

FORMULACIÓN DE ^{99m}Tc -SULFURO NANOCOLOIDAL PARA ESTUDIOS LINFOGRÁFICOS

F. I. Zayas Crespo^{1*}, N. Mesa Dueñas¹, Y. Alfonso Marín¹, L. González Nuñez¹, J. Arenas Alatorre² y F. Batlle Leal¹

¹ Instituto de Nefrología Dr. Abelardo Buch López. Ave. 26 y Ave. Rancho Boyeros. Plaza. La Habana. Cuba

² Instituto de Física UNAM. Departamento de Materia Condensada. México.

*Autor de correspondencia: Dr. F. Zayas. Calle Pérez No. 604 E/Manuel Pruna y Juan Alonso. Luyanó. 10 de Octubre. CP-10700. La Habana. Cuba. E-mail: paco.zayas@infomed.sld.cu, Teléfono: 537-6908655, Fax: 537-8812413

Recibido: Septiembre 2012 Aprobado: Febrero 2012

Publicado: Febrero 2012

RESUMEN

La visualización del ganglio centinela en pacientes afectados de tumores mamarios y prostáticos es un procedimiento rutinario en medicina nuclear. Nuestro país carece de un radiofármaco para tales fines. El objetivo del presente trabajo consistió en la formulación de ^{99m}Tc -Sulfuro Coloidal, de modo tal que las partículas coloidales posean un tamaño de 20 - 100 nm y cuya pureza radioquímica sea mayor de 90.0 %, lo cual permitirá posteriormente el desarrollo de estudios linfográficos en pacientes. A tal efecto se compararon diferentes procedimientos descritos en la literatura, de estos se seleccionó el procedimiento de Steigman, al cual se le modificaron la concentración de tiosulfato y del agente protector del nanocoloide, así como el pH final del radiofármaco, con el fin de obtener partículas cuyos tamaños promedios se encuentren dentro del rango señalado anteriormente. El control de la pureza radioquímica del radiofármaco se evaluó por cromatografía en papel ascendente, utilizando como solvente solución salina fisiológica. La determinación del tamaño de las partículas se desarrolló por filtración a través de membranas con poros de 0.45, 0.22 μ y 0.1 μ ; además se realizaron microfotografías electrónicas para verificar dicho tamaño y determinar la forma de las partículas. Como resultado se obtuvo un ^{99m}Tc -sulfuro nanocoloidal cuya pureza radioquímica inicial varió entre 93.0 - 97.0 %, el cual una vez modificado por medio del calentamiento a pH alcalino, disminuyó la pureza radioquímica a 90.0 - 93.0 %, las partículas coloidales presentaron diámetros inferiores a 220 nm y dentro de esta población 70 - 80 % poseen diámetros menores de 100 nm. Los resultados de la microscopía electrónica confirmaron los hallazgos obtenidos en la filtración, mostrando partículas menores de 100 nm y la generalidad de estas fueron aproximadamente esféricas. Esto significa que el radiofármaco obtenido cumple los requisitos básicos para su aplicación en la detección del ganglio centinela.

Palabras clave: nanocoloide, ^{99m}Tc , linfografía

ABSTRACT

The visualization of sentinel nodes in patients, who have been affected by breast and prostatic cancer is a procedure of common use in nuclear medicine. Our country has not a radioactive nanocolloid for this purpose.

The objective of the present work consisted in the formulation of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc -Sulfuro Colloidal, in a way that the colloidal particles have a size of 20 - 100 nm, and a radiochemical purity higher than 90.0 %, which will permit the development of lymphographic studies in patients. To take effect a comparison of different procedures described in the literature was made, from these the Steigman's procedure was chosen, and a modification of this procedure is made. A modification of the tiosulphate and protector agent concentrations was done, and the final pH of the radiopharmaceutical, with the purpose to obtain particles with the average size in the range described before.

