de 60, quando o Instituto de Energia Atômica (atual Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN) iniciou a produção experimental de ¹³¹Iodo (ARAUJO et al, 2008).

Por muito tempo na Europa os radiofármacos não eram regidos por normas. Porém, em 1989 uma diretiva estendeu as regras dos demais medicamentos aos radiofármacos, resultando na obrigatoriedade de registrar, num prazo curto (dois anos), os radiofármacos já comercializados há mais de vinte anos (TCEC, 1989). A influência dos Estados Unidos (EUA), União Europeia (UE) e Japão foram de grande importância nos processos regulatórios internacionais, no sentido de uniformização das normativas no mercado mundial de medicamentos (SOUZA, 2007).

Em meio a esse contexto, a indústria fabricante de radiofármacos não possuía conhecimento nem experiência com os dossiês de registro. Também, seriam necessários anos para a execução de todos os protocolos, inclusive os de ensaios pré-clínicos e clínicos. A fim de solucionar essas questões foi solicitado pelos órgãos reguladores um procedimento simplificado, com a elaboração e apresentação de um arquivo abrangendo dados farmacológicos, toxicológicos e clínicos baseados em dados disponíveis ou publicados na literatura e dados relacionados à produção, embalagem e rotulagem. As particularidades dos radiofármacos como o número limitado de itens por lote e a necessidade de várias produções por semana tornaram o alinhamento com os demais medicamentos mais difíceis (SALVADORI, 2008).

Atualmente, os radiofármacos são considerados um grupo especial de medicamentos na Europa, e seu preparo e utilização são regulados pelas

diretivas da UE. (VERBRUGGEN et al, 2008). Já nos EUA, os compostos radioativos são regulados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Em 2008, o FDA adicionou um item específico na sua regulação que trata dos radiofármacos destinados ao diagnóstico.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008) publicou o texto final sobre radiofármacos na Farmacopeia Internacional 4ª edição. De acordo com esse documento, as instalações e procedimentos destinados à produção, à utilização e ao armazenamento de radiofármacos estão sujeitos ao licenciamento pelas autoridades regionais e/ou nacionais competentes. O licenciamento requer o cumprimento das normas aplicáveis às preparações farmacêuticas e daquelas aplicáveis aos materiais radioativos, o que implica a observância das BPF e de procedimentos de segurança para o manuseio e a produção de radioisótopos, conforme disposições da Agência Internacional de Energia Atômica.

Historicamente, as Farmacopeias tratam da definição dos padrões de qualidade de produtos farmacêuticos e, atualmente, incluem várias preparações radiofarmacêuticas, com destaque para a Farmacopeia Americana (*The United States Pharmacopeia* - USP) e a Europeia (*The European Pharmacopoeia*) (FERREIRA, et al, 2010). No final do ano de 2017 foi lançado o primeiro suplemento sobre radiofármacos na Farmacopeia Brasileira, contendo apenas dois radiofármacos, ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -MDP, essas monografias foram baseadas na USP.

No Brasil, o órgão de vigilância sanitária responsável pela aprovação dos registros e por estabelecer os requisitos necessários à solicitação é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999). Segundo Nishioka, o registro de medicamentos no Brasil está bem regulamentado, podendo necessitar de pequenos ajustes, mas sendo comparável em conteúdo à regulamentação de outras agências reguladoras mais avançadas, como exemplo a Americana e a Europeia, é evidente a similaridade entre as normativas (NISHIOKA, 2006). Em 2009 foi publicada pela primeira vez a regulamentação do registro de radiofármacos, embora tenha sido objeto de discussão desde 2007, com Consultas públicas (BRASIL, 2007).

Por anos a produção e comercialização de radioisótopos e radiofármacos foi monopólio da União, pois na Constituição Federal previa que “explorar os serviços e instalações nucleares de qualquer natureza e exercer monopólio estatal sobre a pesquisa, a lavra, o enriquecimento e reprocessamento, a industrialização e o comércio de minérios nucleares e seus derivados” era competência do Estado. Já em 2006, a publicação da emenda constitucional nº 49 alterou o artigo e excluiu o monopólio da produção, da comercialização e da utilização de radioisótopos de meia-vida curta (igual ou inferior a 2 horas), para usos médicos, agrícolas e industriais. A aprovação dessa emenda resultou no aumento de investimentos da iniciativa privada e a criação de novas unidades produtoras de radiofármacos no país (BRASIL, 2006).

Os radiofármacos foram classificados pela Anvisa como medicamentos radiofármacos novos ou inovadores e medicamentos radiofármacos de uso consagrado. O medicamento radiofármaco novo ou inovador corresponde ao radiofármaco comercializado no mercado nacional composto por, pelo menos um fármaco ativo, mas deve ser o primeiro a descrever um mecanismo de ação ou o primeiro a ter comprovado eficácia, segurança e qualidade junto à Anvisa.

E o medicamento radiofármaco de uso consagrado foi definido como um radiofármaco novo ou inovador que está sendo comercializado há mais tempo no país, possui estudos publicados que comprovam sua eficácia e segurança e está listado no Anexo I da RDC nº 64/2009 (BRASIL, 2009).

3.3. MIBI

A cintilografia de perfusão miocárdica é um método eficiente e capaz de identificar alterações no fluxo sanguíneo bem como na função do ventrículo esquerdo, o que é importante para diagnosticar doença arterial coronariana (DAC) e ajuda no processo de decisão clínica. Anormalidades presentes na cintilografia estão associadas à morte cardíaca e a infarto agudo do miocárdio (IAM). O objetivo do exame é identificar áreas isquêmicas no miocárdio através de alterações no fluxo sanguíneo, onde uma baixa captação do radiofármaco

em alguma área do miocárdio em relação às demais áreas indica uma possibilidade de isquemia nessa região (CARRINHO, et al, 2004).

Os exames de medicina nuclear para o miocárdio são feitos com o ^{99m}Tc e o fármaco Sestamibi, ou MIBI. É um agente de perfusão miocárdica que visa avaliar doenças das artérias coronárias, diferenciando anormalidades no miocárdio, áreas comprometidas em pacientes com suspeita de infarto e doenças coronarianas isquêmicas. Onde a avaliação da doença cardíaca isquêmica é feita em repouso e em estresse físico ou farmacológico (RPH-MIBI, 2017).

O frasco do MIBI é composto por; 1,0 mg de tetrafluorborato de tetramibi de cobre, citrato de sódio, cloreto estano, cloridrato de cisteína monoidratada e manitol. O medicamento é disponibilizado em pó liofilizado, e após misturado com pertecnetato de sódio torna-se uma solução límpida e sem partículas suspensas (Figura 1). Após adição do radionuclídeo Tc, esse medicamento torna-se radioativo, portanto deve ser mantido com alguns cuidados especiais como ser conservado em local onde seja mantida uma temperatura entre 15 e 30 °C, ser mantido em sua embalagem original, na hora da administração fazer uso de blindagem, luvas e óculos adequados, seu prazo de consumo após a combinação deve ser de no máximo 12 horas. (RPH-MIBI, 2017).

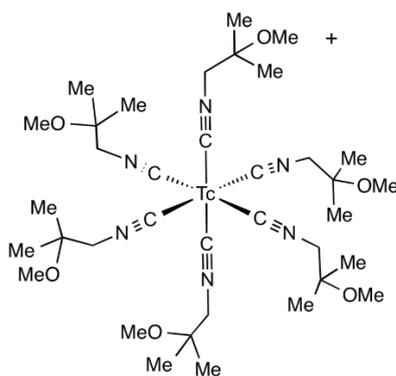


Figura 1. Estrutura do radiofármaco Sestamibi-Tc-99m

Desenvolvido em 1982, o Sestamibi tornou-se o fármaco marcado com ^{99m}Tc mais usado em perfusão miocárdica. Após administrado ao paciente ele é captado pelo miócito, espalhando de acordo com o potencial elétrico transmembrana, sendo depositados nas mitocôndrias. Por ser eliminado pelo

sistema hepatobiliar, é possível, após a administração verificar uma concentração hepática alta (RADIOTRAÇADORES, 2006).

A cintilografia do miocárdio é um exame que busca avaliar o fluxo sanguíneo através das coronárias, tendo como intuito identificar alguma anormalidade após a aplicação do radiofármaco, algum evento cardíaco grave como, por exemplo, um infarto, oferecendo um exame com resultados melhores se comparado a outras modalidades com uso de contraste (HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN, 2017).

3.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Em relação a busca de métodos de análise quantitativa para o radiofármaco MIBI está resumida na Tabela 1. A maioria dos métodos encontrados é referente ao produto marcado com a radiação (Tecnécio). Além disso, as Farmacopeias Europeia, Americana e Internacional apresentam monografia para o produto complexado com radiação, e apenas a Europeia para o ativo. Entretanto, nenhuma delas para o *cold kit*.

Tabela 1. Métodos de análise encontrados na literatura referentes ao radiofármaco ^{99m}Tc-Sestamibi.

Coluna/detecção	Fase móvel	Referência	Produto
C18, 250x4,6 mm, 10 µm/UV 254 nm	metanol :sulfato de amônia 0,025 M (95:5)	<i>Síntese do composto Tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)- (Cu[MIBI₄BF₄): substrato utilizado na produção do radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc ; IPEN dissertação 2005</i>	Síntese do ativo
C18, 250x4,6 mm, 5 µm/UV 220 nm	Metanol:Sulfato de amônio 0,05M:Acetonitrila (45:35:20 v/v/v)	<i>Tecnécio (^{99m}Tc) sestamibi injection, Farmacopeia Europeia, 9.0</i>	Impureza do ativo pós marcação - ^{99m} Tc-petamibi
C18, 300 X 3,9 mm, 10 µm/UV 220 nm	Metanol:Sulfato de amônio 0,05M:Acetonitrila (45:35:20 v/v/v)	<i>^{99m}Tc-Sestamibi injection, Farmacopeia Americana 40</i>	Impureza do ativo pós marcação - ^{99m} Tc-petamibi

3.4. DTPA

O DTPA interage com o ^{99m}Tc reduzido para formar complexos com carga negativa em meio neutro ou levemente ácido. O estado de oxidação do ^{99m}Tc no complexo não é conhecido, mas tem sido relatado como III, IV e V ou uma combinação destes (ARAUJO, 2005).

O radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA, ativo ácido pentético (Figura 2) é utilizado com a finalidade de diagnóstico por imagens e para a obtenção de dados quantitativos *in vivo* da filtração glomerular. O ^{99m}Tc -DTPA é o único radiofármaco usado na rotina que é totalmente filtrado pelo glomérulo, portanto, é o único radiofármaco que pode ser usado para medir a taxa de filtração glomerular (TAYLOR, 2014). O ^{99m}Tc -DTPA é um radiotraçador renal versátil, que possibilita avaliar o fluxo sanguíneo renal, a função do parênquima, a permeabilidade do sistema coletor intra e extrarrenais. Com esse radiofármaco, pode ser avaliada a existência de estenose da artéria renal, a hipertensão renovascular e algumas complicações dos transplantes renais, principalmente as clínicas (BUCHPIGUEL E SAPIENZA, 2012; TAYLOR, 2014; ZOLLE, 2007).

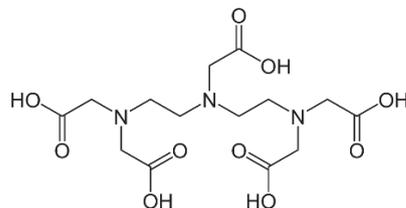


Figura 2. Estrutura do ácido pentético, ativo do radiofármaco DTPA-Tc- 99m

O DTPA-Tc- 99m não atravessa a barreira hematoencefálica intacta, por isso é utilizado para as cintilografias cerebrais na avaliação de alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica (LORBERBOYM et al, 2003; ZOLLE, 2007); para confirmação diagnóstica de morte cerebral; para a detecção de tumores do sistema nervoso central (ZOLLE, 2007); para a cintilografia da ventilação pulmonar sob a forma de aerossóis (HUR et al, 2014; TRUJILLO et al, 1997); para a detecção de sangramento gastrointestinal e para a avaliação da circulação líquórica através da cisternocintilografia radioisotópica (ZOLLE, 2007).

Após a administração, o DTPA-Tc-99m atravessa as paredes dos capilares e entra no espaço extravascular em 4 min, assim, permite acessar a perfusão renal em nível capilar (ZOLLE, 2007). A fração de filtração de primeira passagem é de 10% a 20%, nos pacientes com função renal normal, sendo menor naqueles com baixa função. O pico de captação cortical ocorre em 3 a 5 minutos após administração do radiotraçador. A excreção é dependente da taxa de filtração glomerular, cujo valor normal é de 120 mL/minuto. A meia-vida biológica do DTPA-Tc-99m é de aproximadamente 2,5 horas, com aproximadamente 95% da dose administrada, sendo eliminada em 24 horas nos indivíduos normais (EBERLEIN et al, 2011; TAYLOR, 2014; ZOLLE, 2007).

A toxicidade dos radiofármacos em geral é muito baixa, uma vez que radiofármacos raramente causam efeitos farmacológicos no corpo humano. Seja por serem farmacologicamente inertes ou porque são administrados em doses tão baixas que não tem efeitos mensuráveis (LAROCHE et al, 2015; TAYLOR, 2014). Não foram encontrados artigos relatando estudos de toxicidade para DTPA-Tc-99m.

O frasco do DTPA é composto por 10 mg de ácido pentético, ácido ascórbico, cloreto de cálcio di-hidratado e cloreto estano di-hidratado. O medicamento é disponibilizado em pó liofilizado, e após a adição do pertecnetato de sódio, torna-se uma solução límpida e sem partículas suspensas. Após ser adicionado do ^{99m}Tc esse medicamento torna-se radioativo, portanto deve ser mantido com alguns cuidados especiais como ser conservado em local onde seja mantida uma temperatura entre 15° e 30 °C, ser mantido em sua embalagem original, na hora da administração fazer uso de blindagem, luvas e óculos adequados, seu prazo de consumo após a mistura deve ser de no máximo 8 horas, após aplicados descartar rejeitos em locais adequados, seguindo normas de radioproteção (RPH-DTPA, 2017).

3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em relação a busca de métodos de análise quantitativa para o radiofármaco DTPA, na Tabela 2, está um resumo dos artigos encontrados sobre a

quantificação do ácido pentético e/ou EDTA/NTA. Na Farmacopeia Brasileira consta, desde o final do ano de 2017, monografia para o produto marcado com Tecnécio, entretanto para o *cold kit* não há informações, no texto não há referência a metodologia por CLAE. Também é possível encontrar, na Farmacopeia Americana, texto sobre o ácido pentético, que informa uma técnica de titulação para quantificar o teor.

Tabela 2. Resumo das referências encontradas para o ácido pentético e para o EDTA com os parâmetros fase móvel e coluna.

