

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS CLAE E CCD NA DETERMINAÇÃO DE PUREZA RADIOQUÍMICA DE SAH-^{99m}Tc

Almeida, E.V.; Ramos, M.P.S.; Fukumori, N.T.O.; de Barboza, M.F.; Mengatti, J.;
Silva, C.P.G.; Matsuda, M.M.N.; Vasconcellos, M.B.A.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP
Diretoria de Radiofarmácia – DIRF
Av. Professor Lineu Prestes 2242, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: erikavieira@usp.br

RESUMO: SAH-^{99m}Tc é um radiofármaco utilizado no estudo de volemia. O objetivo deste trabalho foi comparar a pureza radioquímica (PRq) de SAH-^{99m}Tc determinada por CLAE e CCD, 30 e 240 minutos após a marcação. A concentração radioativa de SAH-^{99m}Tc foi 55 MBq mL⁻¹. Para CLAE a fase móvel utilizada foi constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl e NaN₃. Os ensaios de CCD foram realizados utilizando-se sílica-gel com suporte de fibra de vidro e fase móvel constituída de metanol: água (85:15, v/v). A PRq de SAH-^{99m}Tc por CLAE foi (98,14 ± 0,20)% e (97,92 ± 0,14)%, 30 e 240 minutos após a marcação, respectivamente. Para o método CCD a PRq determinada após 30 e 240 minutos de marcação foi (99,95 ± 0,02)% e (99,34 ± 0,11)%, respectivamente. Os métodos podem ser usados para determinar PRq de SAH-^{99m}Tc.

PALAVRAS-CHAVES: SAH-^{99m}Tc, CLAE, CCD

INTRODUÇÃO: Soro albumina humano (SAH) é a proteína de maior abundância no plasma humano. A concentração no sangue varia de 35-45 g L⁻¹. É uma proteína sintetizada e secretada pelo fígado, com peso molecular entre 66 e 69 kDa. SAH exerce duas funções importantes: uma de manutenção da pressão oncótica e a outra, na capacidade de fixar e transportar ligantes retirando produtos tóxicos do organismo (QUINLAN et. al., 2005). SAH marcada com tecnécio-99 meta-estável (SAH-^{99m}Tc) é um radiofármaco utilizado como agente para verificação de alterações na circulação linfática (estudos de volemia), diagnóstico de linfoedemas primários e secundários, além de aplicação clínica para testes das funções cardíacas. SAH é comercialmente disponível na forma de reagente liofilizado (RL) e sua preparação clínica é feita pela adição de pertecnetato (^{99m}TcO₄⁻), na qual ^{99m}Tc é reduzido e posteriormente ligado à proteína (CHUANG, 2002). SAH-^{99m}Tc é administrado intravenosamente e sua preparação exige alta pureza radioquímica (PRq) (> 90%) (USP, 2009). Quantidades significantes de impurezas podem comprometer a qualidade da imagem e conseqüentemente o diagnóstico (VERBEKE et. al., 1996). Vários métodos cromatográficos são indicados para determinar a pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VERBEKE et. al., 1996) e cromatografia em camada delgada (CCD) (OWUNWANNE et. al., 1995) são os métodos analíticos

mais utilizados. O objetivo deste trabalho foi comparar a pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc determinada pelo método CLAE e CCD, 30 e 240 minutos após a reconstituição do RL com ^{99m}Tc.

MATERIAL E MÉTODOS: Reagente liofilizado (RL) de SAH e eluído do gerador de ^{99m}Tc foram obtidos do IPEN-CNEN/SP (Brasil). O RL foi reconstituído pela adição de 1 mL de eluído de gerador contendo 55 MBq de Na^{99m}TcO₄. Para as análises por CLAE foi utilizado cromatógrafo líquido modelo LC 20AT Prominence (Shimadzu) composto por duas bombas, auto injetor (SIL 20A), forno de coluna (CTO 20A), sistema de controle (CBM 20A), detector PDA (SPD M20A) e detector de radioatividade (Bioscan). A separação foi realizada utilizando-se coluna de exclusão molecular Protein-Pack 300SW (300 mm x 7,5 mm d.i., 10 µm). 100 µL de amostra foram injetados em fase móvel constituída por Na₂HPO₄ 0,30 mol L⁻¹, KH₂PO₄ 0,08 mol L⁻¹, NaCl 0,20 mol L⁻¹ e NaN₃ 0,30 mol L⁻¹ nas proporções de 4:1:1:0,1, (m/m) (pH 7,50). As amostras foram eluídas isocriticamente em fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O tempo de cada corrida foi de 20 minutos. Os ensaios de CCD foram realizados utilizando-se sílica-gel com suporte de fibra de vidro, ITLC-SG (Pall Life Sciences). 5 µL de SAH-^{99m}Tc foram aplicados na origem da fita e esta foi colocada verticalmente em uma cuba de vidro contendo a fase móvel constituída de metanol: água (85:15, v/v). O fator de retardamento (R_f) da impureza ^{99m}TcO₄⁻ foi R_f=1,0 enquanto para o SAH-^{99m}Tc e ^{99m}TcO₂ foi R_f=0,0. A concentração radioativa foi medida em câmara de ionização da marca Capintec, modelo CRC-35R. Após a separação cromatográfica, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm. Contador Gama marca Perkin Elmer, modelo Cobra-D-5002 foi utilizado para a contagem de atividade (contagem por minuto, cpm) nas fitas de CCD. Todas as soluções foram analisadas em triplicata. Todos os reagentes foram adquiridos da Merck (Alemanha). A água foi purificada em sistema Milli-RX 45 Millipore (França).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: A Fig. 1 apresenta o cromatograma obtido por CLAE do radiofármaco SAH-^{99m}Tc.

