

Validação do ensaio de pureza radioquímica do FDG (18F) por cromatografia em camada delgada

R. L. C. Leão¹; M. L. Oliveira¹; J. E. Nascimento¹; N. C. E. S. Nascimento¹

¹*Divisão de Produção de Radiofármacos - DIPRA, Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN/NE, 50.740-540, Recife-PE, Brasil*

renata.lleao@hotmail.com

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

Todas as metodologias utilizadas na indústria radiofarmacêutica devem ser validadas, a fim de garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Em uma indústria de radiofármacos, tem-se um desafio: às vezes não é possível usar um padrão estável (não radioativo) para realizar as análises de validação. Para superar esta dificuldade, o objetivo deste estudo foi sugerir um protocolo de validação para estas metodologias, com base nas recomendações do RE n° 899/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e provar a sua eficiência, realizando a validação do teste de pureza radioquímica do FDG (18F), por CCD. Para obter a curva de calibração, foi sugerido que os valores teóricos das atividades fossem determinados utilizando um calibrador de dose, simultaneamente a cada análise, realizada por CCD, durante 5 horas. O método foi linear (R^2 de 0,996), preciso (CV% <5%) e exato (96,85% <exatidão <102,56%). Em relação ao ensaio de robustez, nossos experimentos avaliaram a influência da distância percorrida pela fase móvel, as variações na concentração da fase móvel e do tipo de placa cromatográfica (placas de sílica gel em vidro ou em alumínio). Os limites de detecção e de quantificação foram determinados (321,9 e 1065,6 kBq, respectivamente). Como esperado, esta metodologia foi inespecífica, apresentando uma discreta mancha correspondente ao FDM. O protocolo proposto foi eficiente e a metodologia testada foi eficaz para determinar a pureza radioquímica de FDG (18F), atendendo aos limites preconizados pela ANVISA.

Palavras-chave: Validação, Pureza Radioquímica, FDG (18F)

Validation of the FDG (18F) radiochemical purity assay by thin layer chromatography

All methodologies utilized in radiopharmaceutical industry should be validated in order to prove that they meet the requirements of analytical applications, ensuring the reliability of the results. At a radiopharmaceutical industry there is one challenge aspect: sometimes it is not possible use a stable standard to perform the validation analysis. In order to overcome this difficulty, the objective of this study was to suggest a validation protocol for these methodologies, based on the recommendations of RE n° 899/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), and prove its efficiency, performing the radiochemical purity validation test of FDG (18F), by TLC. To obtain the calibration curve, we suggested that the theoretical activity values should be determined using a dose calibrator, simultaneously of each analysis performed by TLC, for 5 hours. The method was linear (R^2 of 0.996), precise (CV% <5%) and accurate (96.85% < accuracy < 102.56%). In relation to the robustness test, our experiments evaluated the influence of the distance travelled by mobile phase, variations at mobile phase concentration and type of chromatographic plate (silica gel on glass or aluminium plates). The detection and quantification limits were determined (321.9 and 1065.6 kBq, respectively). As expected, this methodology was nonspecific, showing a slight spot corresponding to the FDM. The proposed protocol was efficient and the methodology tested was effective to determine the radiochemical purity of FDG (18F), in accordance to the limits recommended by ANVISA.

Keywords: Validation, Radiochemical purity, FDG (18F)

1. INTRODUÇÃO

“Radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Compreendem também os componentes não radioativos para marcação, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos”¹.

Atualmente, o 2-[¹⁸F] Flúor-desoxi-D-glicose [FDG (18F)], é um dos principais

radiofármacos produzidos no Brasil que é utilizado nos exames PET (do inglês *Positron Emission Tomography*)². Trata-se de uma molécula de glicose marcada com o isótopo 18 do flúor no seu carbono 2. Este composto atua como um traçador do metabolismo da glicose no organismo, tendo afinidade pelas células que utilizam em grande quantidade este carboidrato como fonte energética, principalmente as células cancerígenas³. Este é o principal motivo pelo qual o FDG (18F) possui alta especificidade no diagnóstico precoce de tumores malignos, conseguindo detectar massas tumorais de até 2 mm⁴. Além dessa aplicação, este radiofármaco também é utilizado nas áreas de neurologia e cardiologia, sendo importante no diagnóstico da Doença de Alzheimer, avaliação de epilepsia e na pesquisa de viabilidade miocárdica⁵.

