

Utilização da Cromatografia em Camada Delgada para Determinação da Pureza Radioquímica de Radiofármacos em Serviços de Medicina Nuclear da Paraíba e Rio Grande do Norte, Brasil

Use of Thin Layer Chromatography for the Determination of Radiochemical Purity of Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Services of Paraíba and Rio Grande do Norte, Brazil

W. G Andrade^{1,2}; P. A. L. Santos^{1,2}; F. R. A. Lima^{1,2}; F. F. Lima²

¹Programa de Pós Graduação em Tecnologia Energética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

²Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, 50740-540, Recife-Pe, Brasil

wellington.gandrade@gmail.com

A cromatografia de papel e a cromatografia de camada delgada são técnicas de separação nas quais os componentes do radiofármaco migram em função de sua afinidade com o eluente (fase móvel) ou com a fase estacionária, respectivamente. Nos radiofármacos marcados com o ^{99m}Tc, além do próprio radiofármaco, podem ser identificados e quantificados o ^{99m}TcO₄⁻ livre e o TcO₂. A avaliação da pureza radioquímica dos radiofármacos é essencial para produzir imagens livres de artefatos, bem como evitar uma dose absorvida desnecessária ao paciente. Uma vez que os mesmos são administrados em humanos é importante e necessário que os mesmos passem por rigoroso controle de qualidade. Devido a esse fato, a ANVISA em sua Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 38 de 04/06/2008 declara a obrigatoriedade da realização de um mínimo de testes na rotina dos serviços de medicina nuclear antes da administração humana. Este trabalho avaliou por meio do método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) a pureza radioquímica, determinou o pH dos radiofármacos DEXTRAN-500, DMSA, DTPA, FITATO, MDP, MIBI e Sn-Col utilizados em serviços de medicina nuclear do estado da Paraíba e do Rio Grande do Norte - Brasil. Os resultados demonstram que a utilização do método de cromatografia em camada delgada (CCD) como padrão na rotina de serviços de medicina nuclear é possível, pois fornece dados importantes para a avaliação da pureza radioquímica, possibilitando a exclusão de um radiofármaco mau marcado.

Palavras-chave: Cromatografia em Camada Delgada; Compostos Radiofarmacêuticos; Medicina Nuclear

The paper chromatography and the thin layer chromatography are separation techniques in which the radioactive components migrate because of their affinity with the eluent (mobile phase) or stationary phase, respectively. In radiopharmaceuticals labeled with ^{99m}Tc, besides its own radiopharmaceutical, ^{99m}TcO₄⁻ free and TcO₂ can be identified and quantified. The evaluation of radiochemical purity of radiopharmaceuticals is essential to produce images free of artifacts as well as avoid unnecessary absorbed dose to the patient. Once they are managed in humans it is important and necessary that they undergo to strict quality control. Because of this, ANVISA in its "Resolução da Diretoria Colegiada" (RDC) 38 of June 4th, 2008 states the obligation of performing a minimum of tests in nuclear medicine services routine prior to human administration. This work evaluated, by the method of thin layer chromatography (TLC), radiochemical purity, determined the pH of the radiopharmaceutical DEXTRAN-500, DMSA, DTPA, PHYTATE, MDP, MIBI and Sn-Col used in nuclear medicine services in the states of Paraíba and Rio Grande do Norte - Brazil. The results show that the use of thin layer chromatography (TLC) as a standard method in routine of nuclear medicine services is possible, because it provides important data for the evaluation of radiochemical purity, allowing the exclusion of a radiopharmaceutical poorly marked.

Keywords: Thin Layer Chromatography; Radiopharmaceuticals; Nuclear Medicine

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é um método físico-químico de separação, cuja fundamentação é dada pela migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação [1].

Existem várias técnicas cromatográficas, desde as mais simples, como cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD), até as mais sofisticadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que exigem aparelhagem complexa. Entre os métodos de análises as técnicas cromatográficas ocupam um lugar de destaque na química e bioquímica devido à eficiência e facilidade na separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo que constituída de misturas complexas [1, 2].

As impurezas radioquímicas surgem a partir da decomposição devido à ação de mudança de temperatura, pH, luz, presença de oxidantes ou agentes redutores, reação incompleta e radiólise. Para a avaliação das impurezas que podem estar presentes no radiofármaco marcado, o método CCD, por ser uma técnica de baixo custo e de fácil manuseio, é aplicado rotineiramente em radiofarmácias de medicina nuclear para a verificação do grau de pureza radioquímico e da eficiência de marcação [3].