The control of the radiochemical purity of the initial and final radiopharmaceutical was evaluated by means of ascending paper chromatography, using sodium chloride 0.9 % as a solvent. The determination of the average size of the particles was made by filtration through membranes of pore diameter of 0.45, 0.22 and 0.1 μ , besides we made an electronic microphotographies to verify the size and establish the shape of the particles. As a result of the modifications made, a ^{99m}Tc -Sulfur nanocolloid was obtained with initial radiochemical purity around 93.0 - 97.0 %, this radiopharmaceutical once modified by pH and boiling water, decreased its radiochemical purity to 90.0 - 93.0 %, with colloidal particles lower than 220 nm, and from this population 70 - 80 % had a diameter lower than 100 nm. The transmission electronic microscopy confirmed the results obtained by membrane filtration, showing particles with diameters lower than 100 nm, and the generality of the particles have a spherical shape. This means that the radiopharmaceutical has the basic requirements for its application in the detection of sentinel node.

Keywords: nanocolloids, ^{99m}Tc , lymphoscintigraphy

INTRODUCCIÓN

Nuestro país carece de un radiofármaco que permita visualizar el ganglio centinela, por imágenes obtenidas a través de Medicina Nuclear.

La aplicación de radionanocoloides para visualizar las cadenas ganglionares es un procedimiento establecido en medicina nuclear [1]. De modo irregular se ha visualizado el ganglio centinela en el país, utilizando formulaciones importadas y con ^{99m}Tc -Sulfuro Coloidal filtrado por membranas de 0.1 μ .

Desde el año 1965 [2] en el mundo se aplican radionanocoloides. Los primeros se basaron en el ^{198}Au -Coloidal, de adecuado tamaño molecular, pero con desfavorables características físicas [3] y complejidad en la formulación del mismo.

Para obviar estas dificultades se desarrollaron coloides de ^{99m}Tc -Sulfuro de Renio [4], ^{99m}Tc -Sulfuro de Antimonio [4], ^{99m}Tc -Sulfuro [5-7], ^{99m}Tc -Albúmina [8] y ^{99m}Tc -Dextrana [9-12].

Con excepción del nanocoloide de albúmina [8], los restantes [2, 4, 5-7] requieren adiciones sucesivas de sus componentes, hasta lograr el radiofármaco final.

El objetivo del presente trabajo consistió en la formulación y evaluación de un radiocoloide de azufre, que permita su aplicación en la visualización del ganglio centinela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de un nanocoloide de azufre se compararon tres formulaciones [4-6] para la elaboración del ^{99m}Tc -Sulfuro Coloidal. Posteriormente se tomó como formulación de partida la descrita por Steigman y cols. [5].

En la formulación del nanocoloide se utilizaron ampollas de tiosulfato de sodio al 8 %, producidas por la Industria Médico Farmacéutica, ácido clorhídrico, fosfato dibásico de sodio anhidro, la sal disódica del ácido etilen diamino tetracético dihidratado, hidróxido de sodio y gelatina.

Los reactivos químicos fueron de calidad para análisis de la firma Merck.

Formulación del nanocoloide de azufre.

Solución A: se tomó 0.9 mL de una ampolla de tiosulfato de sodio y se disolvió en 18 mL de agua estéril para inyección (AEPI). Se guardó a T- 4° C hasta su utilización.

Solución B: solución de ácido clorhídrico (HCl) 1.0 M. Se conservó a 4° C hasta su empleo.

Solución C: se pesó 90 mg de gelatina, 255 mg de Na_2HPO_4 y 28 mg de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se depositaron en un beaker de 20 mL. Se añadió 6,0 ml de AEPI, se agitó hasta disolución con calentamiento y se enrasó en una probeta a 10,0 mL. Se transfirió a un frasco limpio y se conservó en congelación hasta su utilización.

Solución D: solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1,0 M. Se mantuvo a 4° C hasta su utilización.

Preparación inicial del nanocoloide de azufre.

En un frasco de inyectable al vacío se añadieron 3,0 mL de Solución A, 1,5 mL de Solución B y 1,0 mL de Solución C. El volumen se completó a 10 mL con AEPI. Se colocó el frasco en un contenedor que permitió el intercambio calórico y se añadió 0,2 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a dicho frasco. El contenedor se transfirió hacia un baño de agua hirviendo y se incubó 10 minutos. Se extrajo el contenedor y se enfrió la mezcla. Se tomó una alícuota para controlar la pureza radioquímica como se describirá posteriormente.

