

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES - 
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m EMPREGANDO CROMATOLOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

ÉRIKA VIEIRA DE ALMEIDA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda**

**SÃO PAULO
2009**

DEDICATÓRIA

A minha mãezinha Maria (em memória) que me ensinou deste cedo: "estudar é importante!". Que lutou arduamente para eu chegar até aqui. Hoje, a lembrança da tua presença soa suave na minha memória, num murmúrio triste de lamento e de muitas saudades.

As minhas irmãs, Erolândia e Erilânia, com quem dividi uma infância difícil, porém maravilhosa. Aprendemos a lutar e buscar melhores condições de vida.

A minha sempre amiga Ruth Simões que patrocinou meus sonhos e acreditou fielmente na minha vitória. Pelo afago e apoio nas horas mais difíceis e indesejáveis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelo oferecimento do curso de pós-graduação e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela infra-estrutura.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Ao MSc. Jair Mengatti pela colaboração para a concretização deste trabalho.

À Dra. Constacia Pagano Gonçalves da Silva pela oportunidade concedida e por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda pela orientação, dedicação e por partilhar comigo seus conhecimentos, ensinando-me a enfrentar as situações com bom humor e perseverança. Por sua amizade e confiança.

À MSc. Neuza Taeko Okasaki Fukumori pelas discussões valiosas e por ter acreditado, desde o início, na conclusão deste trabalho.

A todos da Diretoria de Radiofarmácia pela amizade e pelo convívio agradável.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Érika Vieira de Almeida

RESUMO

Radiofármacos são compostos, sem ação farmacológica, que têm na sua composição um radioisótopo e são utilizados em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de várias doenças. No presente trabalho, foi feito o desenvolvimento e a validação de método analítico para análise dos radiofármacos SAH-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc, ECD-^{99m}Tc e Sestamibi-^{99m}Tc e algumas matérias-primas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em equipamento CLAE Shimadzu, modelo LC-20AT Prominence. Algumas impurezas foram identificadas pela adição de substância de referência. A validação do método foi realizada segundo os critérios da norma RE nº 899/ 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Os resultados dos ensaios de robustez dos métodos demonstraram que são necessários o controle das condições de fluxo, volume de amostra, pH da fase móvel e temperatura do forno. As curvas analíticas foram lineares nas faixas de concentrações analisadas, com coeficientes de correlações lineares (r^2) maiores que 0,9995. Os resultados de precisão, exatidão e recuperação apresentaram valores na faixa de 0,07- 4,78%, 95,38- 106,50% e 94,40- 100,95%, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) variaram de 0,27 a 5,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,90 a 19,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os valores encontrados para SAH, EC, ECD e MIBI nos RL (reagente liofilizado) foram 8,95; 0,485; 0,986 e 0,974 mg L^{-1} , respectivamente. A pureza radioquímica média para SAH-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc, ECD-^{99m}Tc e Sestamibi-^{99m}Tc foi $(97,28 \pm 0,09)\%$, $(98,96 \pm 0,03)\%$, $(98,96 \pm 0,03)\%$ e $(98,07 \pm 0,01)\%$, respectivamente. Todos os parâmetros recomendados pela ANVISA foram avaliados e os resultados estão abaixo dos limites estabelecidos.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR TECHNETIUM-99m RADIOPHARMACEUTICALS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Érika Vieira de Almeida

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are compounds, with no pharmacological action, which have a radioisotope in their composition and are used in Nuclear Medicine for diagnosis and therapy of several diseases. In this work, the development and validation of an analytical method for ^{99m}Tc -HSA, ^{99m}Tc -EC, ^{99m}Tc -ECD and ^{99m}Tc -Sestamibi radiopharmaceuticals and for some raw materials were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). The analyses were performed in a Shimadzu HPLC equipment, LC-20AT Prominence model. Some impurities were identified by the addition of a reference standard substance. Validation of the method was carried out according to the criteria defined in RE n. 899/2003 of the National Sanitary Agency (ANVISA). The results for robustness of the method showed that it is necessary to control flow rate conditions, sample volume, pH of the mobile phase and temperature of the oven. The analytical curves were linear in the concentration ranges, with linear correlation coefficients (r^2) above 0.9995. The results for precision, accuracy and recovery showed values in the range of 0.07-4.78%, 95.38-106.50% and 94.40-100.95%, respectively. The detection limits (DL) and quantification limits (QL) varied from 0.27 to 5.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.90 to 19.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The values for HAS, EC, ECD and MIBI in the lyophilized reagents (LR) were 8.95; 0.485; 0.986 and 0.974 mg L^{-1} , respectively. The mean radiochemical purity for ^{99m}Tc -HSA, ^{99m}Tc -EC, ^{99m}Tc -ECD and ^{99m}Tc -Sestamibi was $(97.28 \pm 0.09)\%$, $(98.96 \pm 0.03)\%$, $(98.96 \pm 0.03)\%$ and $(98.07 \pm 0.01)\%$, respectively. All the parameters recommended by ANVISA were evaluated and the results are below the established limits.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Radiofármacos	4
3.2 Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	5
3.3 Radiofármacos de tecnécio-99m	7
3.3.1 Soro Albumina Humano- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (SAH- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	9
3.3.2 L,L-Etilenodicitseína- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (EC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	10
3.3.3 L,L- Etilenodicitseínato de dietila- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	12
3.3.4 Hexaquis 2-metoxi-isobutil-isonitrila- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	14
3.4 Controle de qualidade dos radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	15
3.4.1 Controle de qualidade físico e físico-químico	16
3.4.2 Controle de qualidade químico e radioquímico	17
3.4.3 Controle de qualidade biológico	17
3.5 Métodos analíticos de controle de qualidade de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	18
3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	19
3.5.1.1 Modos de separação	22
3.5.1.1.1 Cromatografia de exclusão molecular	23
3.5.1.1.2 Cromatografia no modo normal	24
3.5.1.1.3 Cromatografia no modo reverso	24
3.5.1.1.4 Cromatografia de par iônico	25
3.5.1.2 Eluição isocrática e por gradiente	26
3.5.2 Cromatografia planar	27
3.6 Validação de métodos analíticos	28
3.6.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos	30
3.6.1.1 Robustez	30
3.6.1.2 Seletividade	30
3.6.1.3 Linearidade	31
3.6.1.4 Precisão	32
3.6.1.5 Exatidão	33

3.6.1.6	Recuperação	34
3.6.1.7	Limite de Detecção (LD)	35
3.6.1.8	Limite de Quantificação (LQ)	36
3.7	Estabilidade	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Materiais	38
4.1.1	Reagentes e solventes	38
4.1.2	Equipamentos	40
4.1.2.1	Sistema CLAE	41
4.2	Métodos	41
4.2.1	Marcação dos Reagentes Liofilizados	41
4.2.2	Validação do método analítico por CLAE	42
4.2.3	Análise de pureza radioquímica por CCD	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Otimização das condições de análise por CLAE para SAH e SAH-^{99m}Tc	48
5.2	Validação do método analítico para SAH e SAH-^{99m}Tc	59
5.2.1	Cromatogramas	59
5.2.2	Parâmetros de validação	65
5.3	Otimização das condições de análise por CLAE para EC e EC ^{99m}Tc ..	70
5.3	Validação do método analítico para EC e EC-^{99m}Tc	85
5.4.1	Cromatogramas	85
5.4.2	Parâmetros de validação	90
5.5	Otimização das condições de análise por CLAE para ECD e ECD-^{99m}Tc	95
5.6	Validação do método analítico para ECD e ECD-^{99m}Tc	106
5.6.1	Cromatogramas	106
5.6.2	Parâmetros de validação	112
5.7	Validação do método analítico para MIBI e Sestamibi-^{99m}Tc	115
5.7.1	Cromatogramas	116
5.7.2	Parâmetros de validação	121
6	CONCLUSÕES	125
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.	6
FIGURA 2 - Diagrama do decaimento do ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$.	6
FIGURA 3 - Esquema das reações para obtenção dos radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	8
FIGURA 4 - Estrutura quaternária do SAH com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque.	9
FIGURA 5 - Esquema simplificado das etapas de síntese do EC. (I) ácido L-tiazolidino-4-carboxílico, (II) EC.	11
FIGURA 6 - Estrutura de L,L-EC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.	11
FIGURA 7 - Estrutura molecular de L,L- ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.	13
FIGURA 8 - (A) Estrutura molecular do MIBI e (B) Estrutura molecular do Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	14
FIGURA 9 – Esquema simplificado de um sistema cromatográfico para CLAE.	20
FIGURA 10 - Cromatografia de exclusão molecular. (A) Aplicação da amostra. (B) Interação da amostra com os poros da fase estacionária. (C) Separação das moléculas da amostra de acordo a massa molecular.	23
FIGURA 11 – Princípio da cromatografia de par de íons. O pareador iônico adicionado à fase móvel se liga à fase estacionária apolar. Os grupos sulfonatos negativos ficam expostos na fase estacionária e interagem com os íons da amostra.	25
FIGURA 12 - Princípio da cromatografia planar. (A) aplicação da amostra; (B) inserção da placa em uma cuba com a fase móvel e (C) separação dos analitos.	27
FIGURA 13 - Fluxograma das fases envolvidas no processo de validação de um método analítico.	29
FIGURA 14 - Fluxograma das fases de marcação dos RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$.	42
FIGURA 15 - Cromatogramas de SAH 10 mg mL^{-1} com a variação de fluxo da fase móvel. (A) Fluxos $0,4$; $0,6$ e $0,8\text{ mL min}^{-1}$. (B) Fluxos $1,0$; $1,2$ e $1,5\text{ mL min}^{-1}$. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW ($300 \times 7,5\text{ mm}$; $10\text{ }\mu\text{m}$), modo isocrático e fase móvel constituída de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 : H_2O ($50:50$, v/v). Volume de amostra: $20\text{ }\mu\text{L}$, pH da fase móvel: $7,50$ e temperatura do forno de coluna: $25\text{ }^\circ\text{C}$.	49

