

BRP409563

ISSN 01001-3084

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

CNEN/SP

PREPARAÇÃO DO GLUCOHEPTONATO-^{99m}Tc UTILIZANDO ASCORBATO ESTANOSO COMO REDUTOR DO ÍON TcO_4^-

Marycel R. F. F. de Barboza, Constância Pagano Gonçalves da Silva

PUBLICAÇÃO IPEN 58
IPEN · Pub · 58

DEZEMBRO/1983

ISSN 0101-3084

PUBLICAÇÃO IPEN 58
IPEN - Pub - 58

DEZEMBRO/1983

**PREPARAÇÃO DO GLUCOHEPTONATO-^{99m}Tc UTILIZANDO ASCORBATO
ESTANOSO COMO REDUTOR DO ÍON TcO_4^-**

Marycel R. F. F. de Barboza, Constância Pagano Gonçalves da Silva

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO
TP

CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13

C21

KIDNEYS

RADIOPHARMACEUTICALS

REDUCTION

SCINTISCANNING

TECHETIUM 99

Recebida em Novembro de 1982.

Aprovada para publicação em Dezembro de 1982.

Nota: A redacção ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos Autores.

PREPARAÇÃO DO GLUCOHEPTONATO-^{99m}Tc UTILIZANDO ASCORBATO ESTANOSO COMO REDUTOR DO ÍON TcO_4^- *

Marycel R. F. F. de Barboza, Constância Pagano Gonçalves da Silva

RESUMO

Apresenta-se, neste trabalho, a preparação do ascorbato estanoso (Asc - Sn) na forma liofilizada. Este agente redutor foi utilizado na preparação de conjuntos de reativos de glucoheptonato de cálcio (GHA) para marcação com ^{99m}Tc e posterior uso em cintigrafia renal.

Realizaram-se estudos comparativos com conjuntos de reativos preparados com cloreto de estanho II como agente redutor.

O rendimento de marcação estudado durante 18:00 horas após a adição de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ mostrou-se superior quando se usou o ascorbato estanoso.

A estabilidade dos conjuntos de reativos de glucoheptonato de cálcio - ^{99m}Tc que contém ascorbato estanoso foi analisada durante cinco meses após a preparação na forma liofilizada. Ao quinto mês, o rendimento de marcação do GHA - ^{99m}Tc foi de 89 - 95% sendo, pois, adequado para uso em cintigrafia renal.

INTRODUÇÃO

A adição de oxidantes durante o processamento químico de ⁹⁹Mo usado na preparação de geradores de ^{99m}Tc e a presença de oxigênio tem sido indicados como a causa da instabilidade "in vitro" dos conjuntos de reativos, para diagnóstico, que contém Sn⁺² como agente redutor. Esta instabilidade se manifesta "in vivo" pela visualização da tireóide, estômago e intestino indicando a presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre.

Entretanto, o uso de geradores de ^{99m}Tc de alta atividade exige a presença de conteúdo relativamente alto de oxidantes para que sejam obtidos rendimentos elevados de eluição pois que neles as doses altas de radiação podem reduzir o íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Os conjuntos de reativos com conteúdo baixo de Sn⁺² apresentam quantidade suficiente de estanho para a redução inicial do íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e a imediata formação do complexo. Entretanto, mesmo com esse baixo teor de Sn⁺² pode ocorrer oxidação lenta com o tempo.

A instabilidade "in vitro" dos complexos com baixo teor de Sn⁺² pode ser minimizado borbulhando-se N₂ nas soluções e nos frascos dos conjuntos de reativos, de modo a diminuir o conteúdo de oxigênio antes da adição de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (3, 4).

Uma outra maneira de evitar os problemas de instabilidade consiste em se aumentar a quantidade de Sn⁺² para inibir os efeitos de oxidantes existentes na solução contendo o ^{99m}Tc (4).

Entretanto, trabalho recente⁽²⁾ mostrou alteração na distribuição biológica da atividade em cintigrafias realizadas com produtos contendo Sn⁺² em alto teor.

(*) Glucoheptonate - ^{99m}Tc preparation. The use of stannous ascorbate as a reductant agent for TcO_4^- ion.

O uso do ácido ascórbico ou sal sódico foi investigado como um meio de eliminar a interferência de oxidantes no momento da preparação do HEDP - ^{99m}Tc (6). Nesse caso, é mantido o teor do íon Sn^{+2} utilizado comumente na preparação do agente ósseo. O autor verificou que a estabilidade "in vitro" do composto marcado, 6:00 horas após a adição do íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é muito maior quando está presente o ácido ascórbico, sendo de 1%, aproximadamente, o teor de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre em presença de oxigênio ou de nitrogênio.