Se añadió a la solución restante un volumen de NaOH 1,0 M de modo que el pH ascienda hasta 8,0 – 10,0. Se transfirió el contenedor hacia el baño de agua hirviendo y se repitió el proceso de calentamiento ya descrito.

Formulación modificada del nanocoloide de azufre.

Solución A: como se describió en la formulación inicial.

Solución B: como se describió en la formulación inicial.

Solución C: se pesaron 180 mg de gelatina y se depositó esta en un beaker de 20 mL. El resto del procedimiento fue como se describió en la formulación inicial.

Solución D: solución de NaOH 1,0 M

Se realizaron 3 experimentos diferentes para determinar la influencia de los volúmenes de las soluciones A, B, C y D en la obtención de los nanocoloides de azufre, primero variando volúmenes de solución A y aumentando el volumen de solución C, a continuación en otro experimento se varió el volumen de ácido clorhídrico (solución B) y en el último se varió el volumen de NaOH en la formulación.

Preparación modificada final del nanocoloide de azufre.

En un frasco de inyectable al vacío (ver **Diagrama de Flujo**) se añadió consecutivamente 1,0 mL de Solución A, 0,78 mL de Solución B, 1,0 mL de Solución C, 7,2 mL de AEPI y 0,2 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Se colocó el frasco en el contenedor y se incubó en agua hirviente 10 minutos. El contenedor se extrajo y enfrió, se tomó una alícuota del radiofármaco para controlar la pureza radioquímica como se describirá posteriormente.

El resto del procedimiento es como se describió anteriormente.

Diagrama de flujo: Formulación de ^{99m}Tc -Sulfuro Nanocoloidal

Frasco al vacío

1,0 mL Sln. A
0,78 mL Sln. B
1,0 mL Sln. C
7,2 mL AEPI

Contenedor plomado

0,2 mL ^{99m}Tc

T- 100° C t-10'

Alícuotas para C. Calidad

Sln. D pH 8-10

T- 100° C t-10'

^{99m}Tc -Sulfuro Nanocoloidal

Esterilización de soluciones.

Las soluciones se esterilizaron por filtración a través de membranas estériles de 0,22 μ y por autoclave. Se extrajeron alícuotas hacia frascos estériles, las que se conservaron a 4° C hasta la realización del control microbiológico.

Control de Calidad.

Control de la Pureza Radioquímica.

Se realizó a partir de una modificación del procedimiento descrito por Pagano da Silva C. [13], la modificación consistió en utilizar NaCl 0,9 % como solvente en lugar de metil etil cetona en la cromatografía en papel ascendente.

Se prepararon tiras de papel Whatman No. 1 de 0,5 x 7,0 cm², se marcó el punto de aplicación a 5 mm de uno de los extremos y el frente a 6,5 cm.

Se tomaron las tiras de papel y se les aplicaron una gota del radiofármaco sobre el punto de aplicación, se colocaron en cámaras que contenían NaCl 0,9 % y se desarrolló la cromatografía hasta el frente. Las tiras se retiraron y secaron a 80 °C. Se cortaron cada una en secciones de 1 cm y se determinó la actividad de cada porción en un contador de pozo.

La pureza se determinó a partir del por ciento de actividad retenido en el punto de aplicación.

Control del tamaño de las partículas por filtración.

Se tomó un filtro con membrana de 0,45 μ , 0,22 μ o 0,1 μ y se humedeció este filtrando 0,5 mL de AEPI. Se filtraron 0,2 mL del radiofármaco hacia un tubo de cristal. Se lavó el filtro con 1,0 mL de AEPI y se recuperó este junto al filtrado inicial.

El filtro se envolvió con celofán, se transfirió al activímetro y se determinó la actividad del mismo. Se tomó el tubo de cristal y se determinó la actividad de la solución. El por ciento de actividad asociada a esta solución, representó las partículas con diámetros inferiores a 450, 220 o 100 nm.

Control del tamaño de las partículas por microscopía electrónica.