Coluna/detecção	Fase móvel	Referência
Luna C18 250 mm x 4.6 mm; 5 µm/ UV 260 nm	Mistura de acetato de sódio 0,03 mol/L, brometo de tetra-n-butilamônio 0,002 mol/L, metanol 5%; pH = 3,15	LAINE, P. e MATILAINEM, R.; 2005.
Hypersil ODS, 100 X 4.6 mm; 5 µm/UV 260 nm	Mistura de 0,0364 g de Ceftriaxona em 1 L de água ultrapura e 6,8045 g de Fosfato de potássio monobásico (50 x 10 ⁻³ mol/L). Concentração final do tampão 0,1 mol/L. pH ajustado com 4,5 com 10% de ácido fosfórico.	SILLANPÄÄ, M., KOKKONEN, R., SIHVONEN, ML.; 1995
C18 Pyramid NUCLEODUR®, 250 x 4 mm 5 µm/ UV 260 nm	Mistura de HNO ₃ 0,6 mmol/L, N(C ₄ H ₉) ₄ HSO ₄ 7,53 mmol/L, N(C ₄ H ₉) ₄ OH 2,6 mmol/L, Fe ³⁺ 37 µmol/L	MACHEREY-NAGEL; 2005
C18 Nucleosil® 250 mm x 4,6 mm; 5 µm/ UV 257 nm	Mistura de Fosfato de amônio monobásico 0,01 M: Acetonitrila: Hidróxido de tetrabutilamônio 40% (90:10:0.2) pH, 2.42	CAGNASSO, C. E., LÓPEZ, L. B., RODRÍGUEZ, V. G., VALENCIA M. E.; 2007
C18 Nucleosil® 250 mm x 4.6 mm; 5 µm/ UV 254 nm	Mistura de 2,5 g acetato de sódio anidro em aproximadamente 800 mL de água, pH ajustado para 4,0 com ácido acético. Adicionar 20 mL de hidróxido de tetrabutilamônio e o volume final ajustado para 1 litro.	BERGERS P.J.M., GROOT A.C.; 1994

CAPÍTULO I – Caracterização do ácido pentético

4. Introdução

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para validação de métodos analíticos. São reconhecidos, por órgãos como FDA, duas categorias: padrões compendiais e não compendiais, este último deve ser caracterizado.

A substância química de referência utilizada para o produto DTPA é classificada como não compendial, logo foi realizada a caracterização desta substância, através das técnicas de DSC, espectroscopia de UV, IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e massas, conforme solicitado pela RDC 166/17.

4.1. Substância química de referência e amostras

A substância química de referência de DTPA (ácido pentético) para caracterização foi adquirida do fornecedor Sigma-Aldrich® ≥99%.

4.2. Caracterização da SQR do ácido pentético

4.2.1. Espectroscopia na região do IV

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica comumente utilizada na identificação de padrões de referência, uma vez que fornece informação específica para alguns grupos funcionais da substância em análise. Foi utilizado um espectrofotômetro Perkin Elmer, realizando-se varredura entre 4000 e 400 cm⁻¹ via reflexão total atenuada (ATR).

O espectro do IV da SQR é apresentado na Figura 3 e a Tabela 3 apresenta a interpretação das principais bandas observadas.

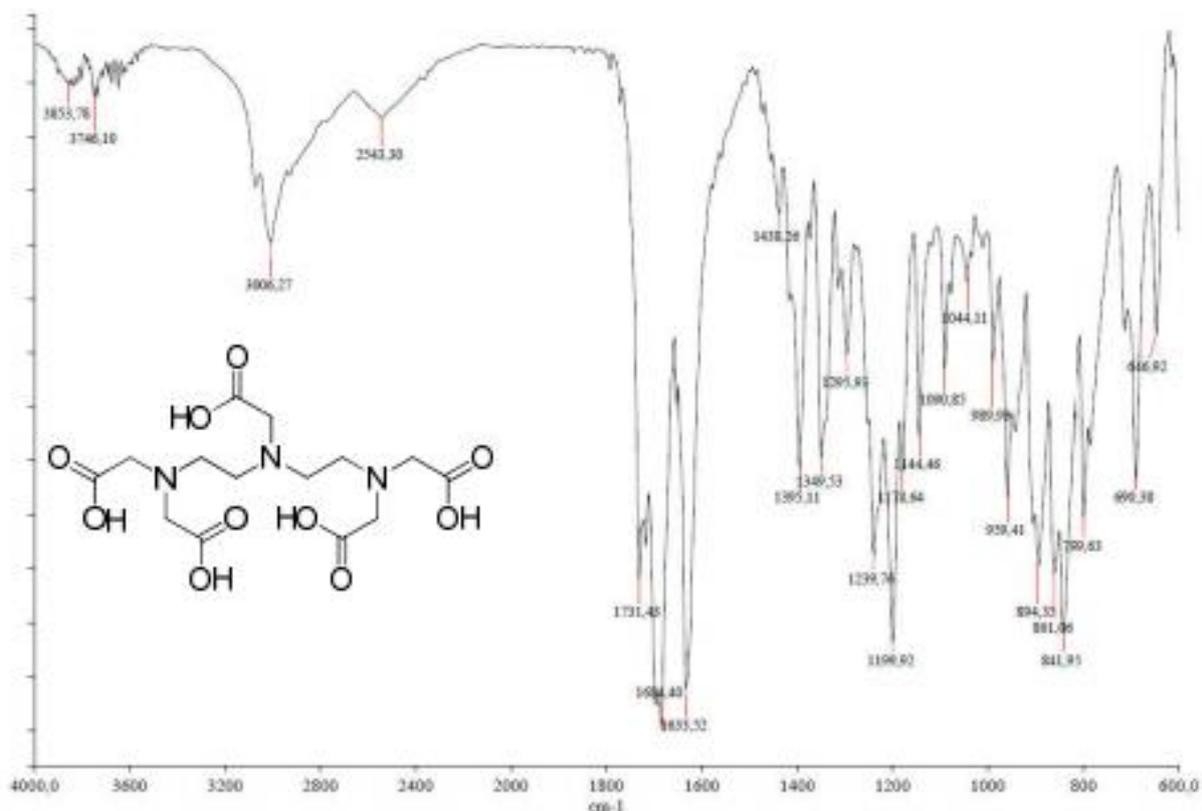


Figura 3. Espectro na região do IV do DTPA SQR.

Tabela 3. Interpretação das principais bandas do espectro de IV do ácido pentético SQR.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Comentário
3006,27	OH	grupamento ácido carboxílico
1633,52 - 1731,43	C=O	grupamento ácido carboxílico
1395,11	C-O	grupamento ácido carboxílico
1199,92 - 1239,76	C-N	carbono quaternário e nitrogênio

Conforme apresentado no espectro de infravermelho (Figura 3) podemos visualizar as principais bandas de absorção, que caracterizam alguns grupamentos específicos da molécula em estudo (SILVA, et al, 2007).

4.2.2. Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear fornece informações bastante detalhadas da estrutura das moléculas e é um método útil para a caracterização do produto desejado e de impurezas associadas (ARGENTINE et al, 2007). Foi realizada a análise básica estrutural da substância por RMN ^1H e ^{13}C no Instituto de Química, localizado no Campus do Vale, da própria Universidade. O equipamento utilizado foi um DPX 300 Bruker®. O solvente utilizado foi água deuterada.

Os dados encontrados foram de acordo com o esperado para a molécula, conforme espectro. (Figura 4 e Figura 5) E as Tabela 4 e 5 resumem e caracterizam os dados do espectro. O sinal em 4,8, aproximadamente, na Figura 2 representa a água deuterada, solvente utilizado para solubilizar a amostra (PAVIA, et al; 2008).

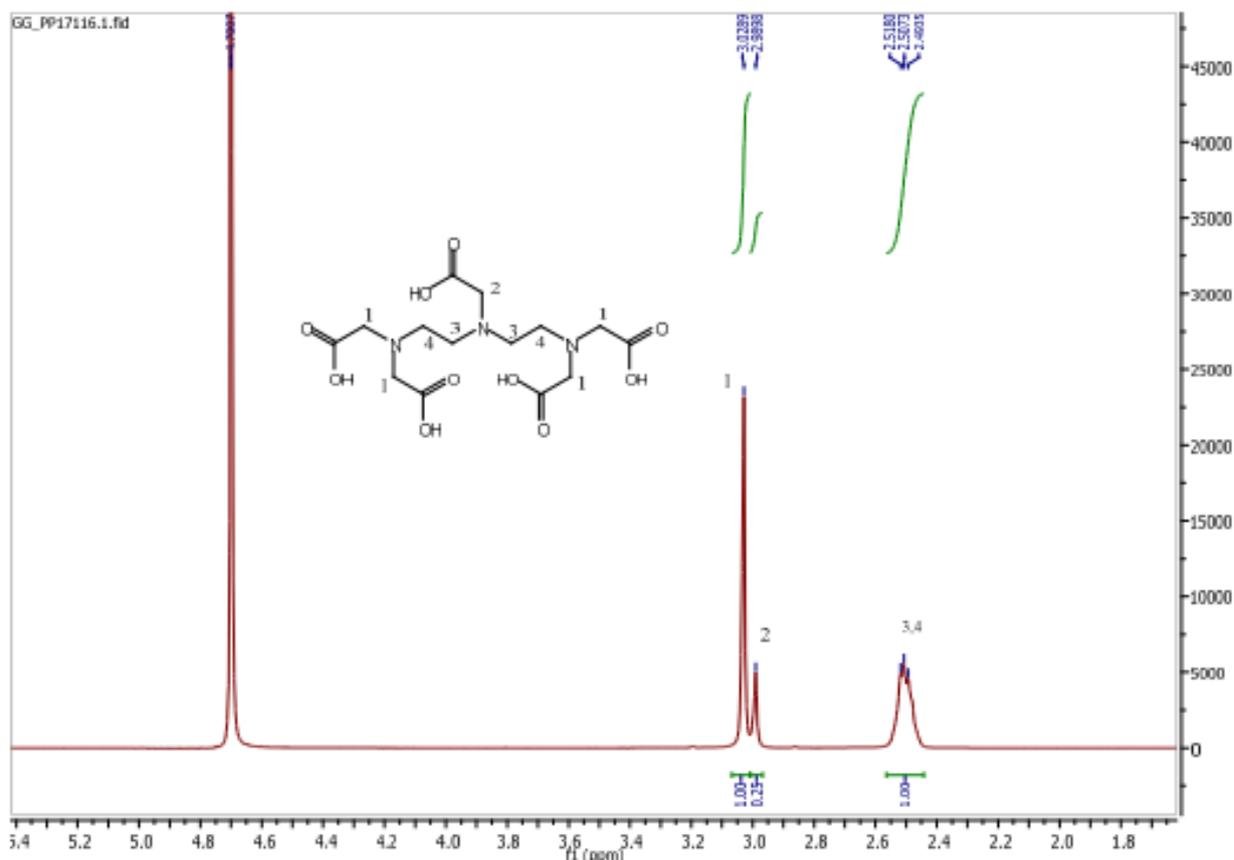


Figura 4. Apresenta o espectro de RMN ^1H e a relação dos deslocamentos químicos observados.

Tabela 4. Resumo dos dados do espectro RMN ¹H do ácido pentético SQR em água deuterada.

Hidrogênio	Deslocamento químico	Multiplicidade	Número de Hidrogênio	Interpretação
3 e 4	2,51	multiplete	8	Presença de hidrogênios alquílicos com ligação secundária a heteroatomo conferindo um sinal multiplete.
1	3,03	singleto	2	Presença de hidrogênios vizinhos ao ácido carboxílico, separados por dois ambientes - cadeia lateral
2	2,99	singleto	2	Presença de hidrogênios vizinhos ao ácido carboxílico, separados por dois ambientes - cadeia central

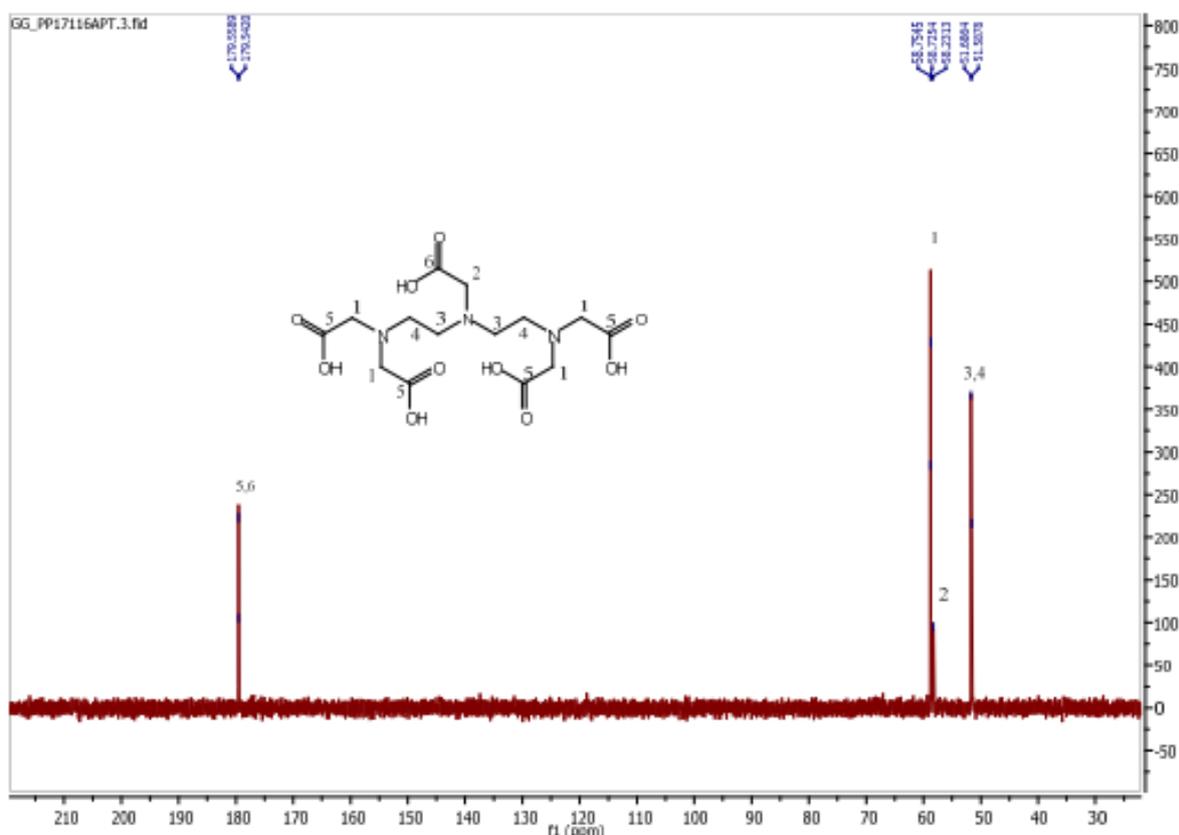


Tabela 5. Resumo dos dados do espectro RMN ¹³C do ácido pentético SQR em água deuterada.

Carbono	Deslocamento químico	Número de Carbono	Interpretação
5 e 6	179,55	5 H	Referente ao ácido carboxílico
1	58,75	4 H	CH ₂ -COOH lateral
2	58,72	1 H	CH ₂ -COOH central
3 e 4	51,68	4 H	CH ₂ -N

Conforme apresentado nas Figura 4 e 5 pode-se visualizar os principais sinais que caracterizam os grupamentos específicos da molécula em estudo (SILVA *et al.*, 2007).

4.2.3. Espectroscopia na região do UV

A espectrofotometria na região do UV-Visível é um método simples muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. Para esta caracterização, foram escolhidos o melhor solvente e o comprimento de onda para análise através da realização de uma varredura na faixa de 200 a 400 nm utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. O equipamento a ser utilizado é o espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1800.

No comprimento de onda de 210 nm, podemos verificar o pico de absorção para a molécula (Figura 6).