Na ausência de ácido ascórbico, a porcentagem de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre é de 11%, na presença de oxigênio é 3% quando a solução é borbulhada com nitrogênio.

Os estudos "in vitro" demonstraram que não há alteração na distribuição biológica do agente ósseo, nem distribuição anormal do ácido ascórbico, sugerindo que a única função é a de ser este um agente estabilizado; não complexante.

Os trabalhos de Tubis e col. (7) descrevem a preparação do ascorbato estanoso referindo-o como um transportador do íon Sn^{+2} na redução do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sendo ao mesmo tempo um meio redutor capaz de manter o estanho no estado de oxidação +2 até que a redução seja completa.

Tubis preparou os conjuntos de reativo liofilizados de DTPA, HEDP, MDP e Pirofosfato utilizando o ascorbato estanoso como redutor do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e verificou que a estabilidade deles é de 7,5 meses; 9,25 meses; 7,25 meses e 10 meses, respectivamente, com rendimento de marcação de 87% a 98% em todos. O conteúdo de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre após a marcação era inferior a 1% em todos os casos.

Em virtude das vantagens apresentadas pelo ascorbato estanoso, ou sejam: evitar a oxidação do íon Sn^{+2} , poder ser usado num grande intervalo de pH, ser fisiologicamente aceitável e não tóxico, apresenta-se neste trabalho o método de preparação do glucoheptonato de cálcio - ^{99m}Tc em presença daquele redutor. Este radiofármaco é usado em medicina nuclear para cintigrafia renal dada sua alta concentração nos rins após injeção endovenosa; não é tóxico e não exige uso de contraste.

Para efeito de comparação, preparou-se o mesmo composto marcado utilizando o cloreto estanoso como redutor do íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

MATERIAL E MÉTODO

1 - Preparação do Ascorbato Estanoso (Asc - Sn)

O ascorbato estanoso foi preparado de acordo com Tubis (7). Inicialmente, dissolveu-se 0,5 g de $\text{Sn} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de procedência Merck em 20 ml de HCl 0,05 N. Adicionou-se NH_4OH concentrado até $\text{pH} = 9 - 10$. Centrifugou-se o precipitado em uma centrífuga Sorvall, modelo GLC - 1 a 2000 rpm durante 20 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi retomado em água destilada estéril saturada com N_2 , centrifugado novamente e retirado o sobrenadante.

Preparou-se uma solução de ácido ascórbico (Carlo Erba), 3 g em 10 ml de água destilada estéril, filtrou-se através da membrana Millipore 0,22 μm e saturou-se com nitrogênio.

O precipitado acima foi dissolvido em 8 ml da solução de ácido ascórbico previamente preparada e em seguida filtrou-se, através de filtro Millipore 0,22 μm estéril, em frasco estéril.

Esta solução foi dividida em aliquotas de 1 ml em frascos tipo penicilina, sendo em seguida congelada durante 18:00 horas e liofilizada durante 24:00 horas. Cada frasco liofilizado contém 288 mg de ascorbato estanoso.

O produto acima obtido, denominado Tinasc por Tubis (7, 8) foi utilizado na preparação de conjuntos de reativos de glucoheptonato de cálcio para serem marcados com ^{99m}Tc .

2 – Preparação dos Conjuntos de Reativos de Glucoheptonato de Cálcio(GHA)

a) GHA preparado com ascorbato estano

O conjunto de reativo foi preparado a partir de uma solução contendo 100 mg/ml de GHA em solução fisiológica; esta solução foi borbulhada com N_2 durante 20 minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 mg de Asc – Sn por ml de solução de GHA, acertou-se o pH a 6 e a solução foi filtrada por filtro Millipore 0,22 μ m. Dividiu-se a solução em alíquotas de 1 ml em frascos tipo penicilina, estéreis. As alíquotas assim preparadas foram congeladas e liofilizadas em liofilizador Virtis modelo N = 10 – 146 MR – BA. Os vidros foram fechados a vácuo, lacrados e conservados a 4°C.

b) GHA preparado com cloreto estano

A técnica de preparação é igual àqueia descrita anteriormente. A quantidade de GHA e de $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ são de 100 mg e 1 mg, respectivamente. Esses valores foram escolhidos sabendo-se que 0,5 mg de $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ contém 0,263 mg Sn^{+2} equivalentes a 1,04 mg Asc – Sn.

3 – Preparação do Composto Marcado (GHA – ^{99m}Tc)

Retira-se o frasco da geladeira e espera-se até atingir a temperatura ambiente. Adicionam-se 3 – 5 ml da solução de $^{99m}TcO_4^-$ eluída esterilmente do gerador $^{99}Mo - ^{99m}Tc$; sendo a atividade de ^{99m}Tc no máximo 100 mCi. Agita-se durante um minuto para que a dissolução se complete, a solução resultante deve ser límpida. Aguardam-se 30 minutos para que a reação se complete, podendo-se então injetar intravenosamente a atividade desejada.