Se realizó con alícuotas inactivas en el Departamento de Materia Condensada, del Instituto de Física de la UNAM. Para la observación morfológica se tomó una gota de la solución coloidal y se colocó sobre una rejilla de cobre de 300 mesh cubierta con una membrana de soporte de coloidón y carbón amorfo. No se hizo ningún sombreado. Las muestras fueron observadas con la técnica de STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) en un microscopio electrónico JEM2010FEG de la JEOL, con resolución punto a punto de 0.19 nm.

Control de pureza microbiológica.

Se desarrolló a partir de las alícuotas iniciales, las que se enviaron al Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), para la evaluación de esterilidad y apirogenicidad.

Estudios de estabilidad en el tiempo.

Se prepararon diferentes lotes de las soluciones A, B, C y D, una vez concluida la esterilización, se rotularon con la fecha de su preparación y se depositaron en el congelador de un refrigerador Haier.

Durante intervalos de 30 días se extrajo un lote, se descongeló y se procedió a la preparación y control de calidad del radiofármaco. Las soluciones restantes se congelaron nuevamente hasta el próximo control de calidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de seleccionar un procedimiento se compararon formulaciones [4-6] que abordan la preparación de ^{99m}Tc-Sulfuro Coloidal.

Como se muestra en la Tabla 1, todas cumplían con una pureza radioquímica inicial elevada, la que disminuía ligeramente tras el segundo calentamiento en agua hirviendo, tal y como se reportaba en la literatura [4-6]. Sin embargo, para la formulación de Steigman [5] se

elevó considerablemente el por ciento de actividad que filtró a través de la membrana de 0,45 μ tras la segunda incubación en agua hirviendo, lo que apuntaba a este procedimiento como el de mejores características para la obtención de nanopartículas.

Tabla 1. Comparación de procedimientos de ^{99m}Tc-Sulfuro Coloidal

Fuente	% Pureza		% filtrado 0,45 μ	
Krogsgaard	94.9	(92.5*)	0.0	(0.0*)
Rosenthal	100.0	(90.6*)	3.5	(24.3*)
	96.4	(93.8*)	6.0	(5.0*)
	92.5	(90.0*)	7.0	(5.0*)
	96.8	(93.0*)	3.2	(14.0*)
Steigman	86.0	(76.0*)	10.0	(88.5*)
	97.5	(93.8*)	8.0	(97.5*)
	96.7	(92.6*)	6.0	(73.4*)

N = 2

Leyenda:

* Pureza y Filtrado tras recalentamiento

Todavía se discute sobre el tamaño óptimo de las nanopartículas [14] para linfografía, el consenso refiere que deben poseer tamaños inferiores a 100 nm, de modo que fluyan a través del árbol linfático.

La formulación original de Steigman [5] utilizaba 3,0 mL de tiosulfato de sodio (Sln. A), dado que entre los factores que modifican el tamaño del nanocoloide está la masa de tiosulfato utilizada, se disminuyó esta para favorecer la formación de partículas de menor diámetro.

En la Figura 1 se reflejaron los resultados alcanzados para diferentes volúmenes de la Solución A y de la Solución C.

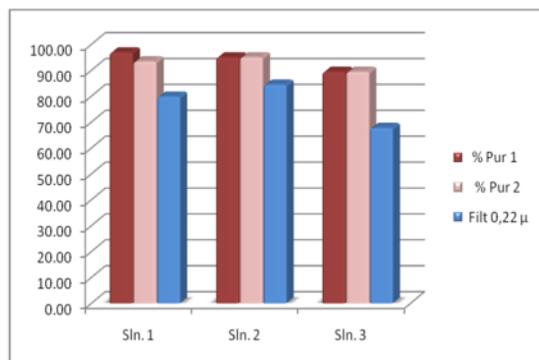


Fig. 1. Evaluación de volúmenes de las soluciones A y C.