O FDG (18F) é sintetizado rotineiramente pelo Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE), órgão vinculado a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), e enviado a hospitais do Recife, Natal e Paraíba. Outros centros produtores da CNEN, tais como o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - SP), o Instituto de Energia Nuclear (IEN - RJ), o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDNT - MG), também são responsáveis pela distribuição do radiofármaco no país. Desde 2006, com a aprovação da Emenda Constitucional n° 49, fica permitida a instalação de centros privados de produção de radiofármacos PET, o que contribuiu para aumentar a malha de distribuição deste tipo de medicamento em território nacional, que hoje conta com um total de 12 centros produtores.

O FDG (18F) é um fármaco de administração intravenosa e possui meia vida curta, em torno 109 min⁶. Após a sua produção, alíquotas são enviadas aos laboratórios de controle de qualidade, onde são realizadas as análises microbiológicas e físico-químicas antes da injeção do medicamento no paciente. O controle de qualidade garante a segurança da utilização do medicamento, realizando análises de pureza química, radioquímica, identidade radionuclídica, pH, solventes residuais, apirogenicidade e esterilidade.

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a pureza radioquímica de um radiofármaco é a fração da radioatividade total que está na forma química desejada⁷. Neste caso, a proporção de ¹⁸F livre e ¹⁸F ligado à manose [FDM (18F)] em relação à forma incorporada à glicose [FDG (18F)] devem apresentar-se em níveis limitados. De acordo com a USP (2010), a fração de ¹⁸F livre não deve exceder 10%⁸, enquanto que a EP (2010), exige que frações de ¹⁸F livre e FDM (18F) não devem ultrapassar 5% e 10%, respectivamente⁹. A pureza radioquímica pode ser testada tanto por cromatografia em camada delgada (CCD) como por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^{8,9,10}. Entretanto, antes de sua implementação rotineira, a metodologia escolhida deve ser validada.

A validação de uma metodologia analítica é a evidência documentada de que um método é adequado para a sua finalidade, sendo considerado preciso, específico, reprodutível e robusto, dentro das condições analíticas estabelecidas¹¹. Várias agências regulamentadoras disponibilizam guias de validação de metodologias, tais como, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹², o *Food and Drug Administration* (FDA)¹³, *United States Pharmacopeia* (USP)⁸ e a *International Conference on Harmonization* (ICH)^{14,15,16}, contudo, não existe uma fonte ou guia específico para metodologias que utilizam radiação ionizante.

Desta forma, o objetivo do estudo foi realizar a validação do ensaio de pureza radioquímica do FDG (18F), baseado nas recomendações da RE 899/2003 da ANVISA¹², sendo realizadas as alterações necessárias para adequar o guia à metodologia de detecção radioativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Descrição do teste de pureza radioquímica

O ensaio de pureza radioquímica foi realizado pela da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), na qual foi utilizada placa de sílica gel como fase estacionária e solução aquosa de acetonitrila 95% como solvente. Duas alíquotas de 10 µL referentes ao padrão de FDG (0,01 mg/mL, preparado com solução de acetonitrila:água 95:5) (P_{FDG}), e uma alíquota de 2 µL referente a amostra de FDG (18F) (A_{FDG-18}) foram aplicadas na borda da placa, como ilustrado na Figura 1. Após corrida cromatográfica, a placa foi submetida à leitura em um detector de radiação colimado, ou radiocromatógrafo (Beta Detector GMC), baseado em um detector do