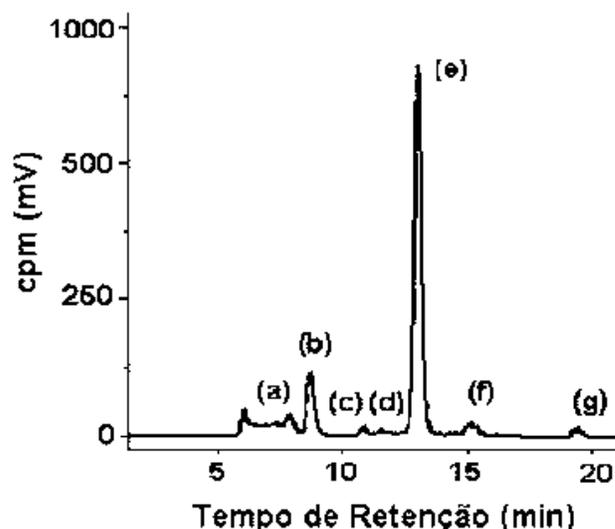


Figura 1- Cromatograma de SAH-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condições experimentais: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra: 100 μL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Na Fig. 1, o analito representado por (a) corresponde aos compostos de massa molecular alta, superiores ao dímero de SAH-^{99m}Tc, representado por (b). Os componentes de alta massa molecular podem representar globulinas contaminantes de albumina ou os polímeros de albumina (VALLABHAJOSULA et. al., 1989). Os analitos (c) e (d) representam agregados de massa molecular intermediária entre o dímero e o monômero de SAH-^{99m}Tc (e). Estanho coloidal (Sn-^{99m}Tc) (pico (f)) foi identificado pela injeção do RL de Sn e comparação com o tempo de retenção. O composto (g) foi confirmado pela adição de substância de referência como sendo a impureza pertecnetato (^{99m}TcO₄⁻).

Os valores de pureza radioquímica (RPq) determinados pelos métodos CLAE e CCD, 30 e 240 minutos após a marcação do RL de SAH com ^{99m}Tc estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- %Pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc determinadas por CLAE e CCD

Tempo após marcação (Minutos)	CLAE *(PRq ± DP)%	CCD *(PRq ± DP)%
30	98,14 ± 0,20	99,95 ± 0,02
240	97,02 ± 0,14	99,34 ± 0,11

*PRq: pureza radioquímica; DP: desvio padrão

A PRq de SAH-^{99m}Tc pelo método CLAE foi (98,14 ± 0,20)% e (97,92 ± 0,14)%, 30 e 240 minutos após a marcação, respectivamente. Para o método CCD a PRq determinada após 30 e 240 minutos de marcação foi (99,95 ± 0,02)% e (99,34 ± 0,11)%, respectivamente (Tabela 1). A diferença da PRq determinada pelos métodos foi 1,81%. Esta diferença pode ser explicada pela capacidade do método CLAE em determinar as formas poliméricas que estão sendo marcadas,

juntamente com o produto principal Assim, a PRq determinada por CLAE é referente apenas ao monômero marcado com ^{99m}Tc . O método CCD exclui a porcentagem de impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$, e o resultado de pureza radioquímica corresponde à soma de SAH- ^{99m}Tc e outras formas poliméricas marcadas.

CONCLUSÕES: A identidade de algumas impurezas radioquímicas de SAH- ^{99m}Tc foi identificada por dois métodos. CLAE identificou monômero, formas poliméricas, estanho coloidal e pertecnetato. CCD separou a impureza pertecnetato que foi eluído pelo solvente, enquanto o produto SAH- ^{99m}Tc e outras impurezas permaneceram na origem. CLAE e CCD são importantes técnicas para determinação de pureza radioquímica de radiofármacos de SAH- ^{99m}Tc . Ambos métodos apresentaram PRq maior que 97% e podem ser utilizados no controle de qualidade de centros produtores e distribuidores de SAH- ^{99m}Tc .

AGRADECIMENTOS: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida à E.V. Almeida e a DIRF pela infra-estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CHUANG, V. "Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin", *Pharmaceut. Res.*, 19 (5), pp.569-577, 2002.

OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. **The handbook of radiopharmaceuticals**. Ed. Chapman & Hallmedical: London, 1995.

QUINLAN, G.J.; MARTIN, G.S.; EVANS, T.W. "Albumin biochemical properties and therapeutic potencial". *Hepatology*, 41, pp.1211-1219, 2005.

[USP] United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeia Convention, 1, 2009.

VALLABHAJOSULA, S.; ZIMMERMAN, R.E.; PICARD, M. "Technetium-99m-ECD: a new brain imaging agent: in vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects". *J. Nucl. Med.*, 30, pp.599- 604, 1989.

VERBEKE, K.; VERBRUGGEN, A. "Usefulness of fast protein liquid chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography of ^{99m}Tc -labelled human serum albumin preparations". *J. Pharm. and Biom. Anal.*, 14, pp.1209-1213, 1996.