Sln	Sln A (mL)	Sln B (mL)	Sln C (mL)	NaOH (mL)
1	0.90	0.75	1.00	0.8
2	1.20	0.75	1.00	0.8
3	0.90	0.75	2.00	0.8

N = 2

La disminución del volumen de tiosulfato de 3,0 mL [5] a volúmenes cercanos a 1,0 mL, tuvo una moderada influencia negativa en los resultados de la pureza radioquímica, tanto para el radiofármaco inicial como para el modificado. Sin embargo, la fracción de partículas con diámetros inferiores a 220 nm fue relativamente elevada y se encontró alrededor de 77.0 % como promedio.

El incremento del protector disminuyó ligeramente las purezas de los radiofármacos, esto se debe a que un componente de la Sln. C es el EDTA, con poder de acomplejar algún ^{99m}Tc -reducido originado en la reacción [6]. El complejo ^{99m}Tc -EDTA corre con el frente del solvente y se cuantifica como impureza radioquímica cuando se utiliza NaCl 0,9 % como solvente.

Se obtuvo un resultado diferente al reportado [6], ya que encontramos disminución de las partículas de menor tamaño molecular con el incremento de volumen del protector.

La solución C incluía EDTA, gelatina y fosfato, el efecto de estos componentes sobre la formación del nanocoloide es complejo de analizar, ya que además influyen la fuerza iónica del medio y el volumen total, por lo que el análisis de este hallazgo requiere de experimentos adicionales, a fin de precisar cuál de los componentes del medio o la combinación de estos pudiera ejercer un efecto como el encontrado en los resultados.

En la Figura 2 se mostró la influencia del volumen de ácido clorhídrico. En la práctica se produjo una disminución ligera de la pureza radioquímica inicial (Pur1) y del radiofármaco modificado (Pur2), paralelamente se encontró elevación de la fracción de partículas de menor tamaño molecular, como reportó Krosgaard (6).

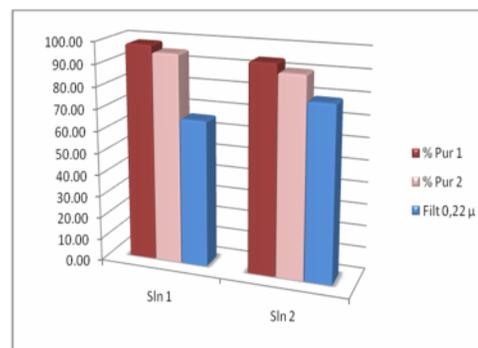


Fig. 2. Influencia del volumen de ácido en el radiofármaco.

Sln	Sln A (mL)	Sln B (mL)	Sln C (mL)	NaOH (mL)
1	1.0	0.75	1.0	0.80
2	1.0	0.78	1.0	0.90

N = 2

El aumento en la acidez del medio pudiera elevar la fracción de ^{99m}Tc -reducido [6], el cual acomplejado por el EDTA, generó más impurezas radioquímicas, las que por su tamaño molecular filtraron por la membrana, explicando en parte el incremento observado en la fracción que se recuperó tras la filtración.

En la Figura 3 se reflejaron dos series de experimentos, modificando el volumen final del NaOH. En ésta se observó una pureza radioquímica (Pur1) inicial igual o superior al 90.0 %. Sin embargo, para la serie que incluyó un volumen mayor de hidróxido, tras el calentamiento, dicha pureza (Pur2) cayó por debajo del 80 %. La filtración (Fil.) a través de membranas de 0,22 μ produjo resultados ligeramente inferiores a 80 %. En estas series se incluyeron filtros comerciales con diámetro de poro de 0,1 μ y se encontró que el 78 % de las partículas poseían diámetros inferiores a 100 nm.

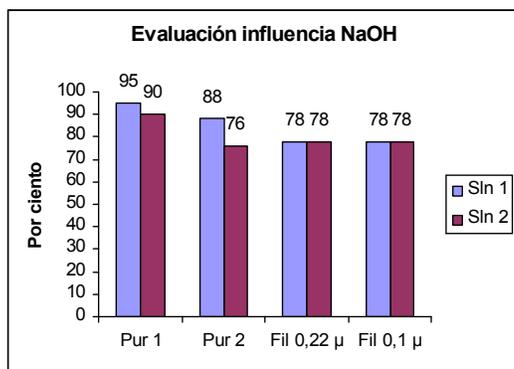


Fig. 3. Evaluación influencia del NaOH según Steigman.