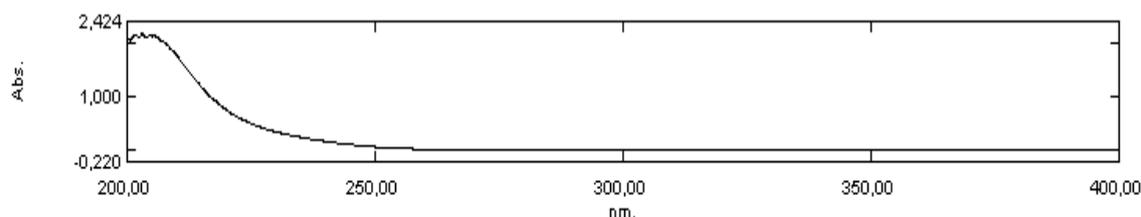


Figura 6. Espectro de UV, na concentração de 0,5 mg/mL da molécula ácido pentético SQR em água.

Conforme Laine & Matilainen, métodos sem a complexação de metais, como Ferro III ou Cobre II, não são usuais. Porém, a adição de metais na amostra torna o método mais complexo e torna-se necessário um preparo da amostra antes da análise (LAINE & MATILAINEN, 2005).

O método proposto, apenas com a solubilização em água tem o pico mais intenso próximo a 210 nm, ou seja, um comprimento de onda menos específico e com maior probabilidade de encontrar contaminantes.

4.2.4. Espectroscopia de massas

A espectroscopia de massas foi realizada utilizando-se equipamento Q-TOF Micro-Micromass acoplada a cromatógrafo líquido de ultraeficiência Waters (Acquity® UPLC).

A amostra foi analisada na concentração de 1nmol/ μ L, em uma solução de Ácido Fórmico 0,05%, através de infusão direta, com fluxo de 10 μ L/min.

A Figura 7 apresenta o espectro MS/MS do ácido pentético SQR e a Figura 8 a estrutura molecular. A interpretação do espectro se encontra na Tabela 6.

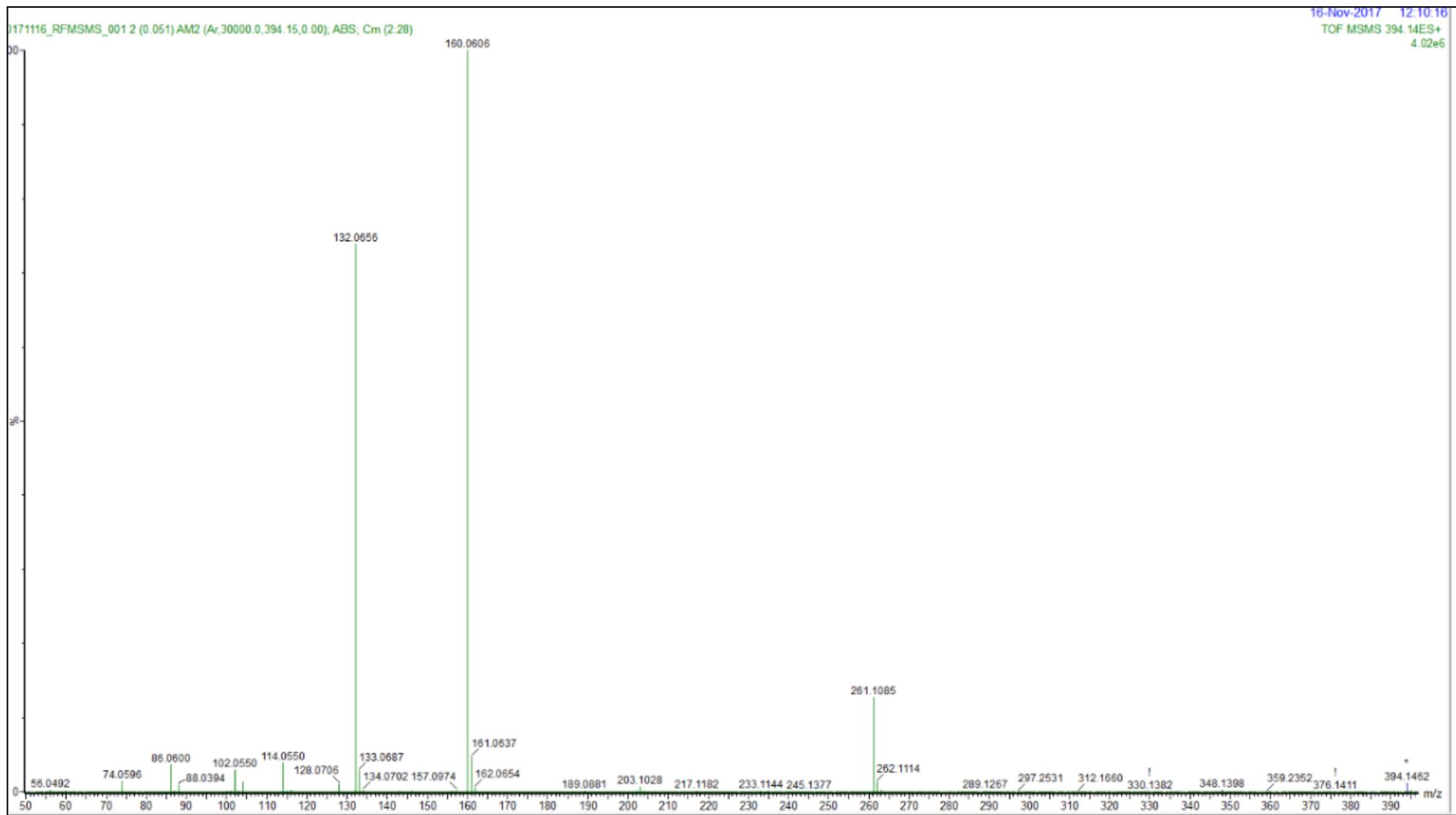


Figura 7. Espectro de massas do ácido pentético SQR.

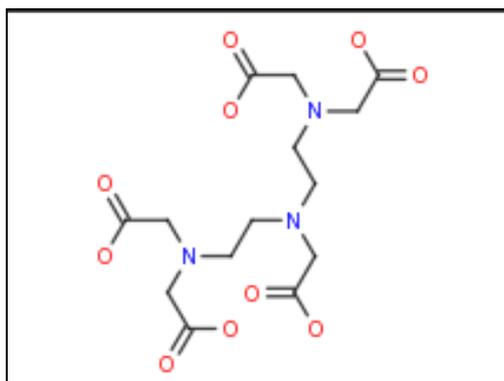
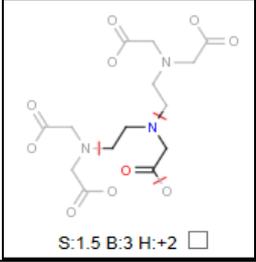
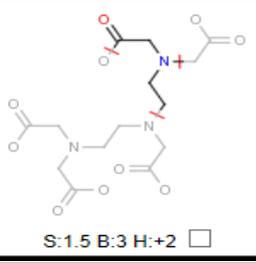
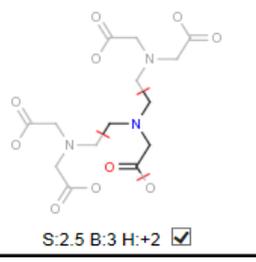


Figura 8. Estrutura molecular do ácido pentético SQR.

Tabela 6. Interpretação do espectro de massas do ácido pentético SQR.

Intensidade (Da)	Massa (Da)	Erro de massa (mDa)	Fórmula	DBE [radical]	Delta (fórmula)	Estrutura
160,0606	160,061	-0,4	C ₆ H ₁₀ NO ₄	2,5	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₆	 S:0.5 B:1 H:0 <input checked="" type="checkbox"/>
132,0656	132,0661	-0,5	C ₅ H ₁₀ NO ₃	1,5	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇	 S:1.5 B:2 H:+3 <input checked="" type="checkbox"/> S:3.0 B:2 H:+2 <input type="checkbox"/>
261,1085	261,1087	-0,2	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₆	3,5	C ₄ H ₇ NO ₄	 S:0.5 B:1 H:0 <input checked="" type="checkbox"/>

						 S:1.5 B:3 H:+2 <input type="checkbox"/>
86,0600	86,0606	-0,6	C ₄ H ₈ NO	1,5	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₉	 S:1.5 B:3 H:+2 <input type="checkbox"/>
						 S:2.5 B:3 H:+2 <input checked="" type="checkbox"/>

A análise do espectro de massas foi realizada em conjunto com o técnico da Waters (fabricante do equipamento) no dia da análise (PAVIA, et al; 2008). Apesar da literatura ser escassa, é possível encontrar dados do produto complexado com metais, principalmente Fe III, porém, de forma livre não foi encontrado bibliografia.

4.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial

O método de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que avalia o comportamento térmico da substância quando esta é submetida a um programa de temperatura controlada, ou seja, possibilita medir o fluxo de calor diferencial entre a amostra e um material de referência termicamente inerte em função da temperatura ou tempo de aquecimento (FB, 2010). Este método térmico nos fornece informações úteis para a avaliação de fármacos como o ponto de fusão, eventuais transformações polimórficas, formação de cristais, temperatura de degradação da substância ativa, dentre outros.

(MCGREGOR, 2004) A análise da SQR por este método foi realizada utilizando-se equipamento Shimadzu DSC 60 da própria Faculdade de Farmácia desta Universidade.

A Figura 9 apresenta a curva de aquecimento obtida. A amostra foi analisada em estado sólido, em porta amostra de alumínio. A taxa de aquecimento do equipamento foi de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio. O pico encontrado foi na temperatura de 227,59°C.

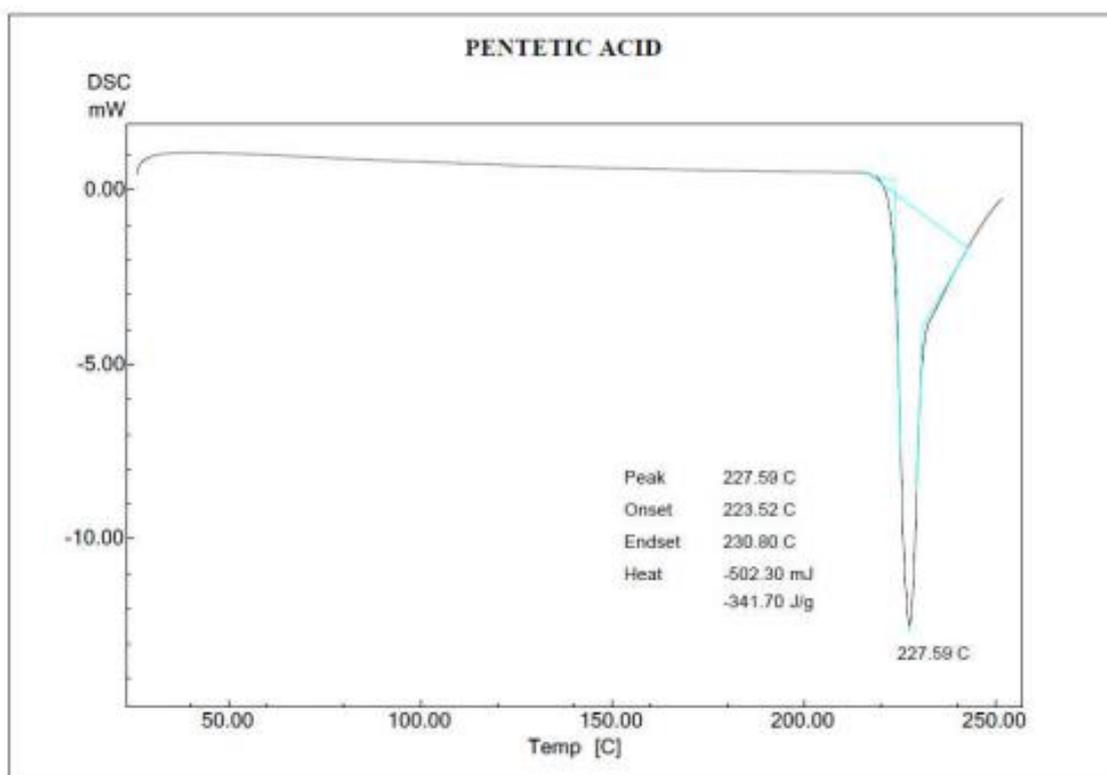


Figura 9. Curva de aquecimento obtida por DSC.

O resultado da análise de DSC da SQR de DTPA está apresentado na Figura 9. Pode-se observar que o ponto de fusão experimental foi de, aproximadamente, 227°C e o processo foi endotérmico. O referencial teórico apresenta faixa de fusão de 219 – 220°C, observando assim que o ponto de fusão da amostra está próximo ao especificado pelo certificado do fabricante.

A amostra não apresentou sinais de impureza ou degradação, pois não é possível visualizar a presença de outros picos.

4.3. Conclusão

Com base nas análises realizadas com o ácido pentético SQR pode-se confirmar a identidade e pureza descritas no laudo do fornecedor e creditaram, esta, para utilização como padrão nos estudos de validação de métodos analíticos.

CAPÍTULO II – Desenvolvimento e validação de método analítico para o produto acabado MIBI

5. Introdução

A validação de métodos analíticos é o processo que confirma o emprego de um procedimento analítico para um teste específico, visando comprovar que o método apropriado para a finalidade pretendida.

A escolha da técnica analítica a ser usada deve levar em consideração alguns aspectos como: que tipo de amostra será analisada; quais os interferentes são esperados; qual a faixa de concentração do insumo a ser analisado; sensibilidade do método; tempo de análise; entre outros.

Já está bem documentado o processo de validação. No Brasil, em 24 de julho de 2017, foi lançada uma nova RDC número 166 que substitui a antiga RE 899/2003, em ambas as resoluções os parâmetros que devem ser avaliados para doseamento do teor estão descritos, conforme Tabela 7. Neste mesmo ano também foi lançado o *Guia para tratamento estatístico da validação analítica*. Estes documentos seguem de embasamento para a elaboração de um plano de validação e sua documentação (BRASIL, 2017).

Tabela 7. Segundo a RDC 166/2017, métodos validados devem atender aos seguintes parâmetros.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	-dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim ⁽¹⁾	não	sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não ⁽³⁾	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não ⁽³⁾
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

5.1. Parte experimental

5.1.1. Equipamentos e reagentes

O método proposto foi desenvolvido e validado em cromatógrafo líquido Thermo/Dionex® – modelo UltiMate 3000. O *software* utilizado foi o *Chromeleon CDS*. O equipamento conta com um sistema composto por uma bomba, detector UV com quatro canais, forno para coluna, auto-injetor e amostrador automático.

Os outros equipamentos rotineiramente utilizados foram: balança analítica (Shimadzu, AY220) e agitador magnético (IKA).

Como solventes foram utilizados acetonitrila e metanol grau HPLC (Sigma®), água ultrapura produzida pelo sistema de água *Milli-Q* e tampão sulfato de amônio (Merck).

Os *cold kits* foram adquiridos do Grupo RPH®, cada frasco contém 1,0 mg de ativo (Sestamibi) em forma de pó liofilizado e cada kit é composto por 5 frascos; foram utilizados 10 kits. O padrão de referência foi adquirido da Farmacopeia Europeia (EDQM – código Y0001748 - *Copper tetramibi tetrafluoroborate*).