FIGURA 16- Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorbância (280 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de SAH. Condição A: 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). Volume de amostra: 20 µL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **50**

FIGURA 17- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação de volume de amostra. Condição A: 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: 0,6 mL min⁻¹, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **51**

FIGURA 18- Efeito do volume de amostra **(A)** na absorbância (280 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de SAH. Condição A: 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: 0,6 mL min⁻¹, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **52**

FIGURA 19- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação de pH da fase móvel. **(A)** pH: 2,00; 2,50 e 4,00. **(B)** pH 6,00; 7,50; e 9,00. Condição A: 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 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **54**

FIGURA 20- Efeito do pH da fase móvel na absorbância (280 nm) de SAH. Condição A: 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 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **55**

FIGURA 21- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação da temperatura do forno de coluna. **(A)** Temperaturas 25, 30 e 40 °C. **(B)** Temperaturas 50, 60 e 80 °C. **(C)** Efeito da temperatura do forno de coluna na absorbância (280 nm) de SAH. Condição A: 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 e pH da fase móvel: 7,50. **56**

FIGURA 22- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação do comprimento da coluna. Condição A: 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). Condição B: coluna TSKgel G3000SW (600 x 7,5 mm; 10 µm), fase móvel da condição A. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra: 100 µL e pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **58**

- FIGURA 23- (A)** Cromatograma de SAH 10 mg mL⁻¹. **(B)** Cromatograma de RL de SAH. Condição A: 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. **60**
- FIGURA 24-** Espectros de UV-Visível de SAH 10 mg mL⁻¹ e RL de SAH. Absorção em 280 nm. Condição A: 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. **61**
- FIGURA 25-** Cromatograma de SAH-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Identificação dos analitos na TAB. 8. Condição A: 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. **63**
- FIGURA 26-** Curvas analíticas de SAH na faixa de concentração 0- 20 mg mL⁻¹ (λ= 280 nm). **65**
- FIGURA 27-** Cromatogramas de EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição C: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,05 mol L⁻¹, pH 2,50): C₂H₅OH, (80:20 v/v). Fluxo de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C. **71**
- FIGURA 28-** Cromatogramas de EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição D: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: PIC B5 0,2%: C₂H₅OH, (80:20, v/v). Fluxo de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C. **71**
- FIGURA 29-** Cromatogramas do EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição E: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel PIC A 0,2%: C₂H₅OH, (80:20, v/v). Fluxo de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C. **73**
- FIGURA 30- (A)** Cromatogramas do EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. **(B)** Ampliação do intervalo de 15 – 20 minutos. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição F: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: PIC A 0,2%: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C. **74**

- FIGURA 31-** Cromatogramas do EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹, pH 2,50): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 10 μL; temperatura do forno de coluna: 25 °C. **75**
- FIGURA 32-** Cromatogramas de EC 500 μg mL⁻¹ com a variação de fluxo da fase móvel. **(A)** Fluxos 0,4; 0,6 e 0,8 mL min⁻¹. **(B)** Fluxos 1,0; 1,2 e 1,5 mL min⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μL; pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **77**
- FIGURA 33-** Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorbância (265 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μL; pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **78**
- FIGURA 34-** **(A)** Cromatogramas de EC 500 μg mL⁻¹ com a variação do volume de amostra. **(B)** Ampliação do intervalo 8,5- 10,0 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **79**
- FIGURA 35-** Efeito do volume de amostra **(A)** na absorbância (265 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **80**
- FIGURA 36-** Cromatogramas de EC 500 μg mL⁻¹ com a variação de pH da fase móvel. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **81**
- FIGURA 37-** Efeito do pH da fase móvel **(A)** no tempo de retenção de EC e **(B)** na absorbância (265 nm). Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **82**
- FIGURA 38-** **(A)** Cromatogramas de EC 500 μg mL⁻¹ com a variação da temperatura do forno de coluna. **(B)** Ampliação do intervalo 8,0- 9,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL e pH da fase móvel: 2,50. **84**

- FIGURA 39-** Efeito da temperatura do forno na absorbância (265 nm) de EC. **84**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL e pH da fase móvel: 2,50.
- FIGURA 40- (A)** Cromatograma de EC 500 µg mL⁻¹. **(B)** Cromatograma de RL de EC. **86**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.
- FIGURA 41-** Espectros de UV-Visível de EC 500 µg mL⁻¹ e de RL de EC no intervalo de 200 a 400 nm. Absorção em 265 nm. **88**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.
- FIGURA 42-** Cromatograma de EC-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. **89**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.
- FIGURA 43-** Curvas analíticas de EC na faixa de concentração 0- 500 µg mL⁻¹ **91**
(λ= 265 nm).
- FIGURA 44-** Cromatogramas de ECD-^{99m}Tc, ECD-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻ e ECD-^{99m}Tc adicionado de EC-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. **96**
Condição F: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: PIC A 0,2%: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.
- FIGURA 45-** Cromatogramas de ECD-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc e ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. **97**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.
- FIGURA 46-** Cromatogramas de ECD 500 µg mL⁻¹. Volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25°C. **98**
Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

- FIGURA 47-** Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorvância (215 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μ L; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **99**
- FIGURA 48-** **(A)** Cromatogramas de ECD 500 μ g mL⁻¹. **(B)** Ampliação do intervalo 13,00- 14,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **100**
- FIGURA 49-** Efeito do volume de amostra **(A)** na absorvância (215 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μ L; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **101**
- FIGURA 50-** **(A)** Cromatogramas de ECD 500 μ g mL⁻¹ com a variação do pH da fase móvel. **(B)** Ampliação do intervalo 12- 15 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **102**
- FIGURA 51-** Efeito do pH da fase móvel **(A)** no tempo de retenção e **(B)** na absorvância (215 nm) de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **103**
- FIGURA 52-** **(A)** Cromatogramas de ECD 500 μ g mL⁻¹ com a variação da temperatura do forno de coluna. **(B)** Ampliação do intervalo de 13- 14,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L e pH da fase móvel: 2,50. **105**
- FIGURA 53-** Efeito da temperatura do forno na absorvância (215 nm) de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L e pH da fase móvel: 2,50. **105**
- FIGURA 54-** **(A)** Cromatograma de ECD 500 μ g mL⁻¹. **(B)** Cromatograma de RL de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C. **107**

- FIGURA 55-** Espectros de UV-Visível de ECD $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e RL de ECD. Absorção em 215 nm. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 108
- FIGURA 56- (A)** Cromatograma de ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. **(B)** Ampliação do intervalo de 0-12 minutos. Concentração radioativa: $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 109
- FIGURA 57-** Cromatogramas de ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, EC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ e de compostos resultantes da hidrólise básica de ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Concentração radioativa: $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 110
- FIGURA 58-** Curvas analíticas para ECD na faixa de concentração de 0- 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 112
- FIGURA 59- (A)** Cromatograma de MIBI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. **(B)** Cromatograma de RL de MIBI. **(C)** Ampliação do intervalo 1,3 e 2,3 minutos da FIG. 59B. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: CH_3CN : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 25 μL ; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 117
- FIGURA 60-** Espectros de UV-Visível de MIBI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e RL de MIBI $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Absorção em 245 nm. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: CH_3CN : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 25 μL ; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 118
- FIGURA 61- (A)** Cromatograma de Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Concentração radioativa: $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$. **(B)** Ampliação do intervalo 1 e 4 minutos da FIG 61A. Identificação das espécies na TAB. 25. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: CH_3CN : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 25 μL ; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$. 119
- FIGURA 62-** Curvas analíticas de MIBI na faixa de concentração de 0- 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 121

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Fatores importantes para a preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc	8
TABELA 2- Composição dos RL produzidos na DIRF	40
TABELA 3- Condições alteradas no desenvolvimento dos métodos	43
TABELA 4- Colunas e fases móveis utilizadas no desenvolvimento dos métodos	44
TABELA 5- Parâmetros para controle radioquímico em RL marcados com ^{99m}Tc	47
TABELA 6- Parâmetros otimizados para análise de SAH e SAH- ^{99m}Tc	59
TABELA 7- Tempos de retenção dos analitos nos cromatogramas de SAH	61
TABELA 8- Identificação dos analitos observados no cromatograma de SAH- ^{99m}Tc	63
TABELA 9- Parâmetros das curvas analíticas para o SAH	66
TABELA 10- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 1	66
TABELA 11- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 2	67
TABELA 12- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 3	67
TABELA 13- Precisão (DPR) e exatidão interdia de SAH	68
TABELA 14- % Recuperação em amostras de RL de SAH	69
TABELA 15- % Pureza radioquímica de SAH- ^{99m}Tc determinadas nos estudos de estabilidade	69
TABELA 16 – Condições de análise para EC, RL de EC e EC- ^{99m}Tc	85
TABELA 17- Identificação dos analitos nos cromatogramas de EC e RL de EC	87
TABELA 18- Identificação dos analitos no cromatograma de EC- ^{99m}Tc	89
TABELA 19- % Pureza radioquímica de EC- ^{99m}Tc obtida por CLAE e CCD	90
TABELA 20- Parâmetros das curvas analíticas de EC	91
TABELA 21– Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 1	92
TABELA 22 – Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 2	92
TABELA 23 – Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 3	93