Nos radiofármacos marcados com o ^{99m}Tc , além do próprio complexo fármaco-radionuclídeo, podem ser identificados e quantificados o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ -livre e o $^{99m}\text{TcO}_2$. A avaliação da pureza radioquímica dos radiofármacos é essencial para produzir imagens livres de artefatos, bem como evitar uma dose absorvida desnecessária ao paciente [4].

Uma vez que os radiofármacos são administrados em humanos é importante e necessário que os mesmos passem por rigoroso controle de qualidade. Devido a esse fato, a ANVISA em sua Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 38 de 04/06/2008 declara a obrigatoriedade da realização de um mínimo de testes na rotina dos serviços de medicina nuclear antes da administração humana [5].

Sendo assim, este trabalho avaliou a pureza radioquímica por meio do método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), bem como determinou o pH de radiofármacos utilizados em serviços de medicina nuclear dos Estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado durante um período de 2 (duas) semanas em cada serviço de medicina nuclear, num total de 3 (três) SMN participantes, sendo 1 (um) situado no estado da Paraíba, e 2 (dois) no estado do Rio Grande do Norte.

No total de 23 amostras de radiofármacos analisados, foram estudadas 1 (uma) amostra de DEXTRAN-500, 1 (uma) amostra de DMSA, 2 (duas) amostras de DTPA, 2 (duas) amostras de FITATO, 1 (uma) amostra de Sn-Coloidal, 8 (oito) amostras de MDP e 8 (oito) amostras de MIBI. No caso desse último, eram de dois diferentes fabricantes.

Esses radiofármacos foram avaliados quanto a sua pureza radioquímica e pH como determina as farmacopeias [6, 7] e RDC 38/2008 [5].

2.1. DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA

A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia de camada delgada, como indicada por fabricantes, farmacopeias e literatura [6, 7]. Na fase estacionária, foram empregadas placa cromatográfica de sílica gel (60F) sobre folha de alumínio (thin-layer chromatography silica gel – TLC-SG (Al)) (Merck®) e papel cromatográfico 3MM (Whatman®), ambos em dimensões 1cm x 10cm. Como fase móvel, foram empregados os solventes Acetona, Metanol e Cloreto de Sódio conforme descritos em bula pelos fabricantes.

Vale ressaltar que, um dos fabricantes do MIBI não apresentava em bula nem o sistema a ser utilizado para teste de pureza radioquímica, nem os valores que devem ser esperados após o

referido teste. Diante disso, o teste das amostras provenientes desse fabricante foi realizado seguindo as especificações do outro fabricante.

Os sistemas empregados de acordo com os radiofármacos estão descritos na Tabela 1.

Foram utilizadas 6 (seis) tiras cromatográficas para cada radiofármaco. Cada tira foi marcada previamente com as dimensões a serem empregadas durante o teste. Determinado o ponto inicial nas tiras (ponto de aplicação), adicionou-se uma gota a cada fita como mostrado na Figura 1.

Em seguida, as tiras cromatográficas foram posicionadas em recipientes fechados de forma que não tocassem nas paredes dos mesmos. Após a corrida cromatográfica, as tiras foram cortadas a cada centímetro e as atividades foram determinadas pelos activímetros de cada serviço.

Tabela 1: Sistemas indicados nas bulas dos fabricantes para realização do Teste de Pureza radioquímica dos radiofármacos avaliados.

Radiofármacos	Fase estacionária	Fase móvel
DEXTRAN-500- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Acetona*
	-	-
DMSA- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Acetona*
	TLC-SG	NaCl 0.9%**
DTPA- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Acetona*
	Whatman 3MM	NaCl 0.9%**
FITATO- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Metanol 85%*
	-	-
MDP- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Acetona*
	Whatman 3MM	NaCl 0.9%**
MIBI- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Metanol*
	Whatman 3MM	NaCl 0.9%**
SN-Col- ^{99m} Tc	Whatman 3MM	Acetona*
	-	-