tipo Geiger-Muller (sensibilidade de 10 Bq em 10 min e resolução espacial de 2-3 mm), para quantificação da radioatividade. Para controle do radiocromatógrafo foi utilizado o software MiniGita Control (Raytest, Alemanha) e, em seguida, para obtenção do cromatograma, utilizou-se o software Gina Star TLC (Raytest, Alemanha), selecionando-se a opção *baseline region*, que integra os sinais subtraindo automaticamente o valor da radioação de fundo. Posteriormente, foi determinada a localização do padrão de FDG através da sua revelação (teste de mancha), borrifando a placa com ácido sulfúrico 2N e aquecendo-a a 110°C, por 2 minutos, em chapa aquecedora (Fisatom, modelo 503). O fator de retenção (R_f) correspondente à mancha obtida com o padrão de FDG foi então comparado com o R_f determinado pelo radiocromatógrafo. Como critério de aceitação do teste de pureza radioquímica, o R_f da amostra de FDG (18F), obtido no radiocromatógrafo, deverá corresponder ao R_f do padrão de FDG ($0,4 \leq R_f$ do padrão $\leq 0,6$). Para aprovação do lote do FDG (18F), pelo menos 90% da radioatividade do radiofármaco produzido deverá ser proveniente do FDG (18F) e FDM (18F), certificando que menos de 10% seja proveniente da presença de possíveis contaminantes, como o flúor-18 livre ($R_f = 0,0$) e produtos acetilados ($R_f = 0,8 - 0,95$).

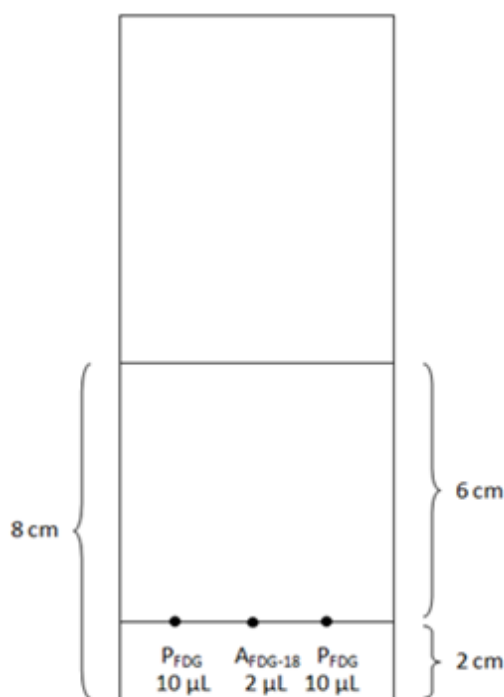


Figura 1: Esquema do preparo da placa cromatográfica para o ensaio de pureza radioquímica. P_{FDG} : Padrão de FDG, A_{FDG-18} : Amostra de FDG (18F).

2.2 Parâmetros da validação do teste de pureza radioquímica

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, robustez, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) radioativos, limite de detecção do teste de mancha, precisão, exatidão e especificidade.

A falta de padrões de referências de variadas concentrações de atividade para se construir uma curva de calibração foi o primeiro desafio encontrado durante a validação. Por isso, foram utilizadas amostras de FDG (18F) radioativas. As medições foram realizadas simultaneamente no radiocromatógrafo, a fim de se obter as áreas dos picos referentes ao FDG (^{18}F), e no medidor de atividade (activímetro PTW Curiementor4).

Os resultados das medições realizadas no activímetro (média de cinco repetições) foram considerados como os valores teóricos de atividade e foram utilizados para a construção da curva de calibração. O gráfico gerado possui, então, no eixo das abscissas, as médias das atividades medidas pelo activímetro e, no eixo das ordenadas, o valor correspondente às áreas

sob os picos geradas pelo radiocromatógrafo. As curvas de calibração foram preparadas com cinco níveis de concentração de atividade (P_1 a P_5). As análises foram iniciadas logo após a produção do FDG (^{18}F) e analisadas durante 5 horas com um intervalo de 1 hora entre as determinações. Como não é possível controlar exatamente a atividade da amostra de FDG (^{18}F) produzida, o intervalo de concentração da atividade variou entre os dias analisados e serão especificados no decorrer da metodologia.