TABELA 24 – Precisão e exatidão interdia de EC referência	93
TABELA 25 - % Recuperação em amostras de RL de EC	94
TABELA 26 - % Pureza radioquímica de EC- ^{99m} Tc determinadas nos estudos de estabilidade, determinada por CLAE e CCD	95
TABELA 27 – Condições de análise para ECD, RL de ECD e ECD- ^{99m} Tc	106
TABELA 28 - Identificação dos analitos no cromatograma de ECD	108
TABELA 29 - Identificação dos analitos no cromatograma de ECD- ^{99m} Tc	111
TABELA 30 - Parâmetros das curvas analíticas de ECD	112
TABELA 31 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 1	113
TABELA 32 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 2	113
TABELA 33 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 3	113
TABELA 34 – Precisão (DPR) e exatidão interdia de ECD	114
TABELA 35 - % Recuperação em amostras de RL de ECD	114
TABELA 36 - Pureza radioquímica de ECD- ^{99m} Tc determinadas nos estudos de estabilidade	115
TABELA 37 - Condições de análise para MIBI, RL de MIBI e Sestamibi- ^{99m} Tc	116
TABELA 38 - Identificação das espécies no cromatograma de Sestamibi- ^{99m} Tc	119
TABELA 39 – %Pureza radioquímica de Sestamibi- ^{99m} Tc determinada pelos métodos CLAE, CP e CCD	120
TABELA 40 - Parâmetros das curvas analíticas de MIBI	122
TABELA 41 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 1	122
TABELA 42 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 2	122
TABELA 43 – Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 3	123
TABELA 44 – Precisão (DPR) e exatidão interdia de MIBI referência	123
TABELA 45 -% Pureza radioquímica do Sestamibi- ^{99m} Tc nos estudos de estabilidade	124

LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

- BPF** - Boas Práticas de Fabricação
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CP** - Cromatografia em Papel
- CCD** - Cromatografia em Camada Delgada
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DIRF** - Diretoria de Radiofarmácia
- IPEN** - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- CNEN** – Comissão Nacional de Energia Nuclear
- SAH** - Soro Albumina Humano
- EC** - Etilenodicitostina
- ECD** - Etilenodicitostinato de dietila
- Sestamibi** - hexaquis-2-metoxi-isobutil-isonitrila
- Da** - Dalton
- RL** - reagente liofilizado
- MIBI** - metoxi-isobutil-isonitrila
- PRq** - Pureza Radioquímica
- Bq** - Bequerel
- Ci** - Currie
- USP** – United States Pharmacopeia
- LAL** - Lisado de Amebócitos de Limulus
- FPLC** - Fast Protein Liquid Chromatography
- PIC** – Pareador Iônico para Cromatografia
- INMETRO** - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC** - International Union of Pure and Applied Chemistry
- ISO** - International Standard Organization
- ICH** - International Conference Harmonization
- FDA** - Food and Drug Administration
- HPLC** - High Pressure Liquid Chromatography
- ITLC-SG** - Instant Thin Layer Chromatography – Silica Gel
- POP** - Procedimento Operacional Padrão
- DAD** – Diode Array Detector

1 INTRODUÇÃO

Os radiofármacos de tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc) tornaram-se importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano. Aproximadamente 80% de todos os radiofármacos usados em medicina nuclear são compostos marcados com ^{99m}Tc (1).

Previamente à utilização dos radiofármacos na rotina das clínicas dos serviços de medicina nuclear, deve-se assegurar a qualidade do produto final a ser administrado. O controle de qualidade dos centros produtores de radiofármacos é responsável por realizar uma série de ensaios (físico-químicos, biológico e microbiológico), que indicarão a qualidade do produto final (2).

Para garantir que os produtos farmacêuticos tenham e mantenham as características de estrutura, identidade, pureza, concentração, potência e inocuidade requeridas para o seu uso existe um conjunto de normas e atividades relacionadas entre si denominado Boas Práticas de Fabricação (BPF) (3).

A capacidade de fornecer dados confiáveis, exatos e em tempo programado, é um dos papéis centrais dos laboratórios analíticos. A qualidade dos resultados analíticos é um fator chave do desenvolvimento de novos produtos. A implementação, o desenvolvimento e principalmente a validação de metodologias analíticas têm um impacto direto na qualidade destes produtos. Embora uma completa validação pode não ser suficiente para garantir a inexistência de quaisquer problemas potenciais que envolvam a qualidade de produtos, o processo de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas deve ao menos garantir o controle de problemas mais comuns inerentes à metodologia utilizada (4, 5).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta através da Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação dos métodos analíticos e bioanalíticos (4). A validação é definida como o

estabelecimento de evidências experimentais documentadas que fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um produto que atenderá às características e especificações de qualidade (5).

Na determinação de pureza radioquímica dos radiofármacos, várias são as publicações em que a cromatografia em papel (CP) (6, 7) e cromatografia em camada delgada (CCD) (8-10) são utilizadas. Entretanto, grande parte destes trabalhos não realiza a quantificação da porcentagem de produto e das impurezas normalmente formadas no processo de marcação do reagente liofilizado (RL) com pertecnetato (pertecnetato livre, tecnécio coloidal, formas poliméricas) simultaneamente (11). Na década de 90, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi introduzida, tornando-se uma técnica indispensável no controle de qualidade dos radiofármacos (12).

Para garantir a qualidade de radiofármacos produzidos na Diretoria de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (DIRF, IPEN-CNEN-SP), a saber, soro albumina humano-^{99m}Tc (SAH-^{99m}Tc), etilenodícisteína (EC-^{99m}Tc), Etilenodícisteinato de dietila-^{99m}Tc (ECD-^{99m}Tc) e hexaquis-2-metoxi-isobutilisonitrila-^{99m}Tc (Sestamibi-^{99m}Tc), faz-se necessário o desenvolvimento e a validação dos métodos que atendam às especificações do órgão regulador - ANVISA (4).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar métodos utilizando a técnica analítica CLAE, para os radiofármacos de ^{99m}Tc produzidos na DIRF, a saber: SAH- ^{99m}Tc , EC- ^{99m}Tc , ECD- ^{99m}Tc e Sestamibi- ^{99m}Tc , incluindo algumas matérias-primas.

Os parâmetros analíticos avaliados foram aqueles exigidos pela RE nº 899 (ANVISA): robustez, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radiofármacos

A Radiofarmácia existe desde a primeira administração de uma preparação radioativa em um organismo vivo, com o objetivo de verificar os efeitos e a trajetória metabólica. Este fato (1932) antecedeu a Segunda Guerra Mundial, quando os radioisótopos artificiais disponíveis eram produzidos através do bombardeamento de núcleos-alvo por partículas positivas aceleradas. Entretanto, foi o programa Átomos para a Paz, lançado pelo Governo americano, após 1945, visando ao aproveitamento da produção de radioisótopos oriundos do reator de urânio, que tornou possível ao mundo o uso dos radiofármacos (13).

Radiofármacos são compostos, sem ação farmacológica, que têm na sua composição um radioisótopo e são utilizados em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de várias doenças. As características físico-químicas do radiofármaco determinam a sua farmacocinética, isto é, a fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo, enquanto que as características físicas determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia (14). Um radiofármaco deve ser de baixo custo e facilmente acessível aos centros de Medicina Nuclear.

Os produtos radiofarmacêuticos são compostos por substâncias orgânicas, inorgânicas, peptídeos, proteínas, anticorpos monoclonais e oligonuclídeos marcados com radioisótopos. Os radiofármacos podem ser classificados em moléculas simples contendo um radioisótopo, por exemplo, Na^{131}I , moléculas mais complexas marcadas, geradores de radioisótopos que fornecem os radioisótopos que originam os fármacos, como os geradores de molibdênio/tecnécio ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), reagentes liofilizados (RL) para diagnóstico ou macromoléculas marcadas (12, 15).

Os radiofármacos que se destinam ao diagnóstico clínico apresentam na sua composição um radioisótopo emissor gama (γ) e/ ou pósitrons ($_{+1}\beta$). Nesta

situação, é desejável que o radioisótopo incorporado ao radiofármaco não emita partículas alfa (${}^4_2\alpha$) ou beta (${}_{-1}\beta$), uma vez que estas apenas aumentam a dose de radiação absorvida pelo paciente (16).

Para diagnóstico, os radiofármacos são classificados em perfusão ou específicos. Os radiofármacos de perfusão (Sestamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$ e ECD- ${}^{99m}\text{Tc}$) são transportados no sangue e atingem o órgão alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não possuem locais específicos de ligação e acredita-se que são distribuídos de acordo com o tamanho e a carga do composto. Os radiofármacos específicos (MIBG- ${}^{123}\text{I}$ [metaiodobenzilguanidina]) são direcionados por moléculas biologicamente ativas, a saber: anticorpos e peptídeos, que se ligam a receptores celulares ou são transportados para o interior de determinadas células (14).

Para terapia, a meia-vida física é um parâmetro essencial na escolha de radioisótopos e são indicados aqueles que emitem partículas ionizantes (partículas ${}^4_2\alpha$, ${}_{-1}\beta$, ou elétrons Auger). A escolha do radioisótopo a ser utilizado é dependente do tamanho do tumor, da distribuição intratumoral e da farmacocinética do radiofármaco (14).

3.2 Gerador de ${}^{99}\text{Mo}/{}^{99m}\text{Tc}$

O elemento químico com número atômico 43 foi descoberto por Carlo Perrier e Emílio Segré, cientistas italianos, em 1937. Bombardeando molibdênio com nêutrons, obtiveram alguns isótopos do elemento 43, que foi nomeado de tecnécio (do grego technétos, “artificial”). Foi o primeiro elemento produzido artificialmente pelo homem (13).

Atualmente, o radioisótopo tecnécio-99m (${}^{99m}\text{Tc}$), produto do decaimento do molibdênio-99 (${}^{99}\text{Mo}$), é o mais amplamente usado em medicina nuclear (13).

A primeira aplicação do ${}^{99m}\text{Tc}$ como radiofármaco ocorreu na Universidade de Chicago, onde o íon pertecnetato (${}^{99m}\text{TcO}_4^-$) obtido pela eluição de um gerador de ${}^{99}\text{Mo}/{}^{99m}\text{Tc}$ foi usado para obter imagens do fígado, cérebro e tireóide.

Posteriormente, reagentes liofilizados contendo agente redutor e diferentes agentes complexantes foram desenvolvidos para obtenção de complexos de ^{99m}Tc (17).

O gerador de tecnécio (FIG. 1) é um sistema composto por uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumínio (Al_2O_3), onde é depositado o molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$), que decai a $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (1).