* Correspondente a fita 1

** Correspondente a fita 2

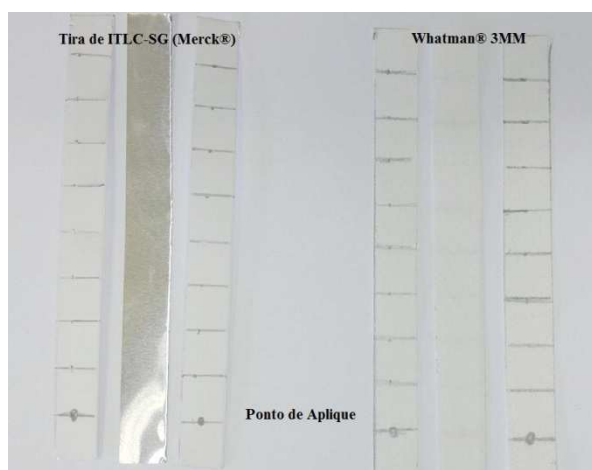


Figura 1: Tira de TLC-SG (Merck®) e Whatman® 3MM com marcações.

Para a determinação da pureza radioquímica, o valor foi calculado por meio da equação Eq. 1.

$$\%PRQ = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \%^{99}\text{TcO}_2) \quad (1)$$

Os valores da pureza radioquímica obtidos foram comparados com os valores de referência fornecidos pelos fabricantes nas bulas dos radiofármacos (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de referência do Percentual de Pureza Radioquímica e pH indicados nas bulas dos fabricantes dos radiofármacos avaliados.

Radiofármacos	Fabricantes	
DEXTRAN-500- ^{99m} Tc	pH	3,0 – 5,0
	%PRQ	≥ 90%
DMSA- ^{99m} Tc	pH	2,0 – 4,0
	%PRQ	≥ 90%
DTPA- ^{99m} Tc	pH	3,5 – 4,5
	%PRQ	≥ 90%
FITATO- ^{99m} Tc	pH	5,0 – 7,0
	%PRQ	≥ 90%
MDP- ^{99m} Tc	pH	5,5 – 7,0
	%PRQ	≥ 90%
MIBI- ^{99m} Tc	pH	5,0 – 6,0
	%PRQ	≥ 90%
Sn-Coloidal- ^{99m} Tc	pH	4,0 – 6,0
	%PRQ	≥ 90%

2.2. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Para a determinação do pH foi utilizado o papel universal de pH (Merck®), como mostrado na Figura 2. O radiofármaco foi gotejado por sobre a fita de pH e a leitura foi realizada após 1 minuto, tempo mínimo recomendado pelo fabricante da fita. A coloração obtida foi comparada à escala fornecida pelo fabricante do papel indicador de pH.



Figura 2: Papel indicador de pH (Merck®), com a escala de cores para comparação.

Os valores de pH aceitáveis de acordo com os fabricantes dos radiofármacos estão dispostos na Tabela 2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA

Observa-se na Tabela 3 que apenas três amostras do total apresentaram não conformidade com relação aos valores do percentual de pureza radioquímica como descrito em farmacopeias internacionais e fabricantes.

Tabela 3: Valores da Avaliação da Pureza Radioquímica indicada nas bulas dos fabricantes dos radiofármacos estudados.

RADIOFÁRMACOS	PARAÍBA		RIO GRANDE DO NORTE	
	%PRQ* < 90%	%PRQ ≥ 90%	%PRQ < 90%	%PRQ ≥ 90%
DEXTRAN-500	0	1	-	-
DMSA	-	-	1	0
DTPA	0	2	-	-
FITATO	-	-	0	2
MDP	0	4	0	4
MIBI	1	2	1	4
SN-COLOIDAL	0	1	-	-

* %PRQ = Percentual de Pureza Radioquímica

Observa-se que uma das amostras do MIBI no SMN do Estado da Paraíba não apresentou um percentual de pureza radioquímica de acordo com o esperado ($\geq 90\%$). Isso pode ter ocorrido pela falta de informações em bula para a execução do teste, tendo sido adotadas as especificações do outro fabricante. Da mesma forma, na bula do referido fabricante, também não há indicação da atividade máxima que deva ser utilizada na marcação, como ocorre nos fármacos provenientes de outros fabricantes. Assim sendo, também há a possibilidade da atividade de marcação ter ultrapassado a adequada, ocasionando uma diminuição na eficiência de marcação do produto. Isto é facilmente explicado considerando-se a estequiometria da reação de oxirredução que é de três íons de Sn^{2+} para cada íon de Tc^{7+} . O excesso de íons Sn^{2+} na situação de concentração máxima é menor que o seu excesso quando da concentração mínima para marcações, ou seja, pode ocorrer falta de íons Sn^{2+} para a redução [8].