5.1.2. Condições cromatográficas

Cada frasco é composto por 4 excipientes e um ativo, conforme Tabela 8. Para o preparo das soluções foi adicionado 5,0 mL de água ultrapura no frasco original do produto acabado. As soluções analisadas por CLAE foram previamente filtradas com filtro de membrana com poro nominal de 0,45 µm. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 9.

Tabela 8. Composição por frasco de produto acabado MIBI.

Composição	Quantidade/frasco
Tetrafluorborato tetramibi cuproso	1,0 mg
Citrato de sódio	5,0 mg
Cloreto estanoso di-hidratado	0,13 mg
Cloridrato de cisteína monoidratado	1,11 mg
Manitol	20,0 mg

Tabela 9. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para o produto MIBI.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	metanol:tampão sulfato de amônio 0,025M:acetonitrila 20:20:60.
Fluxo	1,5 mL/min
Coluna	C18 Nucleodur (MACHEREY-NAGEL)
Detecção	UV 210 nm
Temperatura forno	20°C
Temperatura amostrador	6 °C
Volume injetado	10 µL

5.1.3. Preparo das soluções

- Preparo da solução estoque padrão

A solução estoque foi preparada com pesagem de 10 mg da SQR em frasco de vidro e transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado

com água ultrapura. A solução resultante, com concentração de 1 mg/mL, foi fracionada em *ependorfs*® e armazenada entre freezer.

- Preparo da amostra

Produto acabado (*cold kit*)

Em um frasco de produto acabado se adicionou 5,0 mL de água MilliQ, utilizando pipeta volumétrica. Obteve-se uma concentração de 200 µg/mL (concentração de trabalho representa 100%). Aliquotou-se aproximadamente 1,0 mL desta solução, filtrou-se para um vial com um filtro de 0,45 µm e então foi colocado no equipamento para que ocorresse o processo de injeção automática de 10 µL de amostra. As injeções foram realizadas em triplicata.

5.1.4. Validação do método analítico

De acordo com a RDC 166/2017, foram analisados os parâmetros de:

- **Seletividade:**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Critério de aceitação: o método não pode ter interferências significativas nas análises de quantificação do ativo. Permite-se interferência de no máximo 2,0%. No caso de interferências com mais de 2,0%, estuda-se a aplicação de comprimentos de ondas alternativos, fator de correção, espectrofotometria com segunda derivada ou um método analítico alternativo e com maior poder discriminatório.

A pureza do pico foi avaliada através da comparação do espectro registrado no ápice do pico com os espectros registrados dentro do pico cromatográfico. Utilizando o *software Chromeleon*, se estabeleceu os parâmetros de aquisição e integração do pico. Foi realizada correção da linha

de base utilizando faixa do cromatograma próxima ao pico de interesse onde não havia picos.

- Preparo dos excipientes e do placebo

- **Citrato de sódio:** pesou-se 29 mg e solubilizou-se em 5,0 mL de água ultrapura em um balão volumétrico.

Foram reservados 0,4 mL para preparo do placebo. Se retirou uma alíquota de 1,72 mL da solução a 5,8 mg/mL e se completou com 8,27 mL de água em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma concentração final de 1 mg/mL.

- **Cloreto estanoso:** foi pesado 3,5 mg e solubilizado em 5,0 mL de água ultrapura. Foram reservados 0,4 mL para preparo do placebo. Se retirou uma alíquota de 1,86 mL da solução a 0,7 mg/mL e se completou com 8,14 mL, obtendo uma concentração de 0,13 mg/mL.

- **Manitol:** foi pesado 101 mg e solubilizado em 5,0 mL de água ultrapura. Foram reservados 0,4 mL para preparo do placebo.

Se retirou uma alíquota de 1,98 mL da solução a 20,2 mg/mL e se completou com 8,02 mL, obtendo uma concentração de 4 mg/mL.

- **L-cisteína** (amostra pura): foi pesado 1,15 mg e solubilizado em 5,0 mL de água ultrapura. Concentração final: 0,23 mg/mL.

- **L-cisteína** (placebo): foi pesado 7,27 mg e solubilizado em 5,0 mL.

Após o preparo de cada solução, com auxílio de uma seringa e um filtro de, no mínimo, 0,45 µm, filtrou-se 1,5 mL de cada solução para diferentes vials (cada solução em um *vial*).

Para o preparo do placebo juntou-se os 0,4 mL de citrato de sódio, de cloreto estanoso e de manitol e 0,55 de L-cisteína. Resultando em 1,75 mL então completou-se para 2,0 mL. A solução final foi filtrada (filtro 0,45 µm) para um vial.

- **Linearidade:**

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de ativo na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Procedimento: a linearidade é determinada pela realização de três curvas com intervalo de 80% a 120% e concentração estabelecida em $\mu\text{g/mL}$, através da análise de no mínimo 05 pontos em concentrações diferentes (realizar as corridas em triplicata).

Critério de aceitação: a análise de regressão linear deve fornecer um coeficiente de correlação linear (R) maior que 0,99. Devem-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

- Preparo da curva padrão

Cada concentração foi preparada com três réplicas no dia da análise em balões de 5 mL.

Para o ponto 1 (80%): retirou-se 0,8 mL da solução mãe (1 mg/mL) e completou-se com 4,2 mL de água ultrapura.

Para o ponto 2 (90%) retirou-se 0,9 mL da solução mãe (1 mg/mL) e completou-se com 4,1 mL de água ultrapura.

Para o ponto 3 (100%) retirou-se 1,0 mL da solução mãe (1 mg/mL) e completou-se com 4,0 mL de água ultrapura.

Para o ponto 4 (110%) retirou-se 1,1 mL da solução mãe (1 mg/mL) e completou-se com 3,9 mL de água ultrapura.

Para o ponto 5 (120%) retirou-se 1,2 mL da solução mãe (1 mg/mL) e completou-se com 3,8 mL de água ultrapura.

- **Intervalo:**

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Para a

determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, o intervalo varia de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

Logo, para o tetrafluorborato tetramibi cuproso (sestamibi) os valores variam de 160 µg/mL a 240 µg/mL, sendo a concentração teórica de 200 µg/mL.

Critério de aceitação: o método deve quantificar corretamente e de forma linear dentro do intervalo estabelecido.

- **Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para avaliar a precisão realizam-se dois testes, um deles é a repetibilidade e o outro a precisão interdias ou intermediária.

Cada preparação foi feita isoladamente, as concentrações utilizadas foram de 0,160 mg/mL, 0,200 mg/mL e 0,240 mg/mL. Foram separados 3 frascos de produto acabado e diluídos com 6,25 mL, 5,0 mL e 4,17 mL de fase móvel; para isso foram utilizadas pipetas volumétricas de 10 e 5 mL.

Critério de aceitação: o valor máximo aceitável para o DPR é de 5%.

- **Exatidão:**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da seletividade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada.

Cada preparação foi feita isoladamente, as concentrações utilizadas foram de 0,160 mg/mL, 0,200 mg/mL e 0,240 mg/mL. Foram separados 3 frascos de produto acabado e diluídos com 6,25 mL, 5,0 mL e 4,17 mL em água; para isso foram utilizadas pipetas volumétricas de 10 e 5 mL.

- **Robustez:**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o que indica a sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Para este método foram escolhidos os parâmetros de fluxo e temperatura do forno da coluna.

Cada preparação foi feita isoladamente, a concentração utilizada foi de 0,200 mg/mL. Foram separados 3 frascos de produto acabado e diluídos com 5,0 mL de água; para isso foram utilizadas pipetas volumétricas de 5 mL.

5.2. Resultados e discussões

5.2.1. Desenvolvimento do método por CLAE

A Farmacopeia Europeia possui um capítulo referente ao ativo do *cold kit*. O método descrito no texto é para o ensaio de substâncias relacionadas, este método utiliza como fase móvel uma mistura de ACN:Tampão fosfato de potássio dihidrogenado (40:60), fluxo de 1,0 mL/min e coluna C18. Já para o produto marcado, as Farmacopeias Americana e Europeia trazem, como fase móvel uma mistura de ACN:Metanol:tampão sulfato de amônio. Com isso em mente, o desenvolvimento partiu dessa mistura de fase móvel com diferentes proporções em coluna C18.

O método é passível de otimização, mas apresenta resultados satisfatórios para a necessidade da indústria.

5.2.2. Estudo de estabilidade da solução estoque

A estabilidade do medicamento após preparação deve ser avaliada. Neste estudo, as amostras SQR foram avaliadas a fim de determinar a estabilidade da solução estoque da SQR nas condições ambientais do laboratório.

A solução estoque foi preparada em água ultrapura e mantida em freezer, apresentando estabilidade de pouco menos que 60 dias. Esta preparação apresentou diminuição do teor após transcorridos os 60 dias, ficando em torno de 88%. O diluente (água) não apresenta picos adicionais, também não é perceptível a presença de novos picos após os 60 dias.

5.2.3. Conformidade do sistema

Está amplamente descrito na literatura os parâmetros recomendados para avaliar a conformidade do sistema. Na Tabela 10 estão descritos os critérios de acordo com Shabir, 2003 e o resultados encontrados experimentalmente. Esses resultados foram informados pelo *software* do equipamento. Em relação aos pratos, o valor encontrado foi abaixo do recomendado devido ao tempo de uso da coluna, em torno de 2 anos com uso em desenvolvimento de outras metodologias.

Tabela 10. Parâmetros de conformidade recomendados e obtidos experimentalmente (SHABIR, 2003).

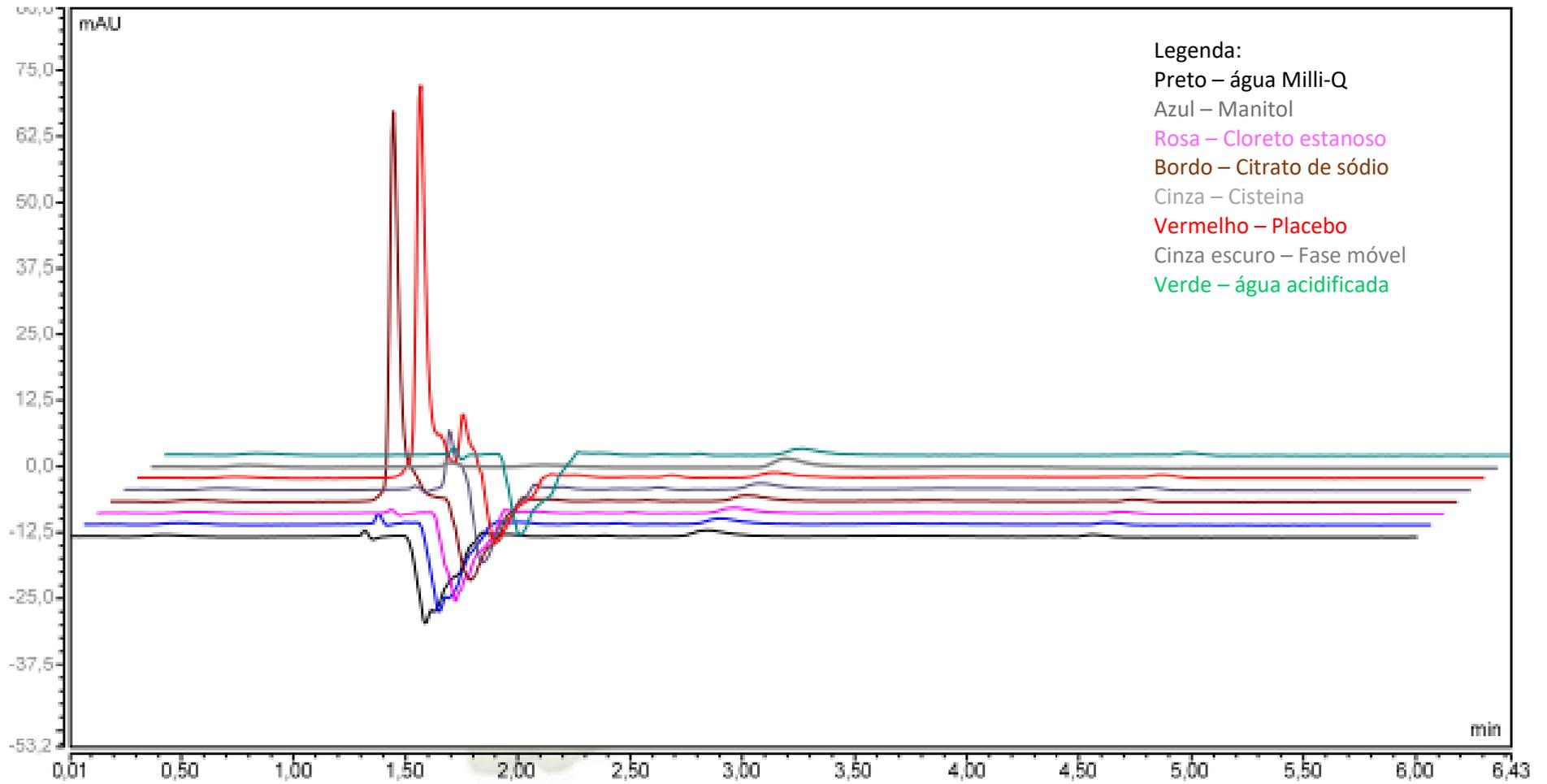
Parâmetro	Recomendação	Valor experimental
Fator de retenção (K')	O pico deve estar bem separado dos outros picos e do pico não-retido. $K > 2$	> 2

Repetibilidade das injeções	Análise das áreas dos picos. DPR < 1% para n > 5	1%
Resolução (Rs)	Rs>2 entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo	2,2
Assimetria (TF)	TF < 2. Picos muito assimétricos afetam a quantificação	0,6
Pratos	Em geral, deve ser maior que 2000 para CLAE	~ 1600

5.2.4. Seletividade

O cromatograma da solução placebo (todos os excipientes juntos e isolados), da solução diluente, da fase móvel e do padrão estão apresentados nas Figuras 10, 11, 12 e 13 respectivamente. Através da comparação dos cromatogramas verifica-se que componentes do placebo possuem tempo de retenção baixo (<2 min). Além disso, pode-se notar a sobreposição de picos do diluente e do placebo. O tempo de retenção do Sestamibi foi de 2,5 min, ficando claro que os excipientes não interferem no pico do radiofármaco.