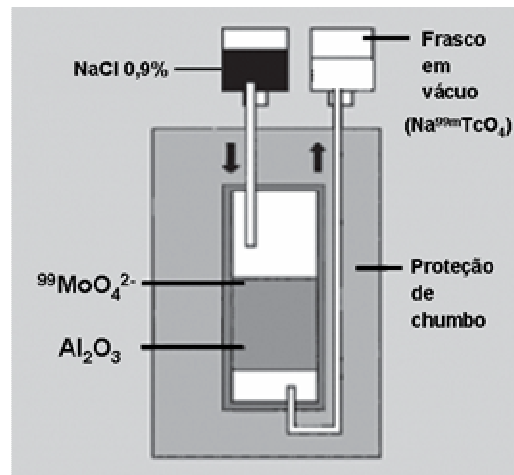


FIGURA 1 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (1).

A atividade do radioisótopo “filho” (^{99m}Tc) vai aumentando à medida que o radionuclídeo “pai” (^{99}Mo - molibdênio) vai decaindo, atingindo o máximo depois de 24 horas. O ^{99}Mo , na forma química de MoO_4^{2-} , é depositado e adsorvido na coluna de alumina e por eluição com soro fisiológico (NaCl 0,9%), apenas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é eluído e recolhido em um frasco sob vácuo, enquanto o molibdato fica retido na coluna. A FIG. 2 apresenta o diagrama de decaimento do ^{99}Mo a ^{99m}Tc (1).

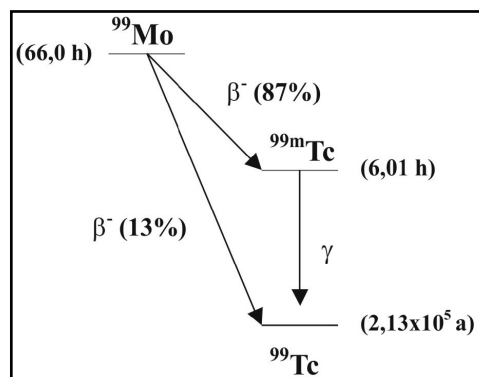


FIGURA 2 - Diagrama do decaimento do ^{99}Mo a ^{99m}Tc (1).

O ^{99}Mo com meia-vida física ($t_{1/2}$) de 66 horas decai por emissão de partículas beta em $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} \approx 6$ horas) e ^{99}Tc ($t_{1/2} \approx 200.000$ anos). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ decai por emissão de radiação gama em ^{99}Tc (FIG. 2) (1).

O gerador possui uma proteção de chumbo para minimizar a exposição do trabalhador à radiação, o procedimento de eluição é simples e rápido de realizar e deve produzir eluídos isentos do radioisótopo “pai” ou de outros possíveis contaminantes, e também do material que constitui a coluna (1).

3.3 Radiofármacos de tecnécio-99m

Os radiofármacos de tecnécio-99 meta estável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) tornaram-se importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano. Aproximadamente 80% de todos os radiofármacos usados em Medicina Nuclear são compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1).

O elevado índice de utilização dos radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é resultado das propriedades físicas e químicas apresentadas pelo radioisótopo, a saber: meia-vida física de 6,01 horas; decaimento por emissão de radiação gama pura (fótons de 140 keV); praticidade da obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$; possibilidade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ atingir vários estados de oxidação e de coordenação, originando diferentes radiofármacos a partir da simples reconstituição de conjuntos de RL ou “kits” (1, 15).

Existem alguns fatores importantes, relacionados na TAB. 1, que devem ser considerados no processo de preparação do radiofármaco (14).

TABELA 1- Fatores importantes para a preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc (14).

Marcação	→	elevado rendimento
Estabilidade química do composto	→	ligação química entre ^{99m}Tc e o composto ao qual se coordena
Condições físico-químicas da marcação	→	podem alterar a estrutura ou propriedades biológicas dos compostos
Condições de armazenamento	→	a temperatura e a luz podem levar à degradação do composto.
Radiólise	→	pode causar a quebra da ligação química entre o radioisótopo e a molécula
Prazo de validade	→	tempo durante o qual o radiofármaco pode ser usado com segurança para o fim a que se destina.

A preparação do radiofármaco de ^{99m}Tc se inicia pela adição de uma solução estéril de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a um frasco de RL. RL é a denominação de uma formulação que contém uma substância a ser complexada e um agente redutor, normalmente cloreto estânico, e passa pelo processo de liofilização para perda de umidade e conservação. O procedimento de reconstituição e marcação do RL com solução estéril de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ envolve reações de oxi-redução e complexação e resulta na formação de um novo composto químico (FIG. 3) (1, 16).

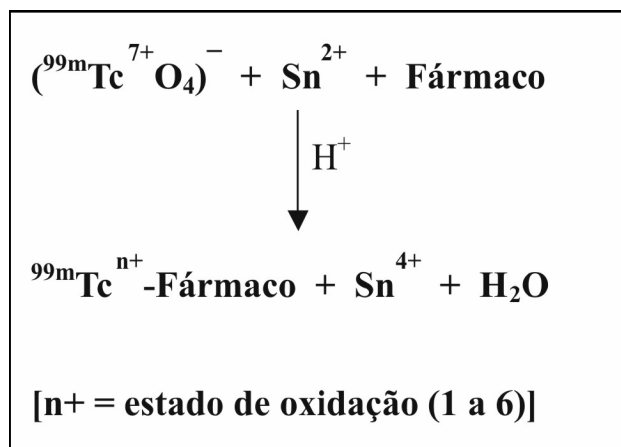


FIGURA 3 - Esquema das reações para obtenção dos radiofármacos de ^{99m}Tc (1).

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ é reduzido para um estado de oxidação menor pela ação do íon estano. No composto radiomarcado, átomos ou grupos de átomos de uma molécula são substituídos por átomos ou por grupos de átomos radioativos (14). O complexo do ligante desejado com o tecnécio é obtido após um período curto (5 - 30 minutos) com um alto rendimento (> 90%) (1, 14).

3.3.1 Soro albumina humano- ^{99m}Tc (SAH- ^{99m}Tc)

O soro albumina humano (SAH) é a proteína de maior abundância no sangue, cuja concentração varia de 35- 45 g L⁻¹, representando 60% das proteínas totais no plasma e da síntese protéica hepática (18). É uma proteína simétrica de baixa viscosidade, sintetizada e secretada pelo fígado, com peso molecular entre 66 e 69 kDa. O SAH também desempenha a função de transporte. Vários metabólicos circulam pelo sistema vascular, ligados ao SAH, como ácidos graxos livres, aminoácidos, hormônios e metais pesados (cobre e zinco), bem como muitas drogas e fármacos (19, 20).

A FIG. 4 mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de SAH, onde os resíduos de cisteína Cys34 e triptofano Trp214 aparecem representados como esferas. Dezesete pontes dissulfeto ajudam a manter a estrutura terciária (21).

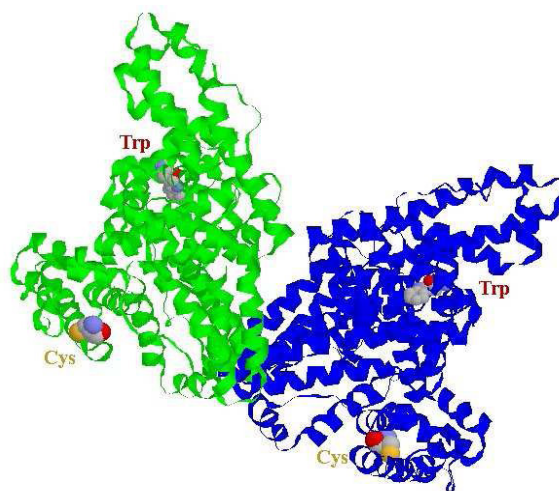


FIGURA 4- Estrutura quaternária do SAH com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque (21).

Soro albumina humano marcado com tecnécio-99m (SAH-^{99m}Tc) é um radiofármaco comumente utilizado como agente para determinação de alterações na circulação linfática, diagnóstico de linfedemas primários e secundários, além de aplicação clínica para testes das funções cardíacas (22). Ele é comercialmente disponível na forma de RL e sua preparação é feita pela adição de ^{99m}TcO₄⁻. O ^{99m}Tc heptavalente é reduzido pelo cloreto estano a ^{99m}Tc pentavalente e posteriormente ligado à proteína (16).

Após a administração intravenosa, SAH-^{99m}Tc se distribui, uniformemente através do compartimento vascular. A depuração sanguínea é lenta, em uma hora, cerca de 46% da dose administrada está na circulação. A urina e as fezes geralmente contêm menos de 0,5% da dose injetada em 24 horas. SAH-^{99m}Tc é removida da corrente sanguínea pelas células de Kupfer do sistema reticuloendotelial (23).

As possíveis impurezas radioquímicas no radiofármaco SAH-^{99m}Tc incluem ^{99m}TcO₄⁻, devido à incompleta redução durante a marcação. Tecnécio coloidal (^{99m}TcO₂) pode também ser formado quando o ^{99m}Tc reduzido não é completamente complexado com o SAH. A polimerização do SAH pode ser formada durante o processo de liofilização. Formas poliméricas podem interferir na qualidade da imagem (24).

3.3.2 L,L- Etilenodicisteína- ^{99m}Tc (EC- ^{99m}Tc)

O ácido L,L-etilenodicisteína (EC) (fórmula molecular: C₈H₁₆N₂O₄S₂; massa molecular: 268,36 g mol⁻¹) pode ser sintetizado pela redução do ácido L-tiazolidino-4-carboxílico com sódio metálico, em amônia líquida (25). Inicialmente, ocorre a abertura do anel e subsequente dimerização do radical intermediário, conforme representado na FIG. 5 (26).