Para avaliação da linearidade foram construídas e testadas três curvas de calibração empregando-se uma faixa de atividade de 4.568,76 – 21.428,92 kBq (125-570 μCi). A variância da curva de regressão linear foi estimada pelo método dos mínimos quadrados e foram analisados os coeficientes de variação entre as três curvas, referente a cada nível de concentração de atividade (P_1 a P_5).

Na determinação da robustez, foram avaliadas a influência da distância percorrida pela fase móvel ($\Delta d = 5,5; 6,0; 6,5$ cm), de pequenas variações na concentração da fase móvel acetone:água (94:6, 95:5 e 96:4 v/v) e do tipo da placa cromatográfica utilizada (vidro e alumínio).

O LD e o LQ da medição radioativa foram estimados pelas fórmulas descritas na RE n° 899 da ANVISA¹². O teste de visualização da mancha (teste de mancha) foi avaliado seguindo duas metodologias: 1) por meio da análise do volume de aplicação da alíquota (10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 μL) do padrão de FDG (0,1 mg/mL), e 2) por meio da avaliação do LD através de testes com diluições sucessivas do padrão, abrangendo uma faixa de 0,08 a 0,01 mg/mL com intervalos de 0,01 mg/mL.

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade (precisão intradia) em triplicata (três dias distintos, com operadores diferentes). Os resultados dos três dias foram analisados independentemente, ou seja, não foi possível comparar os resultados entre cada dia (precisão intermediária), devido às variações das atividades do radiofármaco produzido em dias diferentes.

Tanto para os ensaios de precisão como para os de exatidão, foram utilizadas três amostras de FDG (^{18}F) de mesmo lote (corridas em três placas distintas) e em três níveis de concentração de atividade (baixa, média e alta), totalizando nove determinações. As faixas de concentração da atividade das curvas de calibração foram: 4766,34 – 21591,72 kBq (128,82 - 583,56 μCi) (1° dia); 8372,36 – 38110 kBq (226,28 – 1030 μCi) (2° dia); 17936,86 – 97850,2 kBq (484,78 - 2644,6 μCi) (3° dia). Foram calculados o desvio padrão relativo (DPR) para a precisão e o percentual de resposta da concentração para a exatidão, seguindo as equações descritas pela ANVISA¹². Nestes dias, os estudos de linearidade foram repetidos nos intervalos acima descritos devido às variações de atividade entre as amostras, que não correspondiam à faixa de valores utilizada no estudo inicial de linearidade.

A especificidade da metodologia foi avaliada submetendo os outros componentes que podem estar presentes no radiofármaco, FDG (0,1 mg/mL), FDM (0,1 mg/mL), aminopoliéter (0,05 mg/mL) e glicose (0,5 mg/mL), ao processo de revelação, após corrida cromatográfica. A mancha somente deverá aparecer no local de corrida do padrão de FDG (R_f entre 0,4 e 0,6).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são mostrados os dados para obtenção das três curvas de calibração do ensaio de linearidade, das médias e dos coeficientes de variação para cada nível de concentração de atividade, sendo que, os valores obtidos para o CV% foram sempre inferiores a 5%. Na Figura 2 é apresentado o gráfico do ajuste linear das três curvas de calibração pelo método dos mínimos quadrados ordinários. A partir deste ajuste, foi obtida a equação da curva de calibração, que relaciona a área sob os picos do cromatograma à concentração de atividade. O método foi linear na faixa de 4568,76 - 21428,92 kBq (125-570 μCi) e o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,996, atendendo à exigência da ANVISA ($R^2 \geq 0,99$)¹².

Tabela 1: Dados dos ensaios de linearidade das três curvas de calibração para o FDG (18F).