8.a



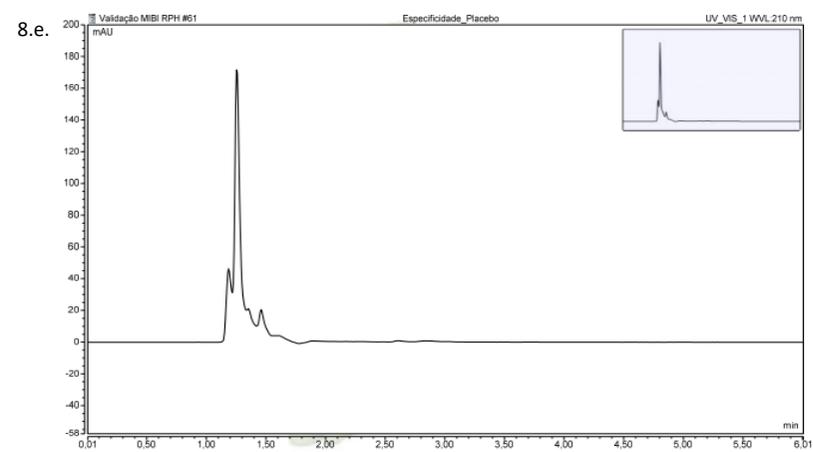
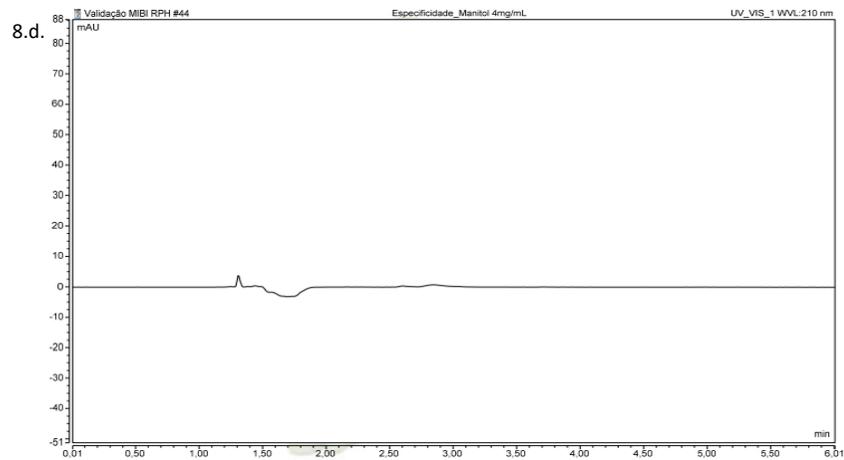
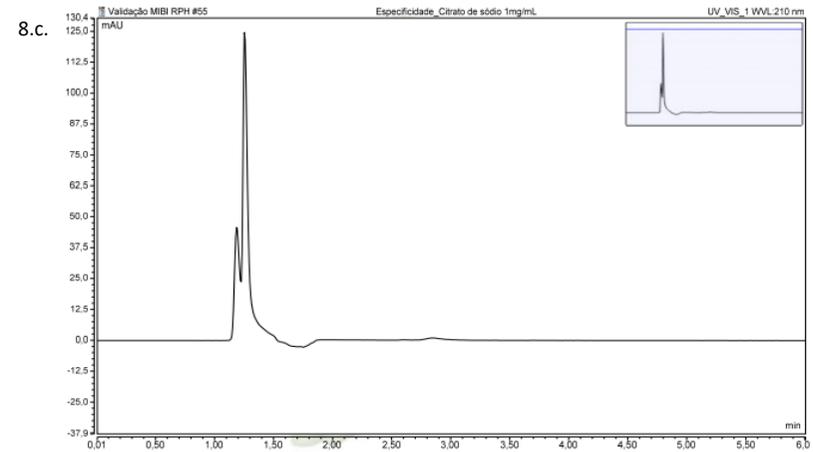
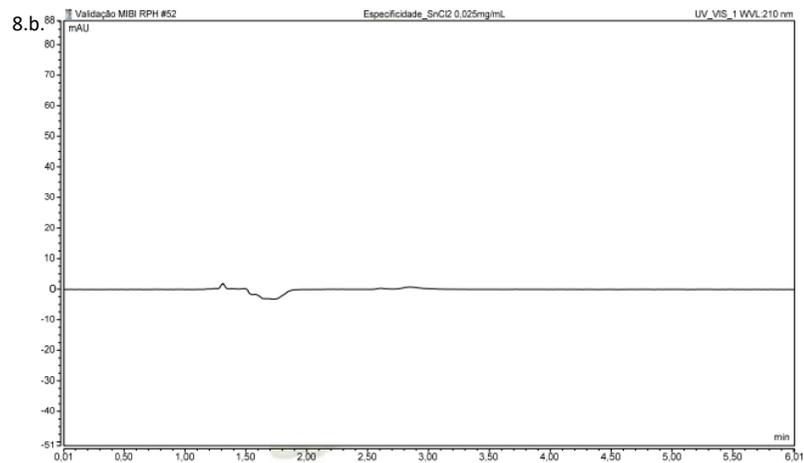


Figura 10a Cromatograma do placebo (todos os excipientes juntos sobrepostos) e cromatograma dos excipientes isolados: 10b. Cloreto estanso 10c. Citrato de sódio 10d. Manitol 10e. Placebo (todos os excipientes sem o ativo)

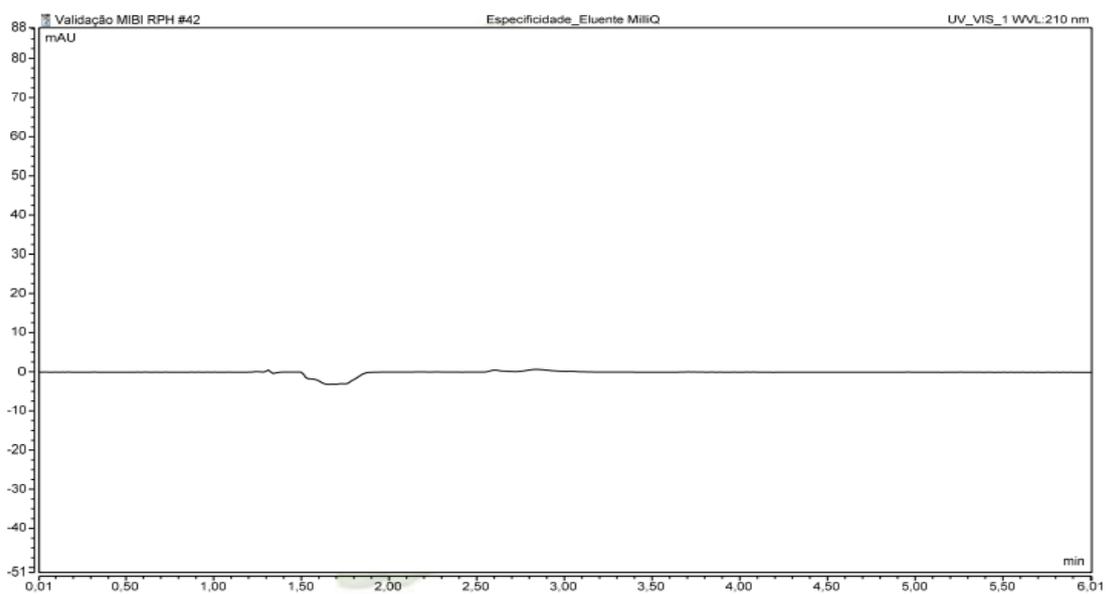


Figura 11. Cromatograma do diluente (água ultrapura)

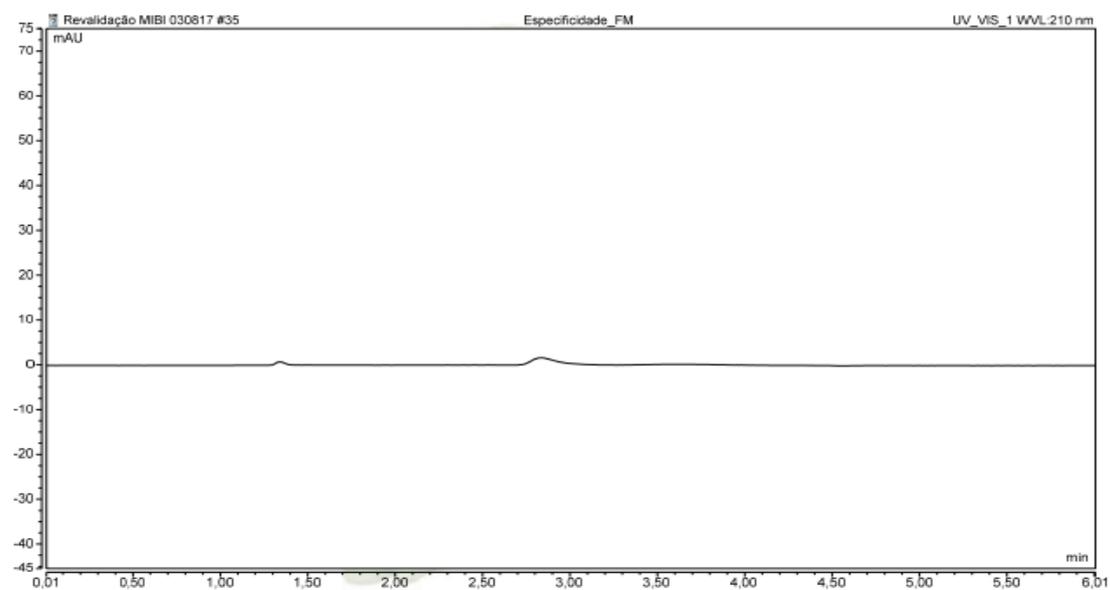


Figura 12. Cromatograma da fase móvel: metanol : tampão sulfato de amônio 0,025M : acetonitrila 20:20:60.

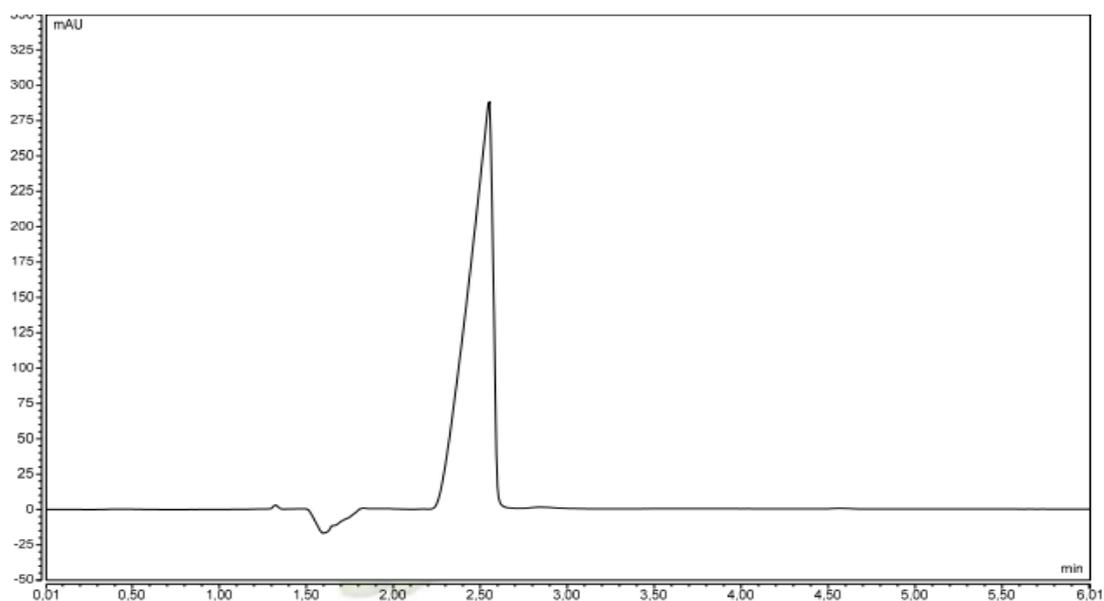


Figura 13. Cromatograma do Sestamibi SQR a 0,2 mg/mL em fase móvel (metanol:tampão sulfato de amônio 0,025M:acetonitrila 20:20:60) com fluxo de 1,5 mL/min

Desta forma, depois de realizadas as análises no diluente, na fase móvel, nas soluções de citrato de sódio, de cloreto estanoso, de L-cisteína, de manitol e do placebo não foram detectados picos interferentes. O sestamibi teve um tempo de retenção de aproximadamente 2,50 minutos. A seletividade do método proposto é assegurada, pois o placebo não influenciou a análise do fármaco.

5.2.5. Linearidade

As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados obtidos no estudo da linearidade com soluções da curva padrão.

Tabela 11. Valores experimentais da concentração para as três curvas padrão de MIBI obtidas por CLAE.

Pontos da curva	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração curva 1*	Concentração curva 2*	Concentração curva 3*
1	160	160,30	165,08	166,35
2	180	180,94	185,32	187,44
3	200	198,58	205,90	208,94
4	220	218,82	223,71	225,10
5	240	241,36	250,45	247,06

*Cada valor é a média de três injeções.

Tabela 12. Valores experimentais das áreas para as três curvas padrão de MIBI obtidas por CLAE.

Pontos da curva	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área curva 1*	Área curva 2*	Área curva 3*
1	160	37,81	38,99	39,30
2	180	42,90	43,98	44,50
3	200	47,24	49,05	49,80
4	220	52,23	53,44	53,78
5	240	57,79	59,03	59,19

*Cada valor é a média de três injeções.

A Figura 14 apresenta a sobreposição das 3 curvas padrão obtidas pelo método.

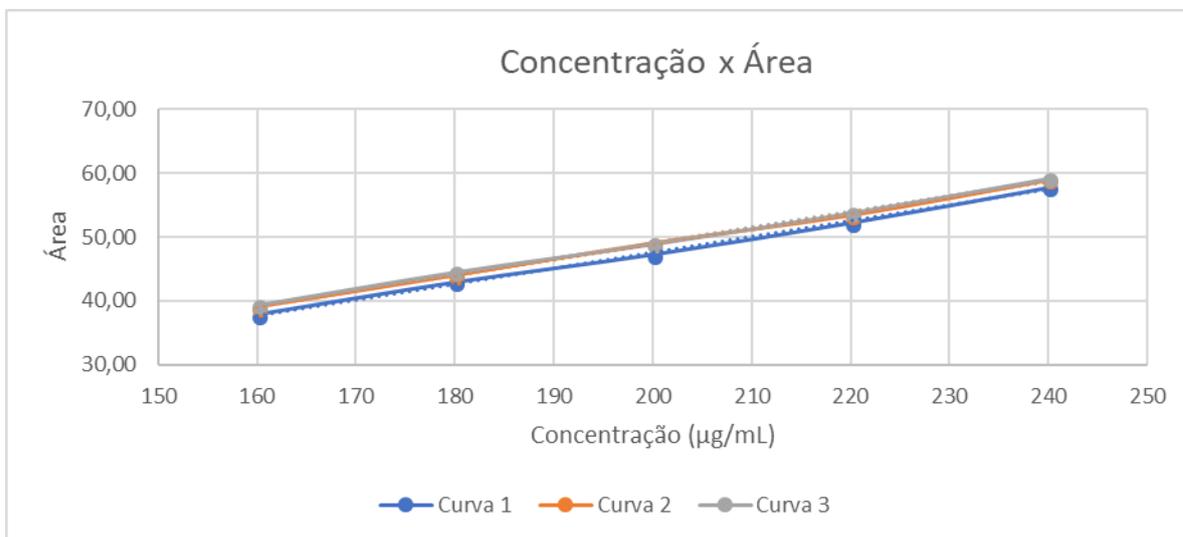


Figura 14. Gráfico demonstrando a interpolação das curvas obtidas por CLAE, concentração x área.

A equação da reta é estabelecida por:

Equação da reta: $Y=AX+B$

Onde: **Y** = resultado da amostra; **A** = coeficiente angular; **X** = concentração teórica; **B** = intersecção da reta. A Tabela 13 apresenta as equações das retas e valor de r. O valor de $r > 0,99$ demonstra a forte relação verificada entre a concentração e a resposta do equipamento (área do pico).

Tabela 13. Equações das retas das três curvas de padrão.

Curva 1:	Curva 2:	Curva 3:
$y = 0,2464x+1,6878$	$y=0,2577x+2,4389$	$y=0,2453x+0,2557$
$R^2 = 0,9984$	$R^2 = 0,9959$	$R^2 = 0,998$
$r = 0,9992$	$r = 0,9990$	$r = 0,9989$

A validade do modelo de regressão linear e a significância estatística da reta ajustada foram testadas por da Análise de Variância (ANOVA), conforme descrito por PIMENTEL & NETO (1996). A partir dos dados da ANOVA (Tabela 14) pode-se afirmar que a regressão linear foi significativa, com $F = 851$, e que não ocorreu desvio da linearidade, visto que o F calculado (2,04) para esta fonte de variação foi menor que o F tabelado (3,71).