4 – Controle de Qualidade

4.1 – Controle Radioquímico

O controle radioquímico foi feito por cromatografia ascendente em papel Whatman nº 3 (5,7 cm x 1,0 cm) impregnado previamente em Sílica Gel 6% (70–325 Mesh–Merck), secado em estufa, e desenvolvido em dois sistemas: metil–etil–cetona e solução fisiológica 0,9%⁽⁹⁾. Dessa maneira separou-se adequadamente o complexo ^{99m}Tc , o $^{99m}TcO_4^-$ e o ^{99m}Tc reduzido hidrolizado. Semeou-se em cada uma das tiras de papel uma quantidade constante de composto marcado (2 μ l), e o tempo de secagem para posterior corrida dos solventes foi de um minuto. Estes ensaios foram feitos aos 30; 60; 120; 180 minutos e 18:00 horas após a marcação.

4.2 -- Controle Biológico

A distribuição biológica foi feita em rato adulto da raça Wistar, pesando 250 g.amas, após uma injeção intravenosa de 250 μ Ci de GHA – ^{99m}Tc . Decorridos 45 minutos da injeção, sacrificou-se o animal, os órgãos foram retirados, lavados, pesados e posteriormente determinada a atividade num Contador Gama da Nuclear Chicago. O resultado foi expresso em porcentagem da dose injetada por grama de cada órgão.

A distribuição biológica também foi avaliada em rato adulto da raça Wistar injetado intravenosamente com 200 μ Ci de GHA – ^{99m}Tc , por meio de cintigrafias, em cintilógrafo linear Scintimatic II Siemens obtidos aos 45 minutos após a injeção.

4.3 – Controle de Esterilidade

Os ensaios de esterilidade para verificação de microorganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, foram feitos em meios de cultura, caldo simples e tioglicolato de sódio, incubados a 37°C durante 48:00 horas e a verificação da presença de fungos e levedura foi feita em meio de Saboreaud incubado a temperatura ambiente por 10 dias.

4.4 – Controle de Pirogênicos

A determinação de pirogênicos foi feita pelo método "in vitro" usando conjunto para teste de pirogênicos da "Mallinckrodt".

5 – Resultados

Os resultados obtidos no controle radioquímico da preparação do GHA – ^{99m}Tc usando Asc – Sn como agente redutor foram comparados com dados obtidos do GHA – ^{99m}Tc utilizando como reagente o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Estes resultados estão apresentados nas Tabelas I e II.

Tabela I

Rendimento de Marcação do GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ e GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{Asc Sn})$
Antes da Liofilização

Tempo (min)	GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{SnCl}_2)$ (%)	GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{Asc Sn})$ (%)
30	94,1	98,5
60	94,1	98,7
120	95,4	98,0
180	93,8	97,8
240	94,8	95,8
1080	74,8	97,4

Resultado médio de quatro (4) amostras em cada tempo

Tabela II

Rendimento de Marcação do GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ e GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{Asc Sn})$
Após a Liofilização

Tempo (min)	GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{SnCl}_2)$ (%)	GHA – $^{99m}\text{Tc}(\text{Asc Sn})$ (%)
30	92,6	90,4
60	90,6	92,2
120	89,0	91,3
180	88,9	91,6
360	79,3	90,7
1080	58,0	85,7

Resultado médio de quatro (4) amostras em cada tempo

O rendimento de marcação foi estimado durante 18:00 horas após a reação.

A estabilidade dos conjuntos de reativos foi avaliada durante 6:00 hora após a marcação e 5 meses após a preparação (Tabelas III e IV).

Tabela III

Controle Radioquímico: Valores Percentuais dos Rendimentos de Marcação dos Conjuntos de Reativos do GHA (Asc – Sn) após Marcação com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Amostras Liofilizadas e recém Preparadas).

lote tem. (min.)	0,034	0,035	0,036	0,038
	(%)	(%)	(%)	(%)
15	95,4	92,8	90,4	92,2
30	97,2	97,9	92,0	96,8
60	97,1	94,7	91,1	96,8
120	96,2	91,1	91,5	95,6
180	95,0	95,0	90,9	90,2
240	96,0	94,1	90,7	95,1
300	93,7	96,8	87,8	92,2
360	90,4	92,1	88,5	91,0