Uma série de outros fatores, como efeito de diluição, temperatura, origem da solução fisiológica, falha no processo de marcação de vido a erro humano podem levar a marcações inadequadas [4].

Outros fármacos, porém, como o DEXTRAN-500, FITATO e Sn-Coloidal apresentam uma metodologia diferenciada, ou seja, utilizam apenas uma única fita para a realização da pureza radioquímica. E como descrito em bula, o composto marcado, deve-se apresentar no ponto o qual é aplicado, sendo observado neste estudo.

Para cada fármaco em estudo o tempo de execução não ultrapassou 10 minutos, evidenciando, assim, a empregabilidade em uso rotineiro nos serviços de medicina nuclear.

Além de rápido, os controles de qualidade também se apresentam com baixo custo. Faria et al observaram que o custo final para o controle de qualidade dos radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, e que foram avaliados neste estudo, pode ser absorvido no custo da maioria dos exames de medicina nuclear, uma vez que os valores diários variaram entre R\$ 6,44 e R\$ 7,80 por controle, considerando as condições mais extremas de custos [9].

3.2. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Os resultados das avaliações de pH das amostras de radiofármacos marcados com eluato de gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresentaram valores coerentes com os descritos pelos fabricantes e farmacopéias [5, 6, 7].

O pH é um fator importante para a estabilidade de um radiofármaco, o qual deve ter uma concentração de íons hidrogênio adequado para a sua estabilidade e integridade. O pH ideal de um radiofármaco deve ser 7,4 (pH do sangue), embora possa variar entre dois e nove por causa

da alta capacidade tampão do sangue. Qualquer desvio do pH desejado deve ser tratado com cautela e deve ser remediado [3].

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o uso do método CCD para avaliação rotineira da pureza radioquímica é importante para identificar, corrigir e evitar eventuais problemas provenientes da administração de radiofármacos fora dos padrões de qualidade sugeridos por normas internacionais e fabricantes. Esse teste utilizando o referido método pode ser realizado em um tempo adequado a ser inserido nas rotinas dos serviços de medicina nuclear. Os custos para realização dos mesmos são baixos quando comparados à remarcação de um exame.

Programas de controle de qualidade de radiofármacos em serviços de medicina nuclear são viáveis e necessários para o cumprimento da RDC nº 38 da ANVISA.

-
1. DEGANI, ALG, CASS, QB, VIEIRA, PC, “Cromatografia um breve ensaio”, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 7, pp. 21-25 (1998).
 2. SCOTT, RPW, “Principles and Practice of Chromatography” Chrom-Ed Book Series, vol 1, Library for Science, <http://www.library4science.com/> acessado em 29/07/2011 (2003).
 3. SAHA, G.; “Fundamental of Nuclear Pharmacy”, Springer, 6ª Ed., New York, pp.80-87 (2010).
 4. MARQUES, FLN, OKAMOTO, MRY, BUCHEPIGUEL, CA, “Alguns aspectos sobre geradores e Radiofármacos de Tecnécio-99m e seus Controles de Qualidade.”, *Rev. Radiol. Bras.*, vol 4, n. 34, pp. 233-239 (2001)
 5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Resolução de Diretoria Colegiada nº 38 de 04 de junho de 2008”.
 6. United States Pharmacopeia (USP-34) National Formulary (NF-27), <http://www.uspbpep.com/> acessado em 29/04/2011
 7. European Pharmacopeia 6 (EP), <http://www.uspbpep.com/> acessado em 29/04/2011
 8. HUNG, J.C., HEROLD, T.J., GIBBONS, R.J., Optimal conditions of ^{99m}Tc eluate for the radiolabeling of ^{99m}Tc -sestamibi. *Nucl. Med. Biol.*, v. 23, p. 599–603, 1996.
 9. FARIA, D.P., MARQUES, F.L.N., YAMADA, A.S., MIQUELIN, C.A., Avaliação dos custos para realização de controles de qualidade de radiofármacos marcados com $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio em serviços de medicina nuclear no Brasil, *Rev. Radiol. Bras.*, pp. 47-51 (2011).