Hora	Concentração de Atividade (kBq)			Áreas dos picos (C/mm*1000)			Média das áreas (C/mm*1000)	Desvio Padrão (σ)	CV(%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
1	21428,92	21325,32	20413,64	66960,5	69269,86	67289,14	$67,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	1,8
2	14660,88	14595,76	14087,38	46313,43	49126,93	47236,14	$47,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	2,9
3	10073,62	10027	9583	31837,14	32254,43	30879,14	$316,6 \times 10^2$	$7,1 \times 10^2$	2,2
4	6893,1	6860,54	6544,56	21601,43	21487,93	21263,29	$214,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	0,8
5	4718,98	4693,82	4568,76	14004,5	14698,21	14071,86	$142,6 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	2,7

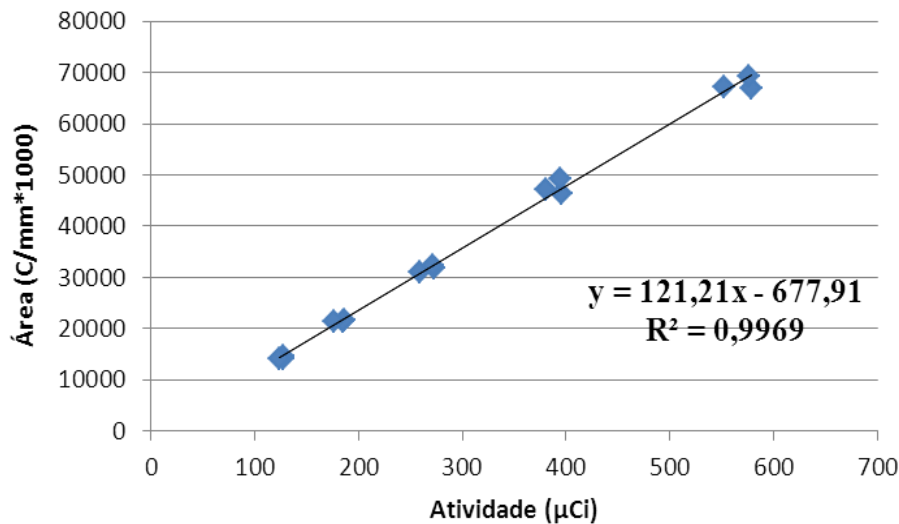


Figura 2: Gráfico da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários das três curvas de calibração do FDG (18F).

Na Tabela 2 estão apresentadas as médias dos resultados dos ensaios de validação.

Tabela 2: Média dos resultados dos ensaios da validação.

Linearidade	Robustez (CV%)			LD radioativo	LQ radioativo
	Distância percorrida pela fase móvel	Concentração da fase móvel	Tipo de placa cromatográfica		
0,996	5,0%	4,9%	1,4%	321,9 kBq 8,7 µCi	1065,6 kBq 28,8 µCi
Precisão (%)			Exatidão (%)		
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1,59	3,41	2,79	102,56	97,58	96,85

Com base nestes resultados, pode-se concluir que a metodologia é linear, robusta e sensível, nas condições experimentais descritas. Os resultados do ensaio de robustez mostraram que os dois tipos de placas cromatográficas (vidro e alumínio) podem ser utilizados na rotina do laboratório, pois não apresentaram variações significantes entre os resultados obtidos ($CV\% = 1,4\%$). As análises das distâncias percorridas pela fase móvel e das concentrações do solvente apresentaram os coeficientes de variação, 5,0 e 4,9, respectivamente, mostrando que o método é robusto nestas condições. A precisão, avaliada por meio dos coeficientes de variação dos resultados obtidos, foi inferior a 5%, como exigido pela ANVISA¹² e a exatidão do método apresentou valores próximos a 100% (de 96,85% a 102,56%).

No ensaio do limite de detecção do teste de mancha, a concentração mínima do padrão de FDG que pôde ser detectada foi 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3) e todas as alíquotas do padrão de FDG 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (10-0,5 μL) foram positivas (Figura 4), não havendo, portanto, um limite de detecção referente ao volume da alíquota.