Tabela 14. Teste de análise da variância para o ajuste do modelo linear. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de MIBI por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F(calc)
Entre concentrações	4	729,54142	182,38536	214,16
Regressão Linear	1	724,32996	724,32996	851
Desvio da Linearidade	3	5,21146	1,73715	2,0398
Dentro (resíduo)	10	8,51640	0,85164	
Total	14	738,05782		

Os resultados descritos para linearidade foram adequados, podendo-se afirmar que o método proposto possui linearidade no intervalo de concentração (160 – 240 $\mu\text{g/mL}$).

5.2.6. Precisão

A Tabela 15 apresenta os resultados da precisão e apresentam a baixa variabilidade obtida entre os resultados de um mesmo dia. Os valores de DPR para todos os dias foram menores que 2,0% indicando que o método possui repetibilidade.

Tabela 15. Resultados da precisão por CLAE para análise de MIBI em produto acabado.

	Dia 1	Dia 2**
	100,74	101,10
	100,02	101,11
	99,91	101,21
Porcentagem encontrada (%)	97,50	98,97
	97,75	98,90
	97,84	98,58
	99,55	100,70
	99,65	100,76
	99,48	100,42
Média	99,16	100,19
DPR	1,16%	1,07%
Média geral	99,68%	
DPR	1,21%	

**Análise realizada por outro analista, no mesmo equipamento.

5.2.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Os resultados da exatidão estão apresentados na Tabela 16. A porcentagem média encontrada no estudo de exatidão foi de 99,7% e o intervalo de confiança de 95% calculado foi de 99,9 – 101,1%. Estes resultados demonstram que o método possui exatidão no intervalo da linearidade, além de precisão. Isto indica que os excipientes presentes não influenciam a quantificação do fármaco.

Tabela 16. Resultados do estudo de exatidão por CLAE para o produto MIBI.

Concentração (µg/mL)	Porcentagem encontrada (%)	Média (%)	DPR (%)
160	100,23	100,68	0,65
	101,14		
200	97,69	98,25	0,79
	98,82		
240	99,56	100,09	0,76
	100,63		
Média		99,68	1,27

5.2.8. Robustez

A robustez pode ser definida como a habilidade do método em reproduzir, sem diferenças não previstas, os resultados obtidos em diferentes laboratórios ou circunstâncias.

O teste de robustez foi realizado após verificação da seletividade. Foi utilizada solução de sestamibi SQR (200 µg/mL) e a Tabela 17 resume os resultados obtidos.

Os parâmetros avaliados foram alteração no fluxo de 1,5 para $\pm 0,1$ mL/min e alteração da temperatura de forno de 20 °C para $\pm 5^\circ\text{C}$. Além disso, foi avaliado o teor do produto e comparado com as condições normais.

Tabela 17. Resultados do teste de robustez para método proposto por CLAE para o produto acabado MIBI. Os resultados são a média de 4 resultados.

Alterações	Parâmetros	Fator de retenção	Resolução	Assimetria	Pratos
	1,4	2,306	2,14	0,85	1419

Vazão de fase móvel	1,6	2,413	2,20	0,61	1410
Temperatura forno	15°C	2,65	2,48	0,61	1210
	25°C	2,50	2,45	0,62	1630

O fator de retenção obviamente variou com a troca de vazão, mas também com a temperatura do forno onde fica a coluna, essa resposta tem ligação com a eficiência da coluna em diferentes temperaturas. O tempo do pico variou de 2,30 a 2,65. Em relação a resolução observa-se variação na resolução, porém nenhum parâmetro mostrou-se capaz de afetar a quantificação do sestamibi no produto acabado. A assimetria manteve-se com valores baixos, abaixo do máximo recomendado. E, por fim, o número de pratos que, apesar de apresentar valores abaixo do recomendado por Shabir (2003), para o teste de robustez não houve alteração significativa para os parâmetros testados, com exceção a diminuição da temperatura do forno, o que, novamente, demonstra uma eficiência da coluna em temperaturas mais altas.

A análise dos resultados confirma a robustez do método proposto em relação aos parâmetros analisados.

5.3. Conclusões

A análise do Sestamibi por CLAE demonstrou o potencial desta técnica em identificar e quantificar o ativo no produto acabado. A aquisição e tratamento dos dados com auxílio do programa *Chromeleon* permitiu, com facilidade, a obtenção e determinação de parâmetros cromatográficos relevantes como fator de retenção, resolução entre picos, assimetria.

Em relação à seletividade, visto que, não houve picos interferentes, o método foi considerado específico. O método mostrou-se também, linear dentro da faixa de concentração estudada (intervalo 160 µg/mL a 240 µg/mL). A partir dos resultados encontrados, conclui-se que o método se mostrou preciso intra e interdias com DPR menor que 2% e exato.

No que se refere à robustez, o método mostrou-se robusto frente às alterações testadas, não apresentando alterações significativas com pequenas modificações nos parâmetros de análise.

Em relação a solução padrão restante, foram feitas análises quinzenais por aproximadamente dois meses, onde se percebeu que ao final desse tempo o teor reduzia para aproximadamente 88%, o que sugere que em solução a estabilidade do produto é de dois meses.

Por fim, os resultados satisfatórios dos parâmetros de desempenho analítico, validam o método proposto para identificação e quantificação do ativo no cold kit. Devido a imensa importância do produto MIBI para a medicina nuclear e para a empresa, a fim de registrar o produto, o fruto desse trabalho é de grande contribuição.

**CAPÍTULO III – Desenvolvimento e validação de método analítico
para a matéria prima ácido pentético**

6. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica que agrega precisão e sensibilidade à capacidade de separação, sendo muito aplicada para análise de formulações de medicamentos.

Foi proposto, neste trabalho, o desenvolvimento e a validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (PDA) para a determinação de DTPA na forma farmacêutica de pó liofilizado, sem a necessidade de complexação com metais, tornando mais rápida e simples a análise. Entretanto, para o produto acabado, não foi possível desenvolver um método simples. Inúmeras tentativas foram testadas, mas nenhum resultado satisfatório foi obtido.

É sugerido então, um método para a quantificação da matéria prima ácido pentético por CLAE. A validação compreendeu a avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, limites de detecção de limites de quantificação, precisão, exatidão e robustez, seguindo as guias tradicionalmente utilizadas (BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP 38, 2015). Para tanto, os parâmetros de adequabilidade do sistema, como número de pratos, resolução e assimetria foram avaliados durante o desenvolvimento do método, a fim de alcançar as melhores condições.

Os testes preliminares para o DTPA, produto acabado e princípio ativo, foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu®, modelo Class VP. Para validação foi utilizado um cromatógrafo Thermo® Dionex – Ultimate 3000.

Foi realizado um estudo preliminar de estabilidade para a matéria prima. As amostras foram submetidas a fatores de degradação como luz (radiação UVA e UVC), temperaturas elevadas (primeiramente, 40 °C) e os meios ácido (HCl 0,1 M), básico (NaOH 0,1 M), a fim de determinar frente a quais é mais sensível e com que magnitude. Estes fatores são descritos na literatura como capazes de promover reações químicas que provocam a decomposição da maioria dos fármacos (NUDELMAN, 1975, BRASIL, 2015).

6.1. Validação do método para o ativo ácido pentético

6.1.1. Desenvolvimento do método

Após muitas tentativas para se encontrar um método para o *cold kit* DTPA observou-se que encontramos diversos métodos para a quantificação do ativo. O método escolhido para essa quantificação foi o descrito na Tabela 18. Isso porque foi o que apresentou um conjunto de parâmetros mais adequados, como pratos, assimetria, entre outros.

Em relação ao doseamento do ativo – ácido pentético – além das referências apresentadas na Tabela 2., a Farmacopeia Americana traz um método por titulação. Para a indústria, apesar da titulação ser um método simples, demanda a atenção de uma pessoa de forma integral para a realização do ensaio, já o uso de CLAE, após o preparo da amostra o colaborador dispõe de mais tempo para realizar outras funções enquanto o equipamento está funcionando.

Sendo assim, foi validado o método por CLAE para a quantificação do ativo, a fim de se avaliar a matéria prima – ativo – para liberação do uso para produção do *cold kit*.

A primeira parte do trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico dos métodos para o radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA, entretanto não foi encontrado nenhum material para essa quantificação. Se continuou a procura por artigos para o ativo – ácido pentético – e por estruturas similares, por exemplo o EDTA.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Equipamentos e reagentes

O método proposto foi desenvolvido e validado em cromatógrafo líquido Thermo/Dionex® – modelo UltiMate 3000. O *software* utilizado foi o *Chromeleon CDS*. O equipamento conta com um sistema composto por uma

bomba, detector UV com quatro canais, forno para coluna, auto-injetor e amostrador automático.

Os outros equipamentos rotineiramente utilizados foram: balança analítica (Shimadzu) e agitador magnético (IKA).

Como solventes foi utilizado fosfato de sódio monobásico e hidróxido de tetrametilamônio, ambos da marca SigmaAldrich®.

Os *cold kits* testados foram adquiridos do Grupo RPH®, cada frasco contém 10 mg de ativo (ácido pentético) em forma de pó liofilizado e cada kit é composto por 5 frascos; foram utilizados 20 kits. O padrão de referência foi caracterizado e a matéria prima adquirida pela SigmaAldrich®.

6.2.2. Condições cromatográficas

As soluções analisadas por CLAE foram previamente filtradas com filtro de membrana com poro nominal de 0,45 µm. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 18.

Tabela 18. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	TMAH/fosfato de sódio monobásico – pH 3,0 - com ácido fosfórico
Vazão	0,8 mL/min
Coluna	Zorbax Sb-aq
Deteção	Luz ultravioleta em 210 nm
Temperatura forno	20°C
Temperatura amostrador	25 °C
Volume injetado	20 µL
Software	Chromeleon 7.0

Os parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados estão na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros de adequabilidade do sistema para a matéria prima ácido pentético a 1 mg/mL

Parâmetro	Recomendação	Valor experimental
Fator de retenção (K')	O pico deve estar bem separado dos outros picos e do pico não-retido. $K > 2$	3,49
Repetibilidade das injeções	Análise das áreas dos picos. DPR < 1% para $n > 5$	0,21% para $n = 6$
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo	-
Assimetria (TF)	TF < 2. Picos muito assimétricos afetam a quantificação	1,22
Pratos	Em geral, deve ser maior que 2000 para CLAE	8563

6.2.3. Preparo das soluções

- Preparo da solução estoque padrão

A solução estoque foi preparada com pesagem de 10 mg da SQR em frasco de vidro e transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com fase móvel. A solução resultante, com concentração de 1 mg/mL, foi fracionada em eppendorfs e armazenada entre freezer.

6.2.4. Validação do método analítico

De acordo com a RDC 166/2017, foram analisados os parâmetros de:

- **Seletividade:**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Critério de aceitação: o método não pode ter interferências significativas nas análises de quantificação do ativo. Permite-se interferência de no máximo 2,0%. No caso de interferências com mais de 2,0%, estuda-se a aplicação de comprimentos de ondas alternativos, fator de correção, espectrofotometria com segunda derivada ou um método analítico alternativo e com maior poder discriminatório.

A pureza do pico foi avaliada através da comparação do espectro registrado no ápice do pico com os espectros registrados dentro do pico cromatográfico. Utilizando o *software Chromeleon*, se estabeleceu os parâmetros de aquisição e integração do pico. Foi realizada correção da linha de base utilizando faixa do cromatograma próxima ao pico de interesse onde não havia picos.

- **Linearidade:**

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de ativo na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Procedimento: a linearidade é determinada pela realização de três curvas com intervalo de 80% a 120% e concentração estabelecida em $\mu\text{g/mL}$, através da análise de no mínimo 05 pontos em concentrações diferentes (realizar as corridas em triplicata).

Critério de aceitação: a análise de regressão linear deve fornecer um coeficiente de correlação linear (R) maior que 0,99. Devem-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

6.2.4.1. Preparo da curva

A partir de uma solução com concentração de 3 mg/mL (30 mg em 10 mL – balão volumétrico) em fase móvel (TMAH/fosfato de sódio monobásico – pH 3,0 - com ácido fosfórico) foram transferidas alíquotas de 1,33; 1,5; 1,67; 1,83 e 2,0 mL para balões volumétricos de 5,0 mL. Os volumes foram completados com a fase móvel, obtendo-se soluções com concentração de 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2 mg/mL.

- **Intervalo:**

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Para a determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, o intervalo varia de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

Logo, para o ácido pentético os valores variam de 0,8 mg/mL a 1,2 mg/mL, sendo a concentração teórica de 1,0 mg/mL.

Critério de aceitação: o método deve quantificar corretamente e de forma linear dentro do intervalo estabelecido.

- **Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para avaliar a precisão realizam-se dois testes, um deles é a repetibilidade e o outro a precisão interdias ou intermediária.

A partir de uma solução com concentração de 3 mg/mL (30 mg em 10 mL – balão volumétrico) em fase móvel (TMAH/fosfato de sódio monobásico – pH 3,0 - com ácido fosfórico) foram transferidas alíquotas de 1,33; 1,67; e 2,0 mL para balões volumétricos de 5,0 mL. Os volumes foram completados com a fase móvel, obtendo-se soluções com concentração de 0,8; 1,0 e 1,2 mg/mL.

Critério de aceitação: o valor máximo aceitável para o DPR é de 5%.

- **Exatidão:**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada.

A partir de uma solução com concentração de 3 mg/mL (30 mg em 10 mL – balão volumétrico) em fase móvel (TMAH/fosfato de sódio monobásico – pH 3,0 - com ácido fosfórico) foram transferidas alíquotas de 1,33; 1,67; e 2,0 mL para balões volumétricos de 5,0 mL. Os volumes foram completados com a fase móvel, obtendo-se soluções com concentração de 0,8; 1,0 e 1,2 mg/mL.

- **Robustez:**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o que indica a sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Os parâmetros avaliados foram alteração no fluxo de 0,8 para $\pm 0,1$ mL/min, alteração da temperatura de forno de 25 °C para $\pm 5^\circ\text{C}$ e comprimento de onda de 210 para 215 nm.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Parte experimental do desenvolvimento

Por não possuir literatura para o radiofármaco DTPA, se iniciou o desenvolvimento com a fase móvel mais simples - acetonitrila:água (50:50). Após isso, se testou inúmeras alterações que estão resumidas na Tabela 20. O comprimento de onda variou entre 205 a 220, mas o comprimento de onda escolhido foi de 210 nm.

Além dos experimentos presentes na tabela, também foi testado diferentes preparos da amostra e de fase móvel com ajustes de pH (meio alcalino - NaOH e TEA, e meio ácido – ácido fosfórico, TFA, HCl), variação de fluxo de 0,5 a 1,0 mL/min, variação da quantidade injetada (10 e 20 µL), armazenamento da amostra (geladeira e temperatura ambiente). Também foi explorado a adição de metanol com e sem acetonitrila na composição da fase móvel. Para cada teste sugerido, ou seja, para cada uma das alterações inseridas no método, foi realizado um mínimo de três preparos independentes e cada um com três injeções. O total de injeções realizadas, contemplando os dois equipamentos testados, ultrapassou 700 injeções.