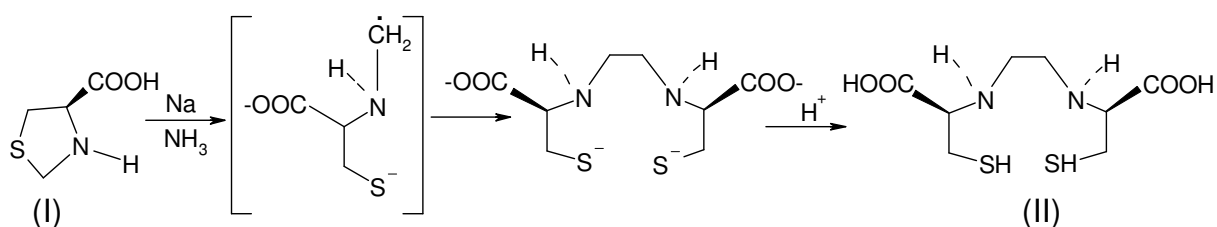


FIGURA 5- Esquema simplificado das etapas de síntese do EC. (I) ácido L-tiazolidino-4-carboxílico, (II) EC (26).

Pela adição de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) ao conjunto de RL comercialmente disponível contendo EC, em condições básicas, pode ser obtido o dímero L,L-etilenodicisteína marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na forma pentavalente [$^{99\text{m}}\text{Tc(V)EC}$]. O $\text{EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ pode ser encontrado em várias formas isoméricas, a saber: isômero L,L, isômero D,D e isômero D,L. Entre as três formas isoméricas, o isômero L,L- $\text{EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta maior potencial de utilização para obtenção de imagens cintilográficas (27).

A **FIG. 6** ilustra a estrutura do radiofármaco L,L- $\text{EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (28).

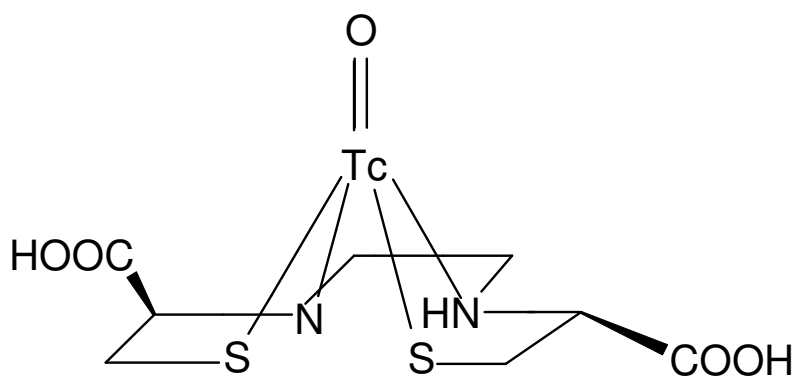


FIGURA 6- Estrutura de L,L- $\text{EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (28).

O EC-^{99m}Tc como agente funcional renal permite a avaliação de importantes funções como filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular apresentando alta especificidade para excreção e baixa retenção no organismo. O etilenodicisteína-^{99m}Tc (EC-^{99m}Tc) é também um metabólito do agente de perfusão cerebral etilenodicisteinato de dietila -^{99m}Tc (ECD-^{99m}Tc) (29).

Verbruggen e colaboradores (30) foram os primeiros a verificar que os metabólitos polares do ECD, os quais eram eliminados pelos rins, eram potenciais agentes para obtenção de imagens dos rins e poderiam ser utilizados em diagnóstico em medicina nuclear.

Posteriormente à injeção, ECD é hidrolisado a metabólitos polares [monoácido (ECM) e diácido (EC)] os quais são rapidamente secretados via sistema renal. As enzimas responsáveis pela hidrólise são encontradas no plasma, nas células sanguíneas, nos tecidos do fígado e dos rins e no cérebro. A hidrólise do ECD também pode ser realizada *in vitro* por procedimentos químicos (31- 33).

3.3.3 L,L- Etilenodicisteinato de dietila- ^{99m}Tc (ECD- ^{99m}Tc)

Radiofármacos de tecnécio-99m destinados à avaliação do fluxo sanguíneo regional cerebral devem ser lipofílicos para atravessar a barreira hematoencefálica. A permanência destes compostos no cérebro estará condicionada a mecanismos de aprisionamento que geralmente envolvem a conversão das espécies neutras e lipofílicas em espécies polares hidrofílicas (29).

ECD (etilenodicisteinato de dietila) é sintetizado pela reação de esterificação de EC, com etanol em meio de ácido clorídrico. EC é inicialmente obtido pela reação representada na FIG. 5. O ECD.2HCl é purificado por recristalização, com rendimento de cerca de 80% (16, 25). ECD.2HCl tem fórmula e massa molecular C₁₂H₂₆Cl₂N₂O₄S₂ e 397,38 g mol⁻¹, respectivamente, e apresenta duas funções ésteres que são importantes para manter a natureza lipofílica do complexo de ECD-^{99m}Tc (34).

O complexo de $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ é uma molécula que contém dois nitrogênios e dois tióis como grupos doadores (N_2S_2) dentro de uma estrutura quelante formando um complexo mono-oxo Tc(V) estável. Na FIG. 7 está apresentada a estrutura do isômero L,L – $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (35).

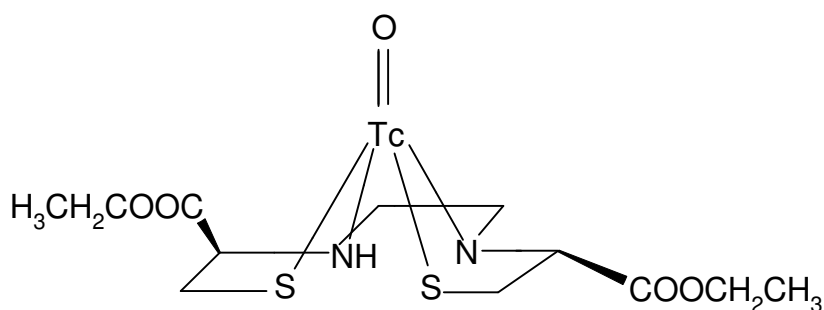


FIGURA 7 - Estrutura molecular de L,L- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (35).

O $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ é indicado para cintilografia cerebral, para obtenção de imagens de fluxo sanguíneo da região cerebral em pacientes com anomalias do sistema nervoso central, a saber: epilepsia, demência, acidentes vasculares cerebral e traumas (1).

O ligante ECD possui dois centros quirais, podendo ser obtidos os isômeros L,L- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e D,D- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$. Estudos cintilográficos realizados em macacos demonstraram que ambos os complexos atravessam a barreira hematoencefálica e oferecem imagens similares cerca de 5 minutos após a administração da dose. Imagens mais tardias, contudo, evidenciaram o clareamento total do D,D- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ do cérebro e a retenção do L,L- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (29).

Estudos em ratos mostraram que L,L- $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ é metabolizado para dois derivados monoácidos (ECM), e em menor grau, para o diácido EC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (FIG. 6) (29).

3.3.4 Hexaquis 2-metoxi-isobutil-isonitrila-^{99m}Tc (Sestamibi-^{99m}Tc)

O ligante MIBI (2-metoxi-isobutil-isonitrila) (FIG. 8A) apresenta fórmula e massa molecular C₆H₁₁NO e 113,16 g mol⁻¹, respectivamente. É um composto volátil e está presente no RL na forma de composto tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil-isonitrila) – (Cu[MIBI]₄BF₄). Durante a marcação, o MIBI se dissocia do Cu(I) ligando-se ao ^{99m}Tc (34).

O radiofármaco hexaquis-2-metoxi-isobutil-isonitrila-^{99m}Tc (Sestamibi-^{99m}Tc) é um complexo monovalente, catiônico e lipofílico que consiste de um átomo de ^{99m}Tc em estado de oxidação +1 e seis moléculas de MIBI (FIG. 8B).

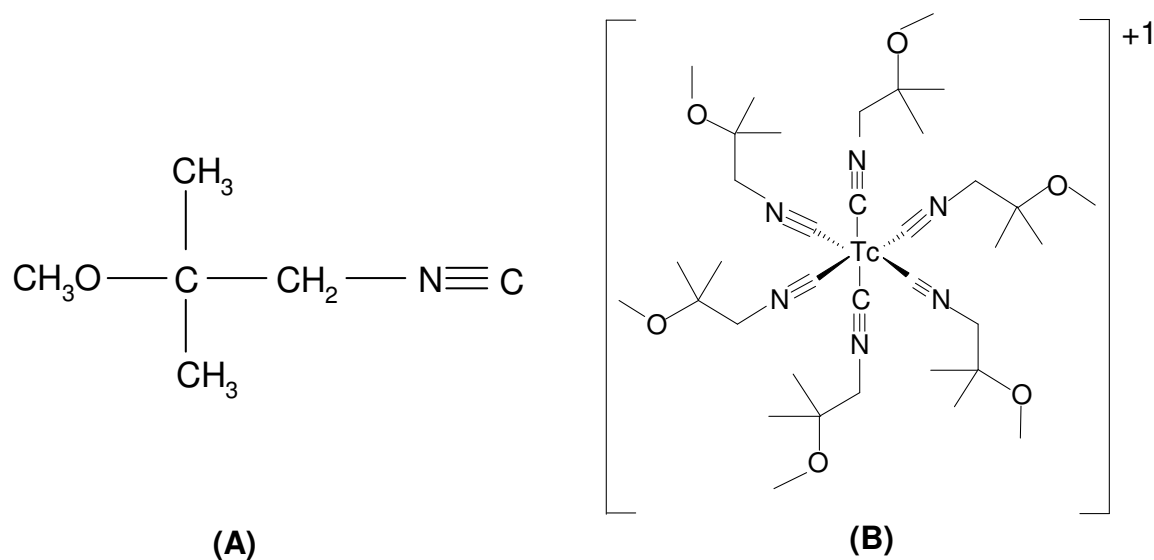


FIGURA 8- (A) Estrutura molecular do MIBI (36) e (B) Estrutura molecular do Sestamibi-^{99m}Tc (34).