Sln	Sln A (mL)	Sln B (mL)	Sln C (mL)	NaOH (mL)
1	1.0	0.78	1.0	0.80
2	1.0	0.78	1.0	0.90

N=2

Acorde a los resultados obtenidos se desarrolló la formulación final utilizando 1,0 mL de la Solución A, 0,78 mL de la Solución B y 1,0 mL de Solución C, como volúmenes para la preparación del ^{99m}Tc -nanocoloide-sulfuro.

De la primera de estas series (Sln 1) se realizaron microfotografías electrónicas. En las figuras 4 y 5, se muestran partículas coloidales comprendidas entre 20-100 nm y la forma geométrica de mayor abundancia fue la circular.

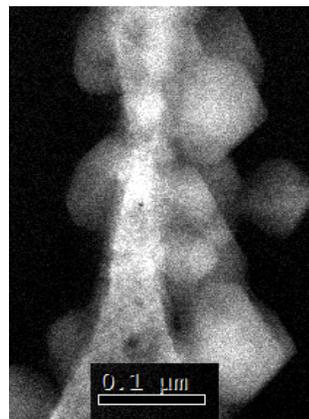


Fig. 4. Microfotografía electrónica de ^{99m}Tc -Nanocoloide de Azufre

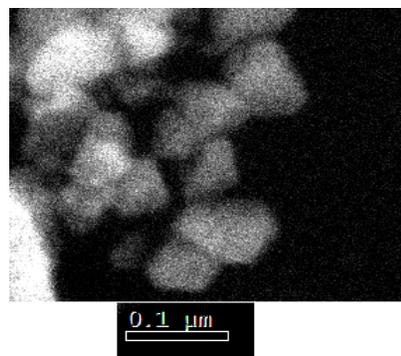


Fig. 5. Microfotografía electrónica de ^{99m}Tc -Nanocoloide de Azufre

Las microfotografías confirmaron los hallazgos de la filtración, pues una proporción elevada de partículas fueron inferiores a 100 nm.

Los certificados del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos expresaron la conformidad de las soluciones enviadas, con relación a esterilidad y apirogenicidad, por lo cual respondieron a la cualidad de inyectables endovenosos.

Como se muestra en la Tabla 2 para los lotes desarrollados, se encontró una estabilidad de 3 meses para el radiofármaco obtenido, elemento que garantiza la ausencia de cambios en su comportamiento y por ende el rango para su aplicación segura.

Tabla 2. Estabilidad de los Lotes producidos

Lote	% de Pureza Radioquímica			
	30 d	60d	90d	120d
1	92,3	93,0	91,8	90,8
2	93,3	92,8	92,0	91,7
3	91,9	92,3	91,8	88,2
4	93,5	93,0	92,5	72,1
	% filtrado por 0,22µ			
1	85,0	84,1	86,0	83,0
2	83,0	82,5	82,0	87,3
3	84,6	83,8	81,9	89,0
4	85,4	84,8	82,1	91,0

N = 2

Hoy día se evalúan los factores que influyen en la calidad radiofarmacéutica de los nanocoloides de ^{99m}Tc , así Bensimhon y cols [15] demostraron para el ^{99m}Tc -Sulfuro de Antimonio que el aumento de temperatura de la reacción a 130 °C mejoraba la pureza radioquímica y la calidad de las imágenes obtenidas.

Jiménez y cols. [16] demostraron que el volumen final de pertecnetato en la preparación puede influir o no en el tamaño final de las partículas coloidales, efecto dependiente de la naturaleza del nanocoloide.

Con excepción del nanocoloide de albúmina que se marca con ^{99m}Tc en un paso [8], la mayoría de las formulaciones comerciales se producen a partir de diferentes reactivos y en procedimientos de varios pasos [4-6], los costos de estas formulaciones oscilan entre \$50.00-\$60.00 USD por frasco. Por ello resulta necesario el desarrollo de formulaciones propias, que permitan poseer una independencia del mercado exterior y reducir los costos en la realización de los estudios imagenológicos en nuestro país.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un nanocoloide de sulfuro de ^{99m}Tc , cuya pureza radioquímica es superior a 90.0 %. Las

partículas coloidales poseen un tamaño molecular de 20-100 nm y su forma es aproximadamente esférica.