Contudo, em nenhuma das alterações propostas se obteve um resultado satisfatório. Resumindo, nenhum método foi capaz de separar os picos e obter simetria adequada para o *cold kit* DTPA.

Tabela 20. Resumo dos métodos testados para o radiofármaco DTPA (*cold kit*).

Coluna	Fase móvel	Proporção
Equipamento Shimadzu		
C8	ACN:Água	50:50
C8	ACN:Água	75:25
C8	ACN:Água	25:75
Fenil	ACN:Água	50:50
Fenil	ACN:Água	40:60
Fenil	ACN:Água	30:70
Fenil	ACN:Água	20:80
C18	ACN:Água	10:90
C18	ACN:Água	20:80
C18	ACN:Água	50:50
C18	ACN:Água	80:20
C18	ACN:Água	04:96
C18	ACN:Água	01:99
Equipamento Thermo-Dionex		
C18	ACN:Água	50:50
C18	ACN:Água	05:95
C18	ACN:Água	10:90
C18	ACN:TMAH/fosfato de sódio dibásico (pH 3,0 - TFA)	05:95
C18	Metanol:TMAH/fosfato de sódio dibásico (pH 3,0 - TFA)	05:95
Sb-aq	ACN:TMAH/fosfato de sódio dibásico (pH 3,0 - ácido fosfórico)	05:95
Sb-aq	Metanol:HTMAH/fosfato de sódio monobásico (pH 3,0 - ácido fosfórico)	05:95
Sb-aq	ACN:TMAH/fosfato de sódio dibásico	10:90
Sb-aq	ACN:TMAH/fosfato de sódio dibásico	05:95
SB-aq	TMAH/fosfato de sódio monobásico (pH 3,0 - ácido fosfórico)	100

Ao longo destes inúmeros testes, se percebeu a formação de um complexo no produto acabado, então se testou o melhor método encontrado para análise do produto antes da liofilização. A Figura 15 demonstra que houve a formação de complexo antes da liofilização, ou seja, durante a manipulação/mistura dos excipientes, o que também é visto no *cold kit* e a Tabela 18 demonstra o método escolhido para esta análise.

A hipótese de formação do complexo é a presença de cloreto estano em na formulação, pois é uma molécula que reage facilmente. Com isso em mente, foram realizados alguns testes a fim de desfazer esse complexo, por exemplo a adição de oxigênio para oxidar o estanho e “liberar” o complexo, a adição de peróxido de hidrogênio, entre outros. Mas os resultados foram insatisfatórios com cromatogramas sem resolução e qualidade necessários.

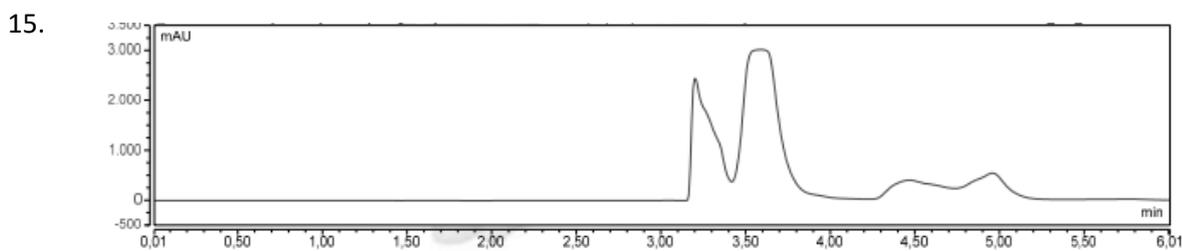


Figura 15. Cromatograma do produto antes da liofilização do produto acabado DTPA.

6.3.2. Validação do método para matéria prima ácido pentético por CLAE

6.3.3. Seletividade

O cromatograma da fase móvel e do padrão estão apresentados na Figuras 16. O tempo de retenção do ácido pentético foi de 3,49 min. A fase móvel não mostrou nenhum interferente que se sobreponha ao pico de interesse, conforme Figura 17.

É importante ressaltar que o *software*, após estabelecer o método de processamento este adequa todos os cromatogramas para o mesmo

processamento, não sendo possível alterar manualmente a integração do pico, ou seja, o *software* denuncia se houve manipulação do cromatograma.

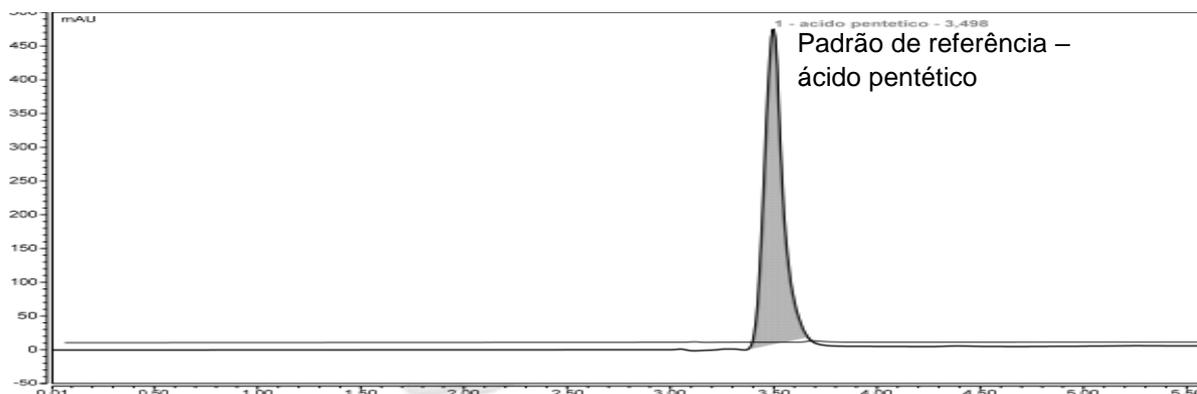


Figura 16. Cromatograma da fase móvel e do padrão de DTPA na concentração de 1,0 mg/mL sobrepostos.

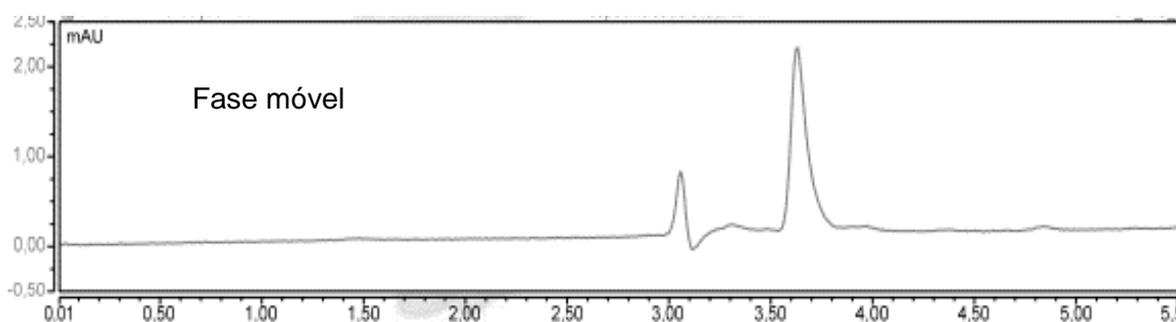


Figura 17. Cromatograma da fase móvel TMAH/fosfato de sódio monobásico – pH 3,0 - com ácido fosfórico

As amostras também foram analisadas após passarem por teste de estresse, como hidrólise ácida, hidrólise básica e exposição a UV, e não houve alterações no cromatograma.

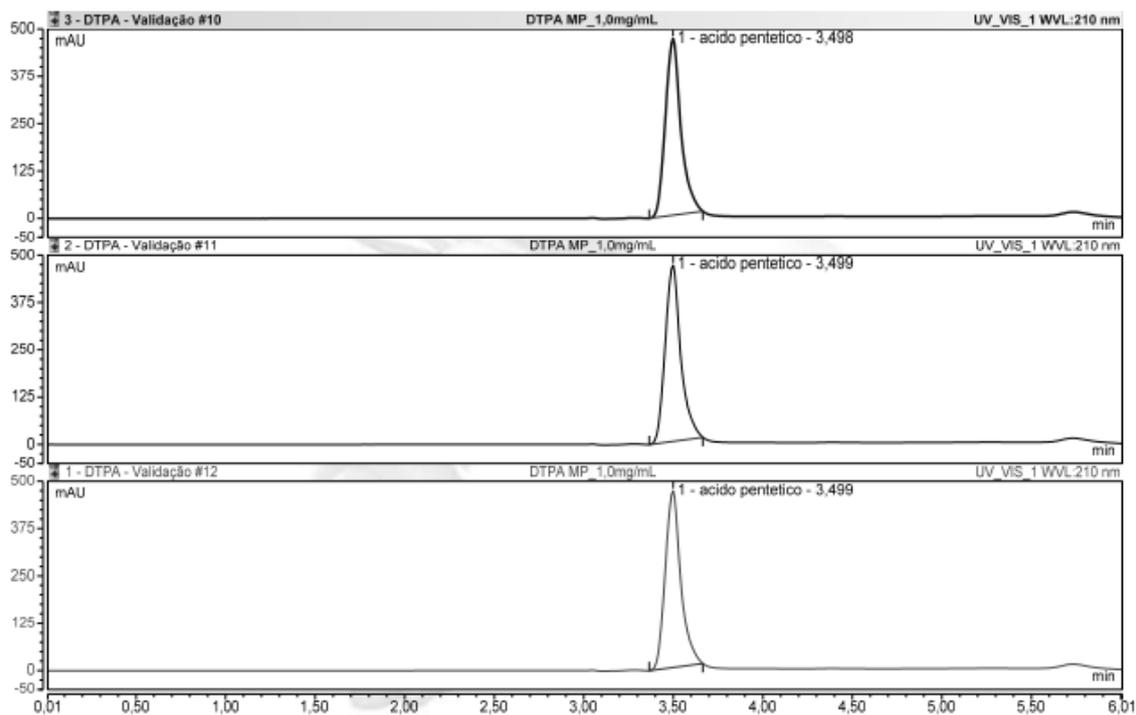


Figura 18. Amostras analisadas após passarem por teste de estresse: hidrólise ácida, hidrólise básica e exposição a UV.

A seletividade do método proposto é assegurada, pois não foi encontrado interferente durante os testes.

6.3.4. Linearidade

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos no estudo da linearidade com soluções da curva padrão. E a Figura 19 apresenta a sobreposição das 3 curvas padrão obtidas pelo método.

Tabela 21. Valores experimentais das áreas das curvas da matéria prima ácido pentético.

Pontos da curva	Concentração teórica (µg/mL)	Área curva 1*	Área curva 2*	Área curva 3*
1	800	37,94	37,8	38,05
2	900	42,17	41,81	42,67
3	1000	47,31	46,76	47,98
4	1100	52,4	52,31	52,55
5	1200	56,78	57,53	56,77

*Cada valor é a média de duas injeções.

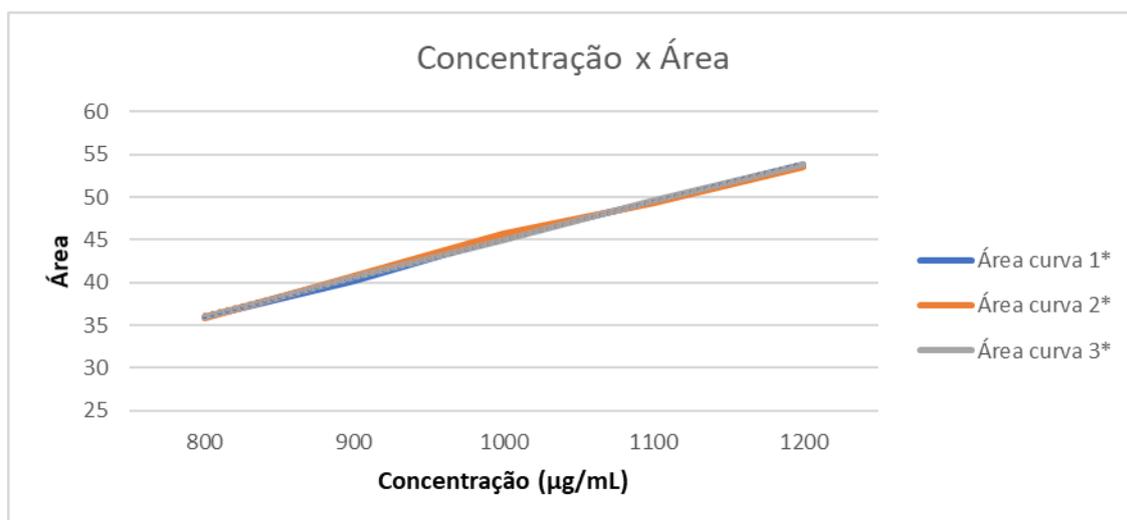


Figura 19. Gráfico demonstrando a interpolação das curvas obtidas por CLAE para a SQR DTPA.

A equação da reta é estabelecida por:

$$\text{Equação da reta: } Y=AX+B$$

Onde: **Y** = resultado da amostra; **A** = coeficiente angular; **X** = concentração teórica; **B** = intersecção da reta.

A Tabela 22 apresenta as equações das retas e valor de r. O valor de $r > 0,99$ demonstra a forte relação verificada entre a concentração e a resposta do equipamento (área do pico).

Tabela 22. Equações das retas das três curvas padrão do SQR ácido pentético.

Curva 1:	Curva 2:	Curva 3:
$y = 4,791x + 32,947$	$y = 4,996x + 32,254$	$y = 4,732x + 33,408$
$r^2 = 0,9988$	$r^2 = 0,9967$	$R^2 = 0,9986$
0,9978	0,9994	0,9999

A validade do modelo de regressão linear e a significância estatística da reta ajustada foram testadas por da Análise de Variância (ANOVA), conforme descrito por PIMENTEL & NETO (1996). A partir dos dados da ANOVA (Tabela 23) pode-se afirmar que a regressão linear foi significativa, com $F = 4500$, e que não ocorreu desvio da linearidade, visto que o F calculado (2,18) para esta fonte de variação foi menor que o F tabelado (3,71).

Tabela 23. Teste de análise da variância para o ajuste do modelo linear. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de ácido pentético por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calc)
Entre concentrações	4	703,26844	175,81711	1126,65
Regressão Linear	1	702,24407	702,24407	4500
Desvio da Linearidade	3	1,02437	0,34146	2,1881
Dentro (resíduo)	10	1,56053	0,15605	
Total	14	704,82897		

Os resultados descritos para linearidade foram adequados, podendo-se afirmar que o método proposto possui linearidade no intervalo de concentração (800 – 1200 $\mu\text{g/mL}$).

6.3.5. Precisão

A Tabela 24 apresenta os resultados da precisão e apresentam a baixa variabilidade obtida entre os resultados de um mesmo dia. Os valores de DPR para todos os dias foram menores que 2,0% indicando que o método possui repetibilidade. A precisão intermediária é representativa da variabilidade dos resultados obtidos em um mesmo laboratório e verifica se o método fornece os mesmos resultados com variações como: diferentes dias, analistas e equipamentos.

Tabela 24. Resultados da precisão por CLAE para a matéria prima ácido pentético.