É recomendado no mínimo 90% de pureza radioquímica (PRq) de Sestamibi-^{99m}Tc para uso clínico (37).

Sestamibi-^{99m}Tc é utilizado em imagem de perfusão do miocárdio, à semelhança do Tálcio-201 (²⁰¹Tl) (38). Além da aplicabilidade em estudos do miocárdio, vários pesquisadores têm observado que o Sestamibi-^{99m}Tc é sensível na detecção de tumores/lesões nas mamas de até 4 mm, na avaliação de lesões

mamárias com imagens de alta resolução para lesões maiores que 1,5 cm de tamanho e distinguir tumores mamários benignos de maligno (39). Ele se acumula no tecido tireoideano, em vários distúrbios patológicos, como linfoma primário de tireóide, nódulos tireoideanos e hiperparatireoidismo, carcinoma de células de Hürthle entre outros (40- 44). O uso do complexo Sestamibi-^{99m}Tc também tem sido descrito em estudos clínicos preliminares como agente de imagem para tumor cerebral (45).

O Sestamibi-^{99m}Tc acumula-se no interior de mitocôndrias e citoplasmas celulares. Acredita-se que a quantidade de mitocôndrias nas células tumorais e a perfusão sanguínea aumentada aliadas à permeabilidade capilar ao Sestamibi-^{99m}Tc, composto lipofílico, com carga catiônica, desempenham papel importante no mecanismo de captação tumoral do radiofármaco (38).

3.4 Controle de qualidade dos radiofármacos de ^{99m}Tc

A DIRF no IPEN é o primeiro centro brasileiro produtor e distribuidor de radiofármacos utilizados em Medicina Nuclear, para obtenção de imagens para diagnóstico ou terapia, e possui certificação da Fundação Carlos Vanzolini na Norma ISO 9001/2000. Um de seus principais objetivos é fornecer produtos de alta qualidade, preparados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

O controle de qualidade é definido como o conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e outros produtos, para o atendimento às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (46).

Todos os procedimentos de controle de qualidade que são aplicados a fármacos tradicionais são igualmente aplicáveis para os radiofármacos, além de ensaios de pureza radioquímica e radionuclídica. A diferença consiste na meia-vida física muito curta (cerca de minutos a algumas horas) que os radiofármacos muitas vezes possuem e, portanto, o tempo entre a produção, a análise pelo controle de qualidade e a administração no paciente deve ser relativamente curto (1).

Devido às particularidades na obtenção dos produtos, a determinação da pureza química é de extrema importância a fim de evitar que as impurezas não apresentem toxicidade ao organismo receptor do radiofármaco (1, 14).

As impurezas químicas podem apresentar-se como consequência de reagentes introduzidos durante a preparação, incluindo produtos de decomposição e subprodutos não-radioativos de reação. Por isso, deve-se determinar qualitativa e quantitativamente os reagentes utilizados na preparação, assim como a presença de produtos químicos (não radioativos) que não fazem parte de sua composição, especialmente possíveis contaminantes tóxicos, ou de substâncias que alteram o comportamento físico-químico ou biológico do preparado (1, 18).

Considerando-se os radiofármacos de ^{99m}Tc preparações extemporâneas, com modificação do estado de oxidação, esses devem ser analisados previamente antes de serem injetados intravenosamente no paciente (14).

O controle de qualidade dos radiofármacos envolve análise das características físicas e físico-químicas, químicas, biológicas e de estabilidade. No caso de matéria-prima e produto acabado, devem ser realizados ensaios de identificação, pureza e outros, para verificar a conformidade com os parâmetros de qualidade, sendo muitas vezes necessário separar, isolar, purificar, identificar e quantificar os componentes (18, 47).

3.4.1 Controle de qualidade físico e físico-químico

Os ensaios físico-químicos incluem as características físicas, pH, força iônica e pureza química. As características físicas envolvem análises organolépticas (cor, limpidez ou turbidez da solução e ausência ou presença de partículas, tamanho das partículas (apenas para radiofármacos coloidais)) (16). O pH do radiofármaco deve ser o mais próximo possível do pH fisiológico. O pH da preparação é normalmente medido com papel indicador. A força iônica é determinada por condutimetria (14).

3.4.2 Controle de qualidade químico e radioquímico

Em relação ao controle químico, são realizadas as determinações de pureza química, avaliando-se a concentração da espécie desejada ou de impurezas. As impurezas químicas têm origem na degradação do produto ou adição inadvertida antes, durante ou após a marcação, por exemplo, a presença de alumínio no eluído do gerador de ^{99m}Tc (16).

O controle de qualidade realiza os ensaios de pureza radionuclídica e pureza radioquímica. A presença de eventuais impurezas radionuclídicas está relacionada com o modo de produção do radioisótopo ou com uma preparação inadequada dos geradores. A presença de ^{99}Mo no eluído de ^{99m}Tc é um exemplo de impureza radionuclídica. A concentração da atividade é a atividade contida por unidade de volume, sendo expressa em MBq mL^{-1} (mCi mL^{-1}), sendo $1 \text{ mCi} = 37 \text{ MBq}$ (14, 16).

A pureza radioquímica é a fração do radioisótopo presente na forma química determinada do radiofármaco. As impurezas ocorrem devido à decomposição por ação do solvente, mudanças na temperatura, pH, luz, presença de agentes redutores, oxidantes ou radiólise da água por absorção da energia emitida, gerando a formação de peróxido de hidrogênio e radicais livres, que geram, por sua vez, a decomposição de outras moléculas marcadas (47).

As impurezas radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ podem ser encontradas em complexos marcados com ^{99m}Tc e interferir nas imagens de diagnóstico. A fim de evitar a degradação dos radiofármacos e para manter a sua estabilidade são utilizados conservantes (ácido ascórbico e manitol) (48).

3.4.3 Controle de qualidade biológico

O controle biológico inclui esterilidade, pirogenicidade, toxicidade e distribuição biológica. Esterilidade é a ausência de microorganismos viáveis na preparação. Os métodos de esterilização mais usados são a esterilização por calor

úmido e a esterilização por membrana filtrante. É requisito dos injetáveis que sejam livres de pirogênios (produtos do metabolismo das bactérias - endotoxinas). As endotoxinas são capazes de induzir hipertermia (14).

O método da Farmacopéia Americana (USP) (49) e o teste LAL são os métodos utilizados para ensaio de pirogênio. O primeiro baseia-se na resposta febril de coelhos, por administração intravenosa dos radiofármacos a serem testados. O teste LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus*) utiliza-se das proteínas obtidas através da lise de amebócitos de *limulus* (um tipo de caranguejo) que reagem com a endotoxina, formando um gel. Esta reação enzimática depende da temperatura, pH e concentração de endotoxina, com duração de 15 a 60 min, dependendo da concentração de pirogênio (48).

A toxicidade dos radiofármacos antes de sua administração em humanos deve ser determinada e a dose de segurança deve ser estabelecida (48).

A biodistribuição é utilizada para avaliação do comportamento *in vivo* de um radiofármaco, antes da sua administração a um paciente. Está relacionada à pureza radioquímica, pois impurezas radioquímicas podem induzir alterações na rota de distribuição. Essa biodistribuição pode ser efetuada por técnicas não invasivas (realização de imagens) ou técnicas invasivas, envolvendo o sacrifício de animais e medição da radioatividade concentrada nos órgãos e tecidos dissecados (16, 48).

3.5 Métodos analíticos de controle de qualidade de radiofármacos de ^{99m}Tc

As impurezas radioquímicas podem ser determinadas por diferentes métodos analíticos. A cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada são técnicas de separação nas quais os componentes do radiofármaco migram em um suporte (fase estacionária) em função da afinidade com o eluente (fase móvel) (48). A cromatografia gel (sephadex) é uma técnica que se utiliza a diferença de tamanho das moléculas na separação de componentes de uma amostra. A radioatividade é medida nas frações recolhidas, sendo expressa como um percentual da radioatividade total (2). Nos radiofármacos de ^{99m}Tc , além do próprio

radiofármaco, podem ser identificados e quantificados $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre e $^{99m}\text{TcO}_2$ (18).

Jankowsky e colaboradores (50) usaram eletroforese capilar (técnica de separação onde as diferentes espécies movimentam-se em função do tamanho, carga, pH, viscosidade, intensidade de corrente e voltagem aplicada) para analisar os radiofármacos EC- ^{99m}Tc , ECD- ^{99m}Tc e Sestamibi- ^{99m}Tc . Em outro estudo, Jankowsky e colaboradores (51) utilizaram o mesmo sistema para determinar a constante de dissociação de alguns radiofármacos.

A técnica de purificação por resina de troca iônica envolve a troca de íons entre a solução a ser analisada e a resina (2). A extração por solvente baseia-se na distribuição do soluto em dois solventes imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico. Dessa forma, a separação de $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ presente como impureza no eluído de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser realizada por extração líquido-líquido com metiletilcetona e água (48).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) promove a separação de substâncias por sua distribuição entre a fase estacionária e a fase móvel, possuindo alta resolução e rapidez de separação. Devido a sua eficiência na separação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$, e a capacidade em diferenciar formas poliméricas, entre outros, a CLAE tornou-se uma técnica indispensável no controle de qualidade de radiofármacos (16, 48).

3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na separação diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre a amostra, a fase móvel e a fase estacionária (52).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza pressão elevada para forçar a passagem de solvente através de colunas analíticas contendo partículas muito finas, capazes de proporcionar separações eficientes (53).

O equipamento para CLAE (FIG. 9) é composto dos seguintes componentes: reservatórios de fase móvel, sistema de bombeamento, medidor de pressão, válvula de injeção, injetor automático, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição e tratamento de dados (52).