El control microbiológico demostró que se dispone de un radiofármaco calidad inyectable endovenoso y para los lotes desarrollados se encontró una estabilidad de 3 meses, la cual depende del pH final.

REFERENCIAS

- [1] Sage H., and Gozun B, (1958) "Lymphatic scintigrams: a method for studying the functional pattern of lymphatics and lymph nodes". *Cancer (Phil)*, 11, pp. 200-203.
- [2] Recke S. N, (1999). "Recent advances in bone marrow scanning". *Eur J Nucl Med*; 18, pp. 203-221.
- [3] Wilson B. J., (1966) "*The Radiochemical Manual*", Second Edition, London, The Radiochemical Centre, Amersham, pp. 190-191.
- [4] Tsopelas C. (2001). "Particle Size Analysis of ^{99m}Tc -Labeled and Unlabeled Antimony Trisulfide and Rhenium Sulfide Colloids Intended for Lymphoscintigraphic Applications". *J Nucl Med* ; 42, pp. 460-66.
- [5] Steigman J, Solomon N A and Hwang L L-Y, (1986). Technetium-Sulfur Colloid. *Appl. Rad Isot.*; 37, pp. 223-29.
- [6] Krogsgaard O. W, (1976). "Technetium-99m-Sulfur Colloid. In vitro Studies of Various Commercial Kits". *Eur J Nucl Med* , 1, pp. 31-36.
- [7] Rosenthal S. N. and Bardfeld A, (1985). "Evaluation of Radiocolloids as Thrombus Imaging Agents. Effect of Particle Size on Thrombus Uptake". *Nucl Med Biol*; 12, pp 375-380.
- [8] Mc Afee J G, Subramanian G, Aburano T, (1982). "A New Formulation of Tc-99m Minimicroaggregated Albumin for Marrow Imaging: Comparison with

- Other Colloids, In-111 and Fe-59” *J Nucl Med*; 23, pp. 21-28.
- [9] Henze E, Schelbert H R, Collin J D, (1982) “Lymphoscintigraphy with Tc-99m labeled dextrans”. *J Nucl Med*; 23, pp. 923-29.
- [10] Wingardh K and Strand S-Erik (1989). “Evaluation in vitro and in vivo of two labelling techniques of different 99mTc-dextrans for lymphoscintigraphy”. *Eur J Nucl Med*; 15, pp. 146-151.
- [11] Yang K-T A, Jong S-B, Wu C C, Chen G Y (1989). “Quality control of 99mTc-labeled dextran for lymphoscintigraphy”. *Eur J Nucl Med* 15, pp. 171-73.
- [12] Hoh C K, Wallace A M and Vera D R (2003). “Preclinical Studies of 99mTc-DTPA-Mannosyl-Dextran”. *Nucl Med Biol* 30, pp. 457-64.
- [13] Pagano da Silva C., de Pereira N. S (1999). “Manual de Controles de Calidad de Radiofármacos”. ARCAL XV. Producción y Control de Calidad de Radiofármacos. IPEN. Sao Paulo. Brasil, pp. 31.
- [14] Mirzaei S., Knoll P., Hoffmann B., Kreuzer W and Kohn H (2001). “Optimized Mammary Lymphoscintigraphy Using Larger Colloid Particles”. *J Nucl Med* 42, pp. 5826-5834.
- [15] Bensimhon L, Métyayé T, Guilhot J, Perdrisot R (2008). “Influence of temperature on the radiochemical purity of 99mTc-colloidal rhenium sulphide for use in sentinel node localization”. *Nucl Med Commun* 11, pp. 1015-20.
- [16] Jiménez I R, Roca M, Vega E, García M L, Benítez A, Bajén M, Martín-Comin J. (2008) “Particle sizes of colloids to be used in sentinel lymph node radiolocalization”. *Nucl Med Commun* 29, pp. 166-172.