	Dia 1	Dia 2**
	100,16	99,95
	100,83	100,04
	100,80	99,89
Porcentagem encontrada (%)	100,65	100,86
	100,13	100,90
	100,26	100,70
	100,12	99,74
	99,99	99,80
	100,07	99,95
Média	100,33	100,20
DPR	0,33	0,47
Média interdias	100,27	
DP interdias	0,402	
DPR interdias	0,400	

**Análise realizada por outro analista, no mesmo equipamento.

6.3.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É expressa pela

relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

Os resultados da exatidão estão apresentados na Tabela 25. A porcentagem média encontrada no estudo de exatidão foi de 100,27% e o intervalo de confiança de 95% calculado foi de 99,9 – 101,1%. Estes resultados demonstram que o método possui exatidão no intervalo da linearidade, além de precisão.

Tabela 25. Resultados do estudo de exatidão por CLAE para a matéria prima ácido pentético

Concentração (µg/mL)	Porcentagem encontrada (%)	Média (%)	DPR (%)
800	100,28%		
1000	100,58%	100,27%	0,40
1200	99,94%		

6.3.7. Robustez

Foi utilizada solução de ácido pentético SQR (1000 µg/mL) e a tabela 26 resume os resultados obtidos.

Os parâmetros avaliados foram alteração no fluxo de 0,8 para ± 0,1 mL/min, alteração da temperatura de forno de 25 °C para ± 5°C e comprimento de onda de 210 para 215 nm.

Tabela 26. Resultados do teste de robustez para método proposto por CLAE. Os resultados são a média de 4 resultados.

Parâmetros	Alterações	Fator de retenção	Assimetria	Pratos	Média das áreas dos picos (n = 4)	DPR (%)
Fluxo de fase móvel	0,7	3,99	1,21	8558	46,76	0,45
	0,9	3,11	1,24	8037		
Temperatura forno	20°C	3,54	1,26	8827	48,67	0,64
	30°C	3,45	1,29	8442		
Comprimento de onda	210 nm	3,49	1,23	8549	47,32	1,41
	215 nm	3,48	1,22	8503		

6.3.8. Interpretação dos resultados:

O fator de retenção obviamente variou com a troca de fluxo, mas também com a temperatura do forno onde fica a coluna, essa resposta tem ligação com a eficiência da coluna em diferentes temperaturas, para a troca do comprimento de onda não houve variação. O tempo do pico variou de 3,11 a 3,99. Em relação à resolução observa-se variação na resolução, porém nenhum parâmetro mostrou-se capaz de afetar a quantificação do ácido pentético na matéria-prima. A assimetria manteve-se com valores baixos, abaixo do máximo recomendado. E, por fim, o número de pratos manteve-se acima dos valores recomendados por Shabir (2003), para o teste de robustez não houve alteração significativa para os parâmetros testados.

A análise dos resultados confirma a robustez do método proposto em relação aos parâmetros analisados.

6.4. Conclusões

A análise do ácido pentético por CLAE demonstrou o potencial desta técnica em identificar e quantificar o ativo. A aquisição e tratamento dos dados com auxílio do programa Chromeleon permitiu, com facilidade, a obtenção e determinação de parâmetros cromatográficos relevantes como fator de retenção, resolução entre picos, assimetria.

Em relação à seletividade, visto que, não houve picos interferentes, o método foi considerado específico. O método mostrou-se também, linear dentro da faixa de concentração estudada (intervalo 800 µg/mL a 1200 µg/mL). A partir dos resultados encontrados, conclui-se que o método se mostrou preciso intra e intercorridas com DPR menor que 2% e exato.

No que se refere à robustez, o método mostrou-se robusto frente às alterações testadas, não apresentando alterações significativas com pequenas modificações nos parâmetros de análise.

Por fim, os resultados satisfatórios dos parâmetros de desempenho analítico, validam o método proposto para quantificação da matéria-prima.

Considerações Finais

7. Considerações finais

O controle de qualidade está integrado a todos processos industriais e a cabe a indústria farmacêutica, através de métodos validados, garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos.

O desenvolvimento de métodos do radiofármaco MIBI foi satisfatório, podendo ser considerado validado e disponível para uso na indústria. A estabilidade em solução da SQR foi de aproximadamente 2 meses, com uma redução de mais de 10% no teor.

Para o radiofármaco $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, infelizmente, não foi possível desenvolver um método, apesar das diversas tentativas. Entretanto, para a matéria prima ácido pentético (ativo do radiofármaco) foi caracterizado a SQR e o método de quantificação e identificação foi validado, e pode ser usado na rotina fabril.

Espera-se que os resultados e discussões deste trabalho contribuam como material de apoio para novos estudos na área, visto que, é uma linha de pesquisa que ainda está em desenvolvimento e necessita de mais estudos. Além disso, e mais importante, que os resultados possam ser usados na rotina da indústria a fim de adequar os processos de controle de qualidade ao modelo regulatório (registros dos medicamentos).

Perspectivas

8. Perspectivas

Como perspectiva principal deste estudo, se continuará testando outros métodos para quantificação do ativo em produto acabado (*cold kit* DTPA) pelo método CLAE, e por eletroforese capilar.

Referências

9. Referencias

ARAUJO, E. B.; A utilização do Tc-99m no diagnóstico de patologias e disfunções nos seres vivos. CADERNOS TEMÁTICOS DE QUÍMICA NOVA NA ESCOLA O tecnício no diagnóstico de patologias N° 6 – JULHO 2005

ARGENTINE, D.M., OWENS, P. K., OLSEN, B. A., Strategies for the investigation and control of process-related impurities in the drug substances, **Advanced Drug Delivery Reviews** (2007) 59, 12-28.

BEASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública (CP) nº 95, de 19 de outubro de 2007e.

BERGERS P.J.M., GROOT A.C.; The analysis of edta in water by HPLC; Water Research; Volume 28, Issue 3, March 1994, Pages 639-642

BRASIL COMISSÃO DE ENERGIA NUCLEAR, CNEN. Disponível em, www.cnen.gov.br/seguranca/documentos/ acessado às 22h50min, em, 10 de dezembro de 2017.

BRASIL, SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA NUCLEAR. Disponível em, <http://sbmn.org.br/o-que-e-medicina-nuclear/> O que é medicina nuclear, Sociedade Brasileira de Medicina Nuclear, acessado as 15h00min, em; 18 de novembro de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 64, DE 18 DE DEZEMBRO DE 2009. Estabelecer os requisitos mínimos a serem observados na fabricação de radiofármacos, que deve cumprir com as Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos e de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 dez. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010. Estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano durante as inspeções sanitárias. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 53, DE 4 DE DEZEMBRO DE 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999.

BRASIL. Presidência da República. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Emenda Constitucional nº 49, de 8 de fevereiro de 2006.

BRASIL. Presidência da República. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Emenda Constitucional nº 49, de 8 de fevereiro de 2017.

BUCHPIGUEL, C. A.; SAPIENZA, M. T.; Princípios e Aplicações da Medicina Nuclear em Urologia; JÚNIOR, A. N.; FILHO, M. Z.; REIS, R. B. (Ed) **Urologia Fundamental**, Brasil/SP, Planmark, 2012 cap 7: 73-80.

CAGNASSO, C. E., LÓPEZ, L. B., RODRÍGUEZ, V. G., VALENCIA M. E.; Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC; Journal of Food Composition and Analysis; Volume 20, Issues 3–4, May 2007, Pages 248-251

CARRINHO M, MORAES A, MORCERF F, et al, Ecocardiografia de contraste miocárdico em pacientes com doença arterial coronariana suspeita ou conhecida comparação com a cintilografia miocárdica com radioisótopos. Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 83, Nº 5, SP, Novembro 2004.

COELHO P, FERREIRA D, OLIVEIRA R, DELFIM SANTOS D, VEIGA F, Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

COUTO AJ, DIMENSTEIN R, ROSSI G, Guia prático de medicina nuclear, A instrumentação, 2ª Ed. 2004.

EBERLEIN, U.; BRÖER, J. H.; VANDEVOORDE, C.; SANTOS, P.; BARDIÈS, M.; BACHER, K. ; NOSSKE, D.; LASSMANN, M.; Biokinetics and dosimetry of commonly used radiopharmaceuticals in diagnostic nuclear medicine – a

review; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2011); 38:2269–2281

EUROPEAN PHARMACOPEIA, 9.0 – Technetium (99m Tc) Sestamibi injection, 2017

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 edição – inclusão radiofármacos-2017 FERREIRA S. M. Z. M. D., JULIANA B. S., MARINA B. S.; O registro de radiofármacos no Brasil; Rev. Bras. Farm. 92(3): 104-110, 2011

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN. Disponível em, www.einstein.br, acessado às 22h30min, em, 20 de dezembro de 2017

HUR, S.; BAUER, A.; MCMILLAN, N.; KRUPINSKI, E. A.; KUO, P. H.; Optimizing the Ventilation–Perfusion Lung Scan for Image Quality and Radiation Exposure; Journal of Nuclear Medicine Technology (2014); 42:1–4

ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: methodology. Q2B (R1) ICH Steering Committee, 2005.

LAINE, P. e MATILAINEN, R.; Simultaneous determination of DTPA, EDTA, and NTA by UV–visible spectrometry and HPLC; Analytical and Bioanalytical Chemistry (2005); 382: 1601–1609

LAROCHE, M.; QUELVEN, I.; MAZÈRE, J.; MERLE, L.; Adverse Reactions to Radiopharmaceuticals in France: Analysis of the National Pharmacovigilance Database; Annals of Pharmacotherapy (2015); 49: 39–47

LORBERBOYM, M.; LAMPL, Y.; SADEH, M.; Correlation of 99mTc-DTPA SPECT of the Blood–Brain Barrier with Neurologic Outcome After Acute Stroke; Journal of Nuclear Medicine (2003); 44:1898-1904.

MCAFEE, J. G.; SUBRAMANIAN, G.L; THOMAS, F. D.; HELLWIG, B.; ROSKOPF, M.; Comparison of Different Radioactive Renal Agents in Cisplatin – Induced Tubular Toxicity in Rats; Journal of Nuclear Medicine (1989); 30: 659-665.

MCGREGOR, C., SAUNDERS, M. H., BUCKTON, G., SAKLATVALA, R. D., 2004, "Thermochimica Acta", Vol. 417, pp. 231-237.

MELO RC, Estudo de pressupostos tecnológicos e cognitivos para aperfeiçoamento de laboratórios virtuais e ambientes colaborativos virtuais para radiofarmácia, São Paulo, 2009.

MURPHY, C.A. e FERRO-FLORES, G. Compuestos de tecnecio. 1ª ed. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 2003.

NISHIOKA S. Como é feito o registro de medicamentos novos no Brasil. Prática Hospitalar. 45: 13 – 17, 2006.

NÓBREGA NA, Tecnologia radiológica e diagnóstico por imagem, Vol. 4, 4th Ed. São Caetano do Sul, SP, 2011.

NUCLEODUR: HIGH PERFORMANCE HPLC PACKINGS AND APPLICATIONS (pag. 26, <http://bilder.pretech.nu/files/nucleodurpdf.pdf>)

NUDELMAN, N. S. Estabilidad de Medicamentos. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

PAVIA, D., LAMPAMN, G., KRIZ, G., & VYVYAN, J., Introduction to spectroscopy, 4 ed. Cengage Learning, 2008.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. Quim. Nova, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

RADIOTRAÇADORES, Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 86, Suplemento I, Abril 2006.

RPH – DTPA Disponível em, http://www.gruporph.com.br/www/images/bulas/Bula_DTPA.pdf, acessado às 16h40min, em, 15 de dezembro de 2017)

RPH – MIBI Disponível em, http://www.gruporph.com.br/www/images/bulas/Bula_MIBI.pdf, acessado às 16h25min, em, 15 de dezembro de 2017

SAHA; G. B.; Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 5 edição; Estados Unidos das Américas; Springer-Verlag New York, Inc. 2003; 383 p.

SAID D. Registro Sanitário de Medicamentos: uma experiência de revisão. 2004. Rio de Janeiro. 156 p. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz.

SALVADORI P. Radiopharmaceuticals, drug development and pharmaceutical regulations in Europe. *Curr. Radiopharm.* 1: 7 – 11, 2008.

SHABIR, G.A.; Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopeia and ICH. *Journal of Chromatography A.* v987, p. 57-66, 2003.

SILLANPÄÄ, M., KOKKONEN, R., SIHVONEN, ML.; Determination of EDTA and DTPA as their Fe(III) complexes in pulp and paper mill process and waste waters by liquid chromatography; *Analytica Chimica Acta*; Volume 303, Issues 2–3, 10 March 1995, Pages 187-192

SILVA L. V; CARVALHO, R., FREITAS, M., TORMENA, F. C., MELO, W.C.; Structural determination of Zn and Cd–DTPA complexes: MS, infrared, ¹³C NMR and theoretical investigation; *Spectrochimica Acta Part A* 68 (2007) 1197–1200

SILVA, S. K. SILVA, S., Síntese do composto Tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)- (Cu[MIBI₄BF₄]): substrato utilizado na produção do radiofármaco SESTAMIBI-99m-Tc ; IPEN dissertação 2005

SOUZA G. Trabalho em Vigilância Sanitária: o controle sanitário da produção de medicamentos no Brasil. 2007. Salvador. 217 p. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal da Bahia.

TAYLOR, A. T.; Radionuclides in Nephrourology, Part 1: Radiopharmaceuticals, Quality Control, and Quantitative Indices; **Journal of Nuclear Medicine** (2014); 55:608-615

THE COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Directive 89/343/EEC of 3 May 1989. Extending the scope of Directives 65/65/EEC and 75/319/EEC and laying down additional provisions for radiopharmaceuticals. *Official Journal*, 25 may 1989.

TRUJILLO, N. P.; PRATT, J. P.; TALUSANI, S.; QUAIFFE, R. A.; KUMPE, D.; LEAR, J.L.; DTPA Aerosol in Ventilation/Perfusion Scintigraphy for Diagnosing Pulmonary Embolism; **Journal of Nuclear Medicine** (1997); 38:1781-1783

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Code of Federal Regulations 21 – Part 315 Diagnostic Radiopharmaceuticals, 2009a. Disponível em: . Acesso em: 13 outubro. 2017.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance PET Drugs — Current Good Manufacturing Practice (CGMP). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2009b. Disponível em:. Acesso em: 13 jul. 2010

USP 38 – **The United States Pharmacopeia**. 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2015

VERBRUGGEN A, COENEN H, DEVERRE J, GUILLOTEAU D, LANGSTROM B, SALVADORI P, HALLDIN C. Guideline to regulations for radiopharmaceuticals in early phase clinical trials in the EU. Eur. J. of Nucl. Med. Mol. Imaging 35(11): 2144 – 51, 2008.

WANG, G, TOMASELLA F.P., Ion-pairing HPLC methods to determine EDTA and DTPA in small molecule and biological pharmaceutical formulations **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (2016); in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.002i>

WHO. RADIOPHARMACEUTICALS Final text for addition to The International Pharmacopoeia November 2008. World Health Organization (WHO). Radiopharmaceuticals – Final text for addition to the International Pharmacopoeia. Document QAS/08.262/Final, 2008. Disponível em:< http://www.radiofarmacia.org/docs/RADIOPHARMACEUTICALS_SUPPLEMENTARY_INFORMATION.pdf>. Acesso em: 13 outubro. 2017.

ZOLLE, I.; Technetium-99m pharmaceuticals; preparation and quality control in nuclear medicine; Springer; Austria 2007.