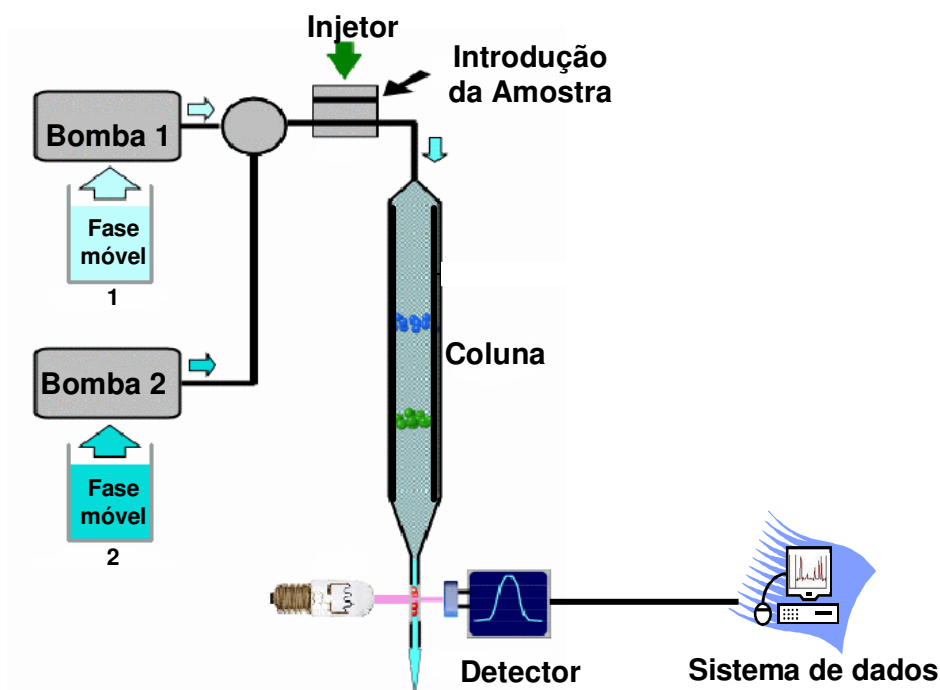


FIGURA 9 – Esquema simplificado de um sistema cromatográfico para CLAE.

O solvente empregado deve ter baixa viscosidade, alto grau de pureza ou ser facilmente purificado, não dissolver a fase estacionária e polaridade adequada para permitir uma separação conveniente de todas as espécies presentes (53).

O sistema de bombas é utilizado para conduzir a fase móvel a uma vazão determinada, sob alta pressão (até 400 bars), até as válvulas de mistura. O injetor (manual ou automático) introduz a amostra na fase móvel, conduzindo a mistura através da coluna. É na coluna que ocorrem as separações dos analitos de interesse. Os detectores são usados para o monitoramento e quantificação dos componentes que eluem separadamente da coluna (53).

Um detector ideal é sensível a pequenas concentrações dos constituintes da amostra, fornece resposta linear em um determinado intervalo de concentração e não produz alargamento de pico. O detector ultravioleta é o mais usado na CLAE porque muitos solutos absorvem a luz ultravioleta. Os sistemas mais simples empregam a emissão intensa a 254 nm da lâmpada de mercúrio, enquanto os instrumentos mais versáteis possuem lâmpadas de deutério, xenônio ou tungstênio e um monocromador, para permitir a escolha do comprimento de onda desejado (53).

O sinal elétrico emitido pelo detector é armazenado e processado pelo sistema formado por computador e *software*. O registro gráfico obtido na forma de cromatograma é representado pelo sinal absorbância em função do tempo (53, 54).

Os sistemas CLAE têm sido amplamente utilizados, devido à maior eficiência do processo global de análise, proporcionando o cumprimento das regulamentações no controle de qualidade e no desenvolvimento de novos medicamentos (2).

A literatura descreve vários estudos de radiofármacos utilizando a técnica de cromatografia líquida. Verbeke e colaboradores (55) realizaram comparações de análises por CLAE de preparações de SAH-^{99m}Tc, com análise por “fast protein liquid chromatography” (FPLC), um tipo de cromatografia líquida rápida e específica para proteínas.

Verduyck e colaboradores (34) realizaram a confirmação da identidade de Sestamibi-^{99m}Tc e ECD-^{99m}Tc por cromatografia líquida com detector de massas e de radiação. As impurezas radioquímicas potenciais, resultantes de redução incompleta ou oxidação parcial, e complexos de ^{99m}Tc com derivados do monoéster e do diácido, gerados por hidrólise do ligante ou esterificação incompleta durante a síntese, foram avaliados pelos pesquisadores.

A realização de análises para identificação das impurezas de EC-^{99m}Tc e ECD-^{99m}Tc por CLAE em fase reversa foi desenvolvida por Mang'era e colaboradores (28).

Apesar da aparente simplicidade com que os radiofármacos de tecnécio são obtidos, ou seja, mediante simples adição de solução de ^{99m}TcO₄⁻ ao RL,

reações químicas complexas ocorrem entre as espécies reativas, existindo inúmeros fatores que podem interferir no desenvolvimento adequado dessas reações (16). Portanto, é de extrema importância a implantação de programas de controle de qualidade, utilizando as várias técnicas apresentadas na literatura, para identificar e corrigir eventuais problemas, ou mesmo evitá-los.

3.5.1.1 Modos de separação

A classificação da cromatografia líquida de acordo com a fase estacionária foi primeiramente dividida em cromatografia de adsorção e cromatografia de partição, referindo-se a fase estacionária sólida e líquida, respectivamente (52).

No caso das fases estacionárias líquidas, estas podem estar adsorvidas sobre um suporte sólido ou imobilizadas sobre ele. No primeiro caso, a cromatografia é referida como cromatografia de partição. A cromatografia de partição perdeu espaço para a cromatografia de fases quimicamente ligadas, devido a maior estabilidade conferida por estas quando comparadas com fases adsorvidas. O grande desenvolvimento conseguido a partir das fases líquidas quimicamente ligadas fez com que estas sejam as fases majoritariamente usadas em CLAE analítica (56).

A separação de uma mistura por CLAE se dá por uma ou mais interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel. Estas interações podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (forças de Van der Waals), entre outras (56).

Os modos de separação podem ser classificados de acordo com a natureza das interações: cromatografia de exclusão, cromatografia em fase reversa, cromatografia em fase normal e cromatografia de par iônico (56).

3.5.1.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica aplicável a espécies de alta massa molecular. O empacotamento de colunas utilizadas na cromatografia de exclusão molecular consiste de partículas pequenas ($\approx 10 \mu\text{m}$) de gel rígido (sílica, vidro), gel semi-rígido (copolímero de divinilbenzeno-estireno) ou de gel mole (polissacarídeos, metacrilatos) contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir (53).

Na cromatografia de exclusão a separação ocorre de acordo com a massa molecular. Na FIG. 10 está representado o princípio da cromatografia de exclusão molecular.

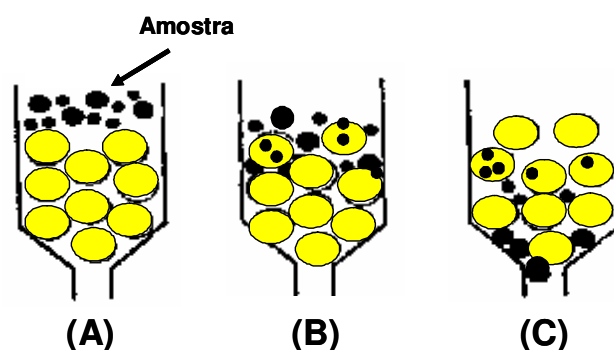


FIGURA 10- Cromatografia de exclusão molecular. **(A)** Aplicação da amostra. **(B)** Interação da amostra com os poros da fase estacionária. **(C)** Separação das moléculas da amostra de acordo com a massa molecular.

A velocidade de deslocamento das moléculas pequenas é menor, pois estas precisam permear através do gel ou outro suporte, enquanto as moléculas grandes apresentam maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, emergindo mais rapidamente; desta forma, a separação dos componentes de acordo com a massa molecular é realizada (53).

A separação por exclusão molecular requer que o tamanho do poro da fase estacionária seja adequadamente selecionado de acordo com a massa molecular da amostra que se pretende separar. A escolha do solvente em

cromatografia de exclusão requer somente que o soluto seja solúvel no solvente e que este tenha baixa viscosidade, além de compatibilidade com a amostra e a fase estacionária (56).

A determinação da massa molecular relativa é feita por intermédio de calibração com amostra de massa molecular conhecida (51).

3.5.1.1.2 Cromatografia no modo normal

Na cromatografia no modo normal (fase normal), a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Os solventes usados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos, sem a adição de água. As fases estacionárias são adsorventes orgânicos (sílica, alumina), ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, fenil ou amino) (52, 56).

Embora moléculas iônicas ou ionizáveis possam ser separadas por cromatografia no modo normal, a aplicação majoritária tem sido para moléculas neutras. As moléculas hidrofóbicas (menos polares) são eluídas primeiro, enquanto as moléculas hidrofílicas (mais polares) são retidas. A retenção em fase normal aumenta com o decréscimo da polaridade da fase móvel (52).

3.5.1.1.3 Cromatografia no modo reverso

Enquanto na cromatografia no modo normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, no modo reverso (fase reversa) a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia no modo reverso é mais usada na CLAE, uma vez que permite a separação de uma variedade de solutos e uso de fases móveis aquosas (54).

O princípio de retenção no modo reverso é a hidrofobia. A separação no modo reverso se deve principalmente a interações entre a parte apolar do soluto e a fase estacionária, isto é, a repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa. A retenção em fase reversa aumenta com o aumento de água na fase móvel (57).

3.5.1.1.4 Cromatografia de par iônico

A cromatografia de par de íons é um tipo de cromatografia de partição em fase reversa usada para a separação e determinação de espécies iônicas. A fase móvel consiste de um tampão aquoso, um solvente orgânico e um composto iônico contendo um contra íon de carga oposta ao da amostra. Um contra íon é um íon que se combina com o íon da amostra para formar um par de íons. O par de íons pode ter cargas opostas, resultando em uma espécie neutra (53, 58).