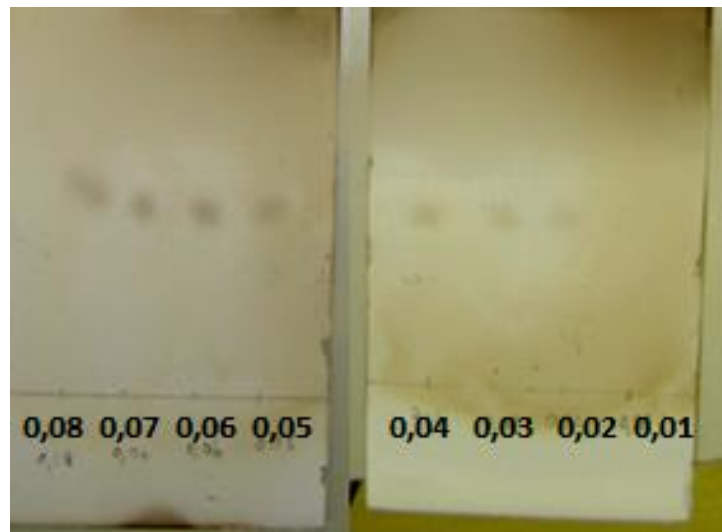


Figura 3: Ensaio do limite de detecção do teste de mancha com concentrações decrescentes do padrão de FDG.

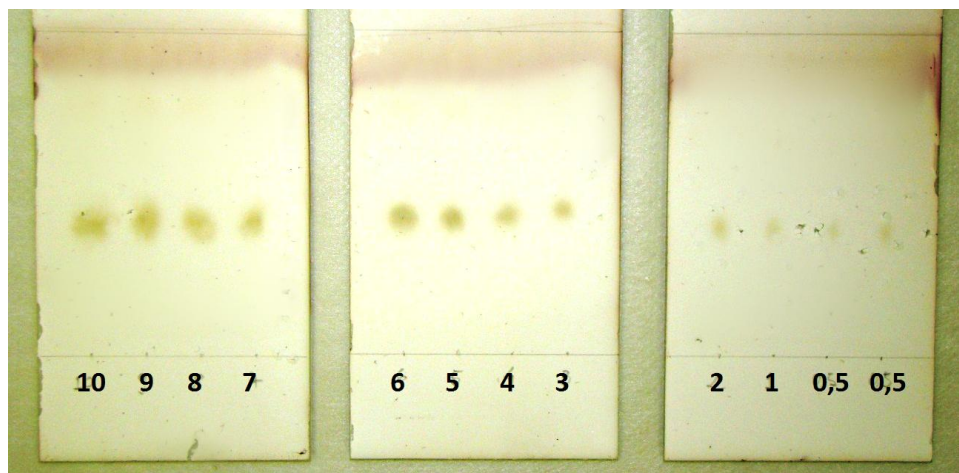


Figura 4: Ensaio do limite de detecção do teste de mancha com alíquotas decrescentes do padrão de FDG 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

O método foi considerado específico com relação ao aminopoliéter e à glicose, pois não foram visualizadas manchas correspondentes a estes dois analitos (resultados negativos). Porém, foi observada a formação de uma mancha discreta no local de corrida do FDM (Figura 5), no mesmo R_f em que o FDG. Isto mostrou que a metodologia é inespecífica neste ponto, sendo

capaz de detectar outra substância (FDM) que não era a de interesse (FDG), devido à semelhança estrutural entre estas moléculas. Contudo, uma segunda metodologia descrita pela USP⁸ e EP⁹, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é capaz de separar e quantificar os analitos, FDM e FDG.



Figura 5: Ensaio de especificidade do método de pureza radioquímica do FDG (18F). K : kryptofix (aminopoliéter); G : glicose.