Tabela IV

Controle Radioquímico do Conjunto de Reativos GHA (Asc – Sn) (lote 0,034) Rendimento de Marcação (%) em Função de: a) tempo de reação em minutos; b) tempo após a Preparação

tem. (mês) tem. (min.)	0	1	2	3	4	5
	15	95,4	93,0	90,3	89,0	96,2
30	97,2	94,0	97,2	89,3	97,5	96,6
60	97,1	93,0	90,3	86,9	97,0	96,6
120	96,2	95,3	93,2	87,6	97,3	96,2
180	96,1	95,4	90,0	93,6	97,9	97,0
240	95,0	93,0	93,5	87,0	97,9	95,3
300	93,7	92,3	93,1	91,8	96,8	96,8
360	90,4	93,7	93,1	91,5	96,3	96,2

Aplicando a prova de Friedman^(5. 1) aos dados obtidos na Tabela III verificou-se que os lotes pertencem à mesma população durante o tempo de análise, ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

O Gráfico I mostra a média do rendimento de marcação dos lotes de GHA ^{99m}Tc, relativos à Tabela III, em função dos tempos de reação.

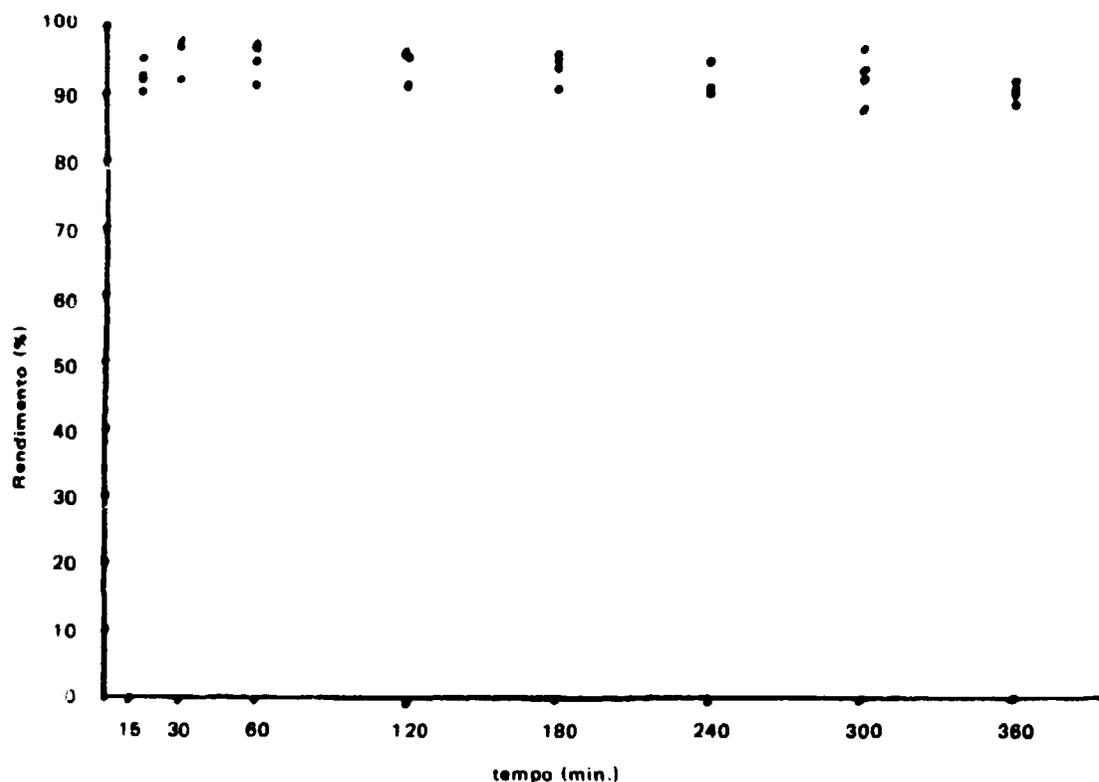
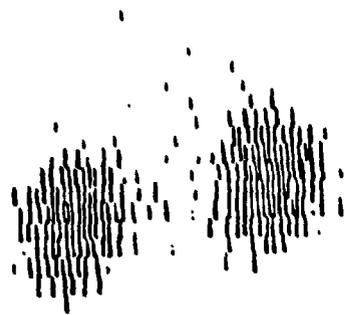
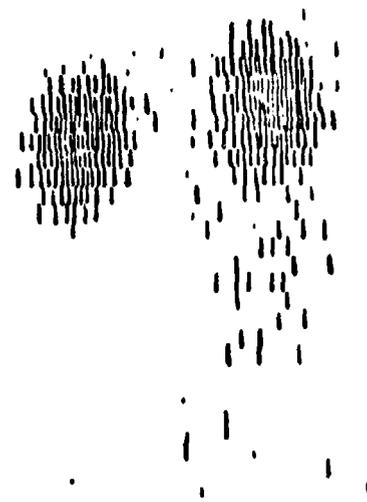


Gráfico 1 - Representação gráfica do rendimento de marcação (%) dos conjuntos reativos de GHA (As - Sn) em função do tempo de reação (min).