Para separar uma mistura de cátions (por exemplo, bases orgânicas protonadas), é adicionado à fase móvel um pareador iônico (PIC), como o octassulfonato de sódio ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{-SO}_3^-$). O pareador acomoda-se na fase estacionária, tornando-a uma camada carregada (FIG. 11) (53,58).

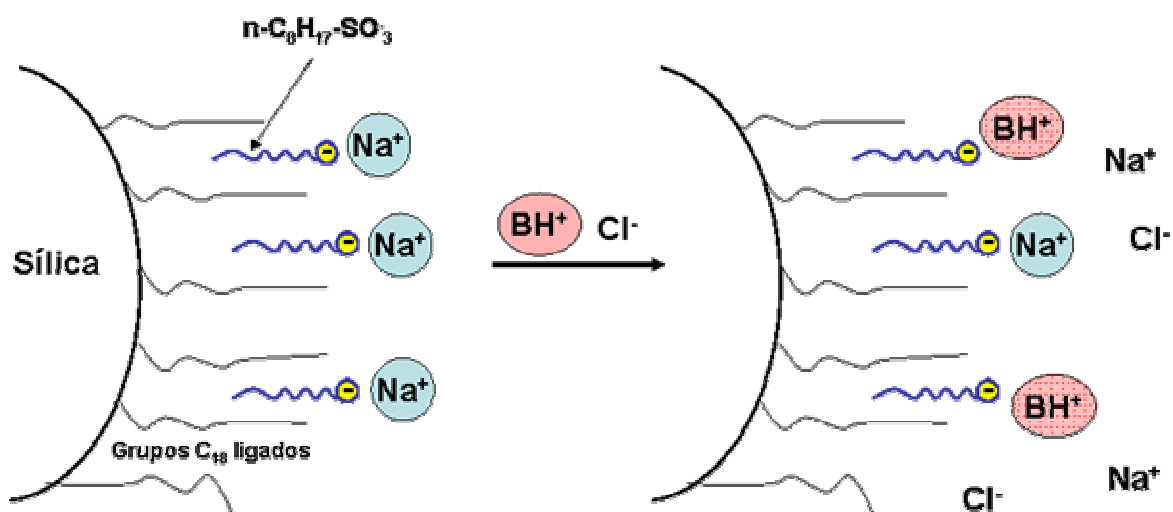


FIGURA 11– Princípio da cromatografia de par iônico. O pareador iônico adicionado à fase móvel se liga à fase estacionária apolar. Os grupos sulfonatos negativos ficam expostos na fase estacionária e interagem com os íons da amostra. (53).

Quando os cátions (no exemplo BH^+) do constituinte em análise passam pela coluna, eles podem se associar com a fase estacionária por atração

eletrostática com os ânions do PIC. Para separar os ânions do constituinte, podem ser adicionados sais de tetrabutílamônio à fase móvel (53).

O equilíbrio do PIC com a fase móvel é lento, a separação é mais sensível às variações na temperatura e no pH e a concentração do PIC afeta a separação (58).

3.5.1.2 Eluição isocrática e por gradiente

A eluição pode ser feita de duas maneiras: isocrática e por gradiente. A eluição isocrática é feita com um único solvente ou uma mistura constante de solventes, ou seja, a composição da fase móvel permanece inalterada durante toda a análise. A polaridade da fase móvel não se altera ao longo do tempo (57).

Se um solvente não propiciar uma eluição suficientemente rápida de todos os componentes, então pode ser usada a eluição por gradiente.

Na eluição por gradiente a composição da fase móvel se altera ao longo do tempo. No caso da fase reversa, a polaridade da fase móvel diminui ao longo do tempo, para aumentar a afinidade entre as fases estacionária e móvel. Essa alteração da polaridade é feita alterando-se a proporção entre os componentes da fase móvel conforme o tempo passa. Neste caso, quantidades crescentes do solvente orgânico são misturadas ao solvente aquoso para criar um gradiente contínuo (54). Pode-se programar a mistura de dois a quatro solventes diferentes (59).

3.5.2 Cromatografia planar

Os métodos planares de cromatografia incluem cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia de papel (CP). Em cromatografia planar, a fase estacionária pode ser uma fita de papel (CP) ou uma placa de vidro, alumínio ou plástico recoberto por um material adsorvente (CCD) (12, 60).

Para análise de pureza radioquímica de radiofármacos, aplica-se uma pequena amostra do material a ser analisado numa extremidade da fita (ou placa, para CCD). A fase móvel (solvente) se desloca através da fase estacionária por ação de capilaridade (60). A FIG. 12 apresenta as fases da cromatografia planar.

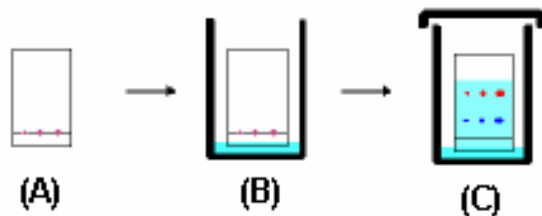


FIGURA 12- Princípio da cromatografia planar. (A) aplicação da amostra; (B) inserção da placa em uma cuba com a fase móvel e (C) separação dos analitos.

Para radiofármacos marcados com ^{99m}Tc , a cromatografia planar permite determinar a presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$. Estas impurezas permanecem na origem ou deslocam-se com o solvente, dependendo do radiofármaco e do solvente utilizado como fase móvel. Alguns aspectos devem ser considerados antes e durante a realização do ensaio: tamanho da gota, condições do suporte cromatográfico e pureza do solvente (16).

A impureza radioquímica pode ser expressa conforme Equações 1 e 2 que expressam o fator de retardamento R_f (12).

$$\text{Radioatividade na origem (\%)} = \frac{\text{Radioatividade na origem}}{\text{Radioatividade (origem + frente de solvente)}} \quad (1)$$

$$\text{Radioatividade na frente de solvente (\%)} = \frac{\text{Radioatividade na frente de solvente}}{\text{Radioatividade (origem + frente de solvente)}} \quad (2)$$

A pureza radioquímica (eficiência de marcação) pode ser determinada através da equação de balanço de massa (Equação 3). A radioatividade é medida através de um contador de radiação gama (12).

$$\% \text{ Pureza radioquímica} = 100 - (\% ^{99m}\text{TcO}_4^-) - (\% ^{99m}\text{TcO}_2) \quad (3)$$

3.6 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se avaliar a qualidade dos resultados das medições, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo exigida por órgãos reguladores. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a prejuízos financeiros irreparáveis (5). Para evitar ou minimizar situações que levem a questionamentos futuros em relação a resultados analíticos fornecidos pelo laboratório, é imprescindível a realização de experimentos de validação e o registro dos dados obtidos durante todo o processo de desenvolvimento da metodologia analítica (61).

Entende-se por validação de um método analítico o processo que se demonstra que a metodologia analítica é apropriada para o propósito para o qual será utilizada.

A validação é definida como o estabelecimento de evidências experimentais documentadas que fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um produto que atenderá às características e especificações de qualidade (5).

A FIG. 13 apresenta um fluxograma das fases envolvidas no processo de desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico. Os parâmetros analíticos avaliados na validação de métodos são: robustez, seletividade, linearidade,

precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

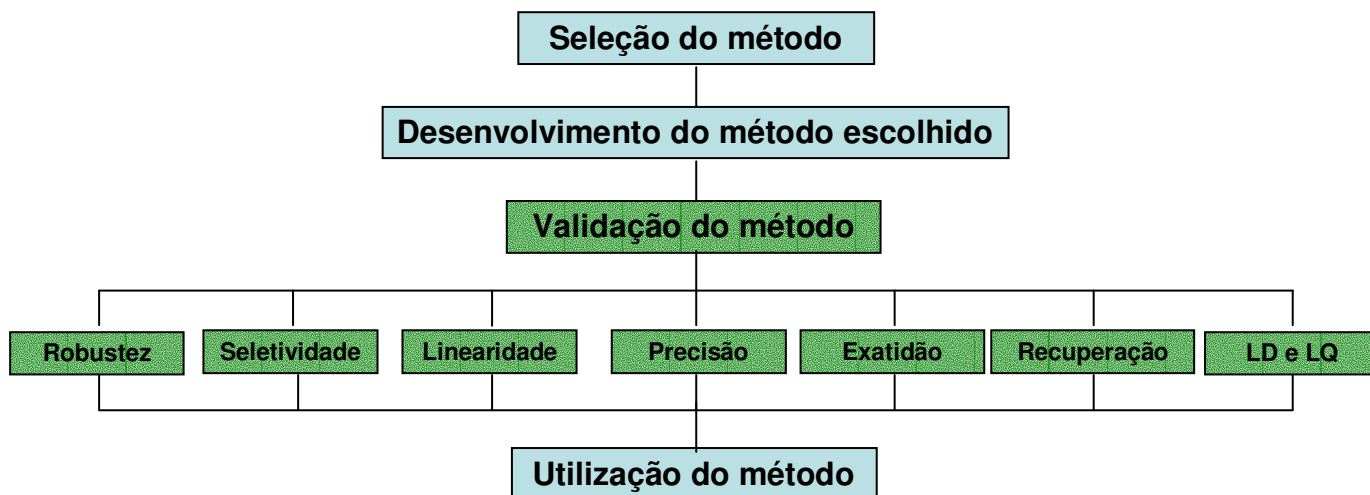


FIGURA 13- Fluxograma das fases envolvidas no processo de validação de um método analítico.

O desenvolvimento e a validação de uma nova metodologia analítica é um processo iterativo que se retro-alimenta, pois durante o estudo os parâmetros-chave do método vão sendo determinados e usados para o estudo das fases subsequentes, e conforme os resultados obtidos, estes podem indicar a necessidade de mudanças em fases anteriores do procedimento analítico e a necessidade de novos ensaios (nova validação). O procedimento completo de validação de um método pode consumir muito tempo, mas a