4. CONCLUSÃO

A metodologia em estudo foi eficiente para a determinação da pureza radioquímica do FDG (18F) e apresentou resultados satisfatórios nos ensaios de validação, podendo ser utilizada na rotina com confiabilidade dos resultados.

Por não existir uma legislação vigente que contemple protocolos de validação para métodos de detecção radioativa, foram necessárias algumas alterações no protocolo original da RE nº 899/ANVISA para a validação do teste de pureza radioquímica. A falta de soluções padrões de concentração de atividade conhecida obrigou a utilização da própria amostra de FDG (18F) radioativa nos ensaios de validação. Para cada análise realizada pelo radiocromatógrafo, foi necessária a análise simultânea por um activímetro para determinação da atividade teórica da amostra. Na determinação da linearidade, precisão e exatidão, foi preciso esperar o decaimento da amostra durante 5 horas para poder construir curvas de calibração com cinco níveis de concentração de atividade. Também, como não é possível controlar exatamente a concentração de atividade da amostra de FDG (18F) produzida, o ensaio da precisão intermediária não pôde ser realizado.

Mesmo sem trabalhos descritos em literatura, foi possível a realização da validação do método, o qual se mostrou robusto, linear, sensível, preciso, exato e específico, dentro das condições dos experimentos.

1. ANVISA. Resolução RDC Nº 64. Lista das Denominações Comuns Brasileiras - DCB da Farmacopeia Brasileira. 28 de Dezembro de 2012.
2. Bernardes ES. Desenvolvimento e produção de radiofármacos emissores de pósitrons com aplicações diagnósticas em oncologia. Centro de Documentação e Informação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Set de 2012. Disponível em <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/55078/desenvolvimento-producao-radiofarmacos-emissores-positrons/>> Acesso em: 1 de março de 2013.
3. Yu, S. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. Biomedical Imaging and Intervention Journal, 2006. Disponível em <<http://www.bijj.org/2006/4/e57>> Acesso em: 03 Fev. de 2013.

4. Junior JS, Fonseca RP, Cerci JJ, Buchpiguel CA, Cunha ML, Mamed M, Almeida SA. Lista de Recomendações do Exame PET/CT com 18F-FDG em Oncologia. Consenso entre a Sociedade Brasileira de Cancerologia e a Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular. *Radiol Bras*, vol. 43(4), p. 255-259, Jul/Ago de 2010.
5. Villas Boas Radiofármacos. [2][18F]FDG- Bula para o Profissional de Saúde.
6. Map Medical Technologies Oy Helsinki. Summary of Product Characteristics, set 2009.
7. Farmacopeia Brasileira, IV ed., parte I. Editora Atheneu, São Paulo, 1988.
8. United States Pharmacopeia Convention - USP. 33th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.
9. European Pharmacopeia – EP. 7th ed. London: Stationery Office, 2010.
10. Hung JC. Comparison of Various Requirements of the Quality Assurance Procedures for the ¹⁸F-FDG Injection. *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 43, no. 11, Nov. de 2002, p. 1495- 1506.
11. Shabir HA. Validation of High-performance liquid chromatography methods for pharmaceuticals analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 57-66.
12. ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, RDC n°. 899, 29 de maio de 2003.
13. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation. Ago., 2000. Disponível em <<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-505-method-validation-draft.pdf>> Acesso em: 2 de março de 2013.
14. International Conference on Harmonisation (ICH). Guideline for Industry: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. Março de 1995. Disponível em: <<http://www.labcompliance.de/documents/international/ich/h-307-ich-fda-methods-terminology-ichq2a.pdf>> Acesso em: 2 de março de 2013.
15. International Conference on Harmonisation (ICH). Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Nov. de 1996. Disponível em: <<http://www.labcompliance.de/documents/international/ich/h-308-ich-fda-methods-methodology-ichq2b.pdf>> Acesso em: 2 de março de 2013.
16. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Nov. De 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf> Acesso em: 2 de março de 2013.