Nas Figuras 1 e 2 pode-se observar a distribuição biológica do GHA - ^{99m}Tc (lote 0,018) antes e após a liofilização respectivamente preparado com Asc-Sn e Sn Cl₂ .2H₂O, em rato adulto da raça Wistar após injeção intravenosa de 200 μ Ci.



^{99m}
GHA- Tc
100 mg glucoheptonato de Ca.
2 mg ascorbato estanoso



GHA-^{99m}Tc
100mg glucoheptonato de Ca
1 mg cloreto estanoso

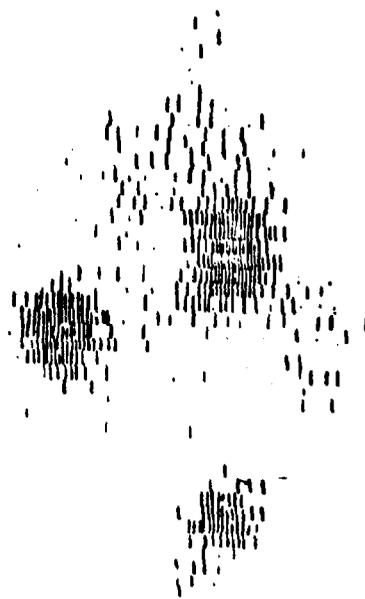
Pre-11ofillizado

Figura 1

GMA- ^{99m}Tc
Liofilizado



100 mg de glucoheptonato de Ca.
2 mg de ascorbato estanoso



100 mg de glucoheptonato
de Ca.
1 mg de clorato
estanoso

Figure 2

Na Figura 3 observa-se a distribuição biológica do GHA – ^{99m}Tc (lote 0,022) preparado com Asc – Sn antes e após a liofilização, registrada por meio de cintigrafia 45 minutos após a injeção.

A porcentagem da atividade acumulada nos órgãos do animal após administração de GHA – ^{99m}Tc (lote 0,026) foi: pulmão = 1,88%/g; fígado = 2,06%/g; coração = 1,31%/g; tireóide = 0,37%/g; baço = 1,19%/g; rins = 49,8%/g e sangue = 0,16%/ml.

O gráfico 2 mostra a curva da resposta do GHA – ^{99m}Tc (lote 0,034) injetado intravenosamente em um rato adulto da raça Wistar, anestesiado com fenobarbitalsódico, durante um intervalo de tempo de 81 minutos.

A atividade injetada foi de 300 μCi e o tempo de reação após a marcação do composto foi de 90 minutos.

Observa-se que o acúmulo do produto nos rins é constante a partir de 15 minutos. Deste modo pode-se fixar o tempo ideal de 30 a 45 minutos após a injeção do GHA – ^{99m}Tc para realizar a cintigrafia. Aconselha-se o prévio esvaziamento da bexiga para diminuir a radiação extra renal.

A Figura 4 mostra a captação renal do GHA – ^{99m}Tc (lote 0,019) em um paciente que recebeu injeção intravenosa de 5 mCi do produto.

A cintigrafia foi realizada, 45 minutos após a injeção, no cintilógrafo linear "Scintimatic-Siemens".

Não se verificou a presença de pirogênios ou microrganismos em todas as amostras analisadas.

CONCLUSÕES

Os rendimentos de marcação dos conjuntos de reativos preparados com ascorbato estanoico como agente redutor do íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ mostraram que o produto é estável até 18:00 horas após adição do pertecnetato.

Verificou-se que a validade dos conjuntos de reativos liofilizados é de cinco meses.

O estudo cinético nos ratos mostrou uma excreção de 40%, aproximadamente, em relação à atividade injetada nos primeiros 15 minutos e cerca de 50% permanecem nos rins até 80 minutos após a injeção, provando desse modo, a reabsorção e fixação do produto marcado. O tempo ideal para a realização de cintigrafia foi de 30 a 40 minutos após a injeção.

As amostras liofilizadas enviadas para uso clínico em pacientes mostraram que o produto preparado é adequado para cintigrafia renal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. M. Tubis (University of California, Los Angeles) pelas sugestões a respeito do uso do ascorbato estanoico, à Srta. Josefa Paredes Villalobos pela análise estatística e a Dra. Nilda Sosa de Pereira – Chefe da Divisão de Ensaios e Controle de Qualidade – pelos ensaios realizados.

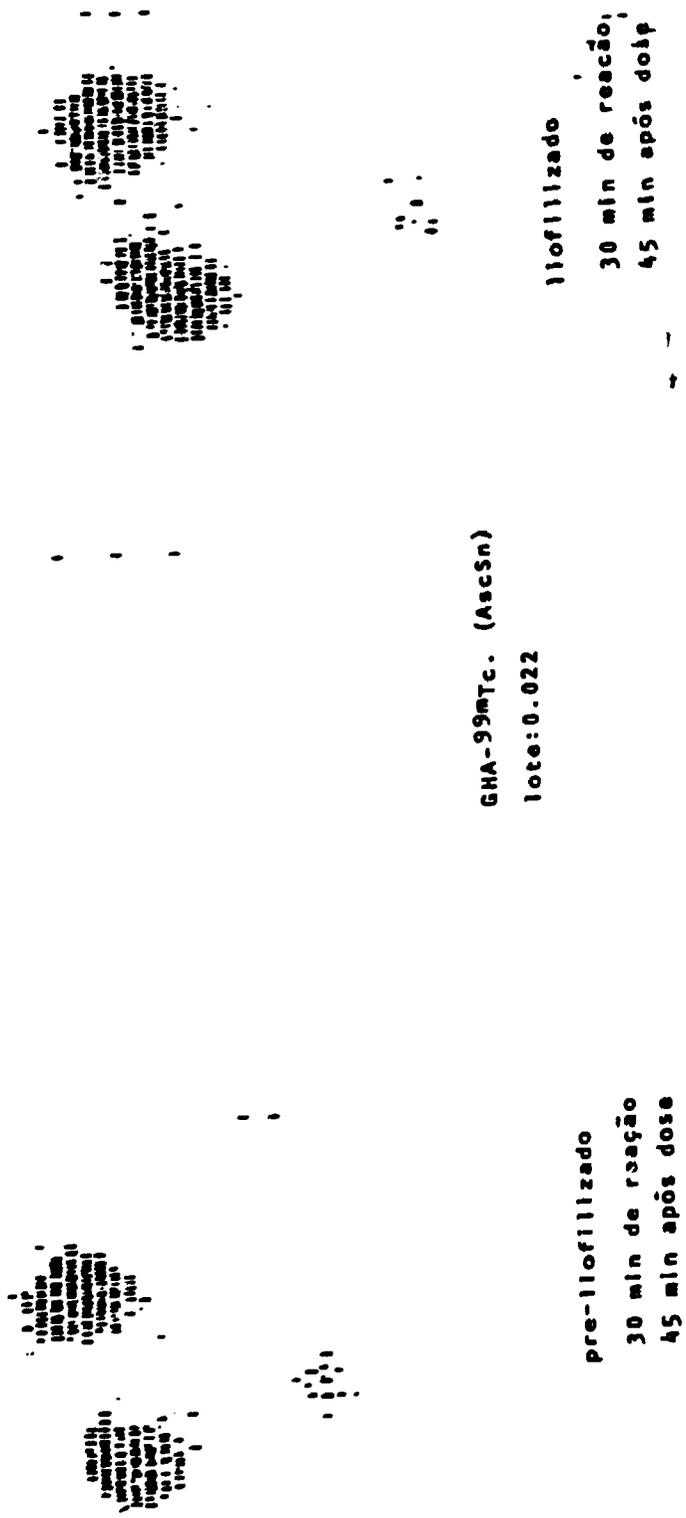


Figura 3

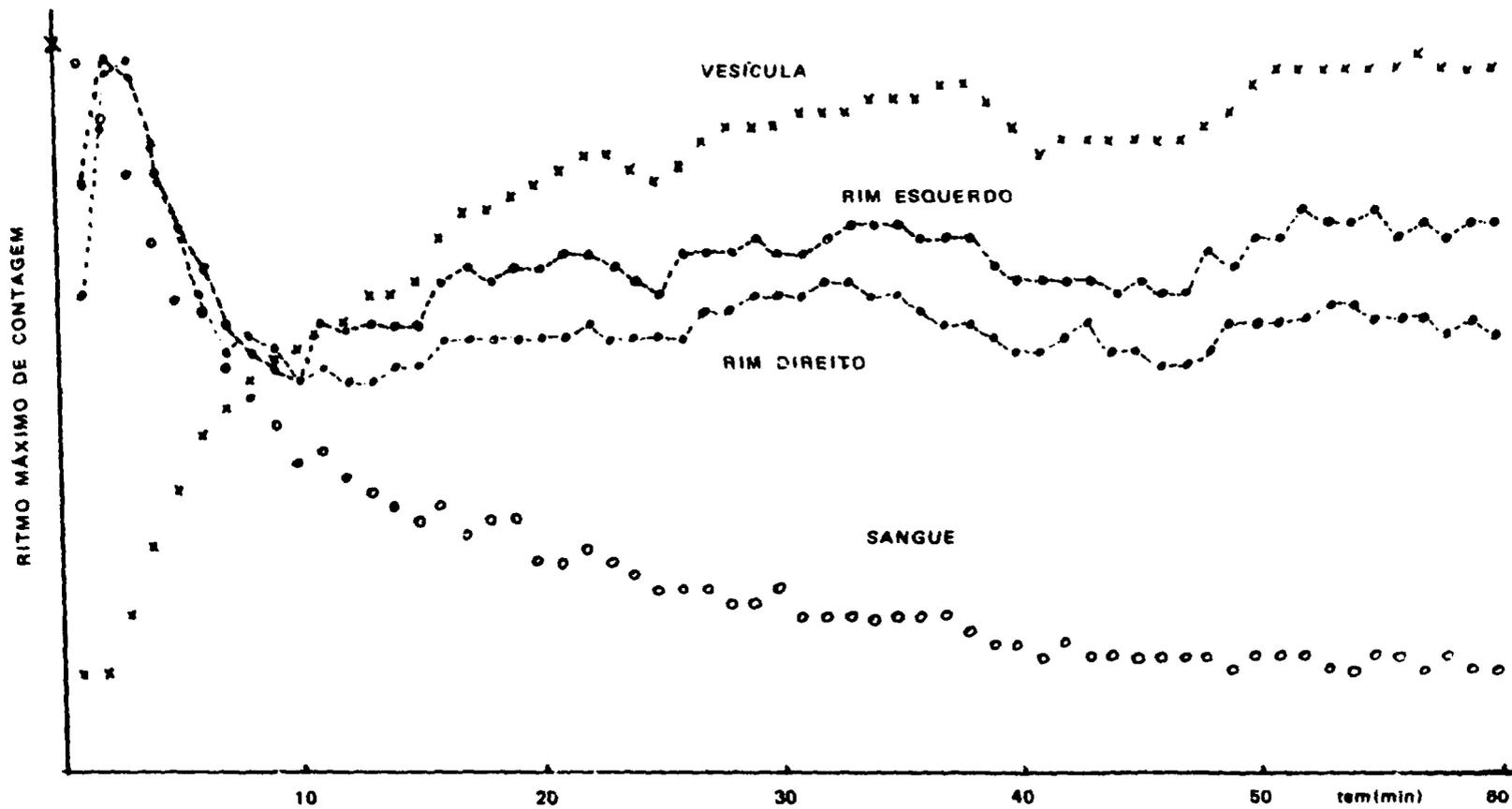


Gráfico 2 - Curva de resposta do GHA - ^{99m}Tc . (Asc Sn) Lote 0.034. Gama-Câmara (Nuclear Chicago). Acoplado a um Sistema Hewlett Packard Scintigraphic Data Analyser 5407-A. Dose injetada - $300\ \mu\text{Ci}$ Tempo de reação - 90 min.

GNA-^{99m}Tc
Lote: 0.019

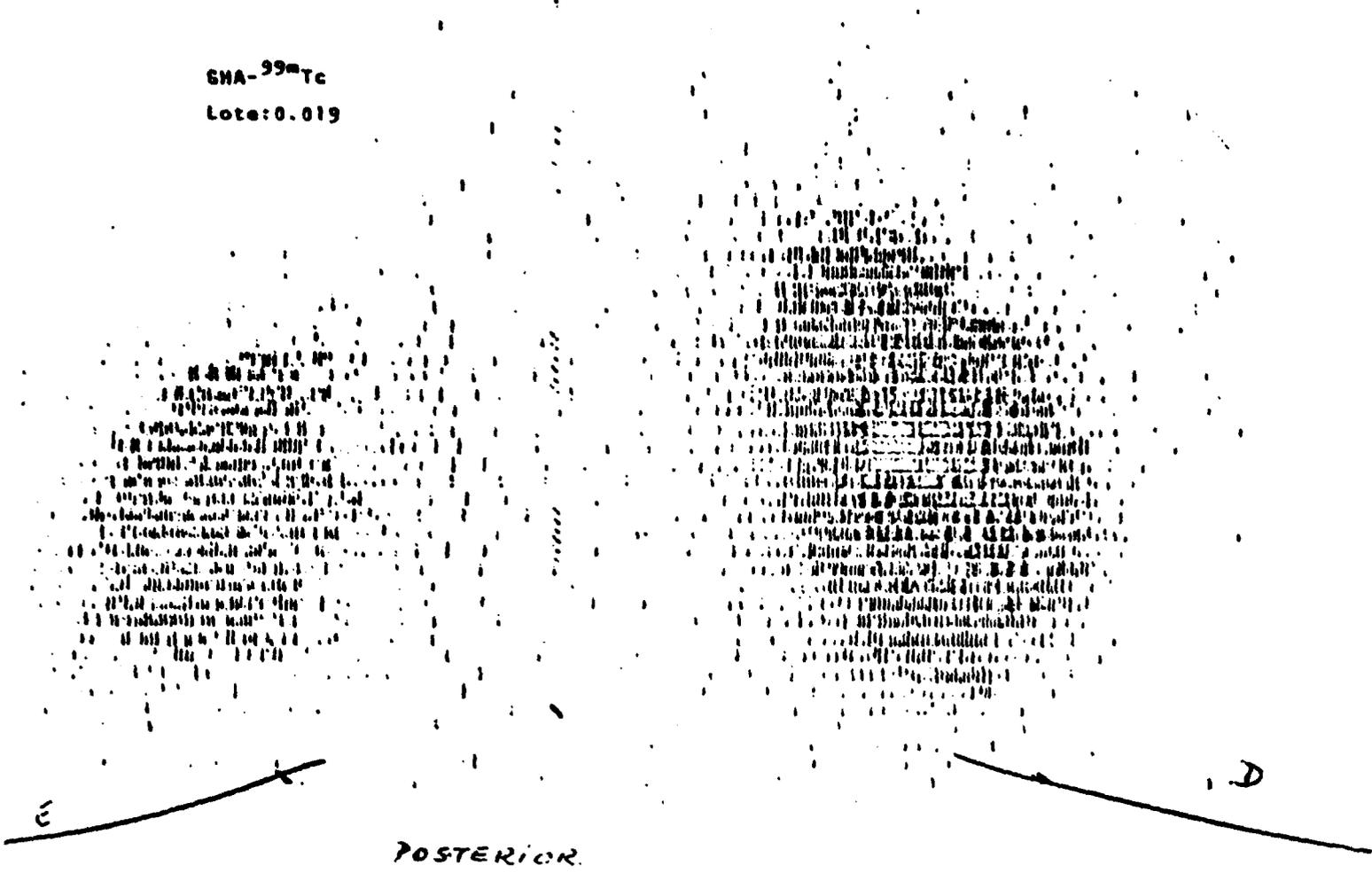


Figure 4

ABSTRACT

This paper presents the preparation of stannous ascorbate on the lyophilized form. This reducing agent was employed on the preparation of kits of calcium glucoheptonate (GHA) for labeling with ^{99m}Tc for use in kidney scintigraphy.

Comparative studies between kits prepared with stannous ascorbate and those prepared with stannous chloride as reducing agent were made.

The labeling yield during 18 hours after the addition of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was higher when stannous ascorbate was used.

The stability of kits of calcium glucoheptonate - ^{99m}Tc containing stannous ascorbate was studied during five months after its preparation on the lyophilized form.

On the fifth month the labeling yield of GHA - ^{99m}Tc was 89 - 95%, being therefore suitable for kidney scintigraphy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. DIXON, W. J. & MASSEY, F. S. *Introduction to statistical analysis*. N. Y. McGraw-Hill 1951. p. 167.
2. McRAE, J.; SUGAR, R. M.; SHIPLEY, B.; HOOK, G. R. Alterations in tissue distribution of ^{99m}Tc pertechnetate in rats given stannous tin. *J. Nucl. Med.*, 15(3):151-155, 1974.
3. MERLINN, L.; BESNARD, M.; COHEN, Y. The chemistry of technetium. The effect of oxidoreduction systems on the stability of complexes used as radiopharmaceuticals. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY. *Radiopharmaceuticals and labelled compounds, proceedings of the symposium, held in Copenhagen, 26-30 March, 1973*. 1974. V. 1, p. 63-70.
4. OWUNWANNE, A.; CHURCH, L. B.; BLAU, M. The effect of oxygen on the reduction of pertechnetate ions by stannous ion. *J. Nucl. Med.*, 15(8):521, 1974.
5. SOKAL, R. R. & ROHLF, F. S. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, Ca., Freeman W. H., 1969. p. 398.
6. TOFE, A. J. & FRANCIS, M. D. In vitro stabilization of a lowten bone imaging agent: (^{99m}Tc -Sn-HEDP) by ascorbic acide. *J. Nucl. Med.*, 17(9):820-5, 1976.
7. TUBIS, M. & ENDOWS, J. S. Research and development on stannous ascorbate as a new reductant for 99m sodium pertechnetate. *Clin. Nucl. Med.*, 5(95):145-55, 1980 (Supplement).
8. TUBIS, M. & ENDOW, J. S. *Stannous ascorbate new reducing agent for sodium pertechnetate ^{99m}Tc* . Ago. 29, 1981 (Personal communication).
9. ZIMMER, A. M. & PAVEL, D. G. Rapid miniaturized chromatographic quality procedures for Tc - 99m radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, 18(12):1230 - 33, 1977.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IPEN - CNEN/SP foram revistas e enquadradas na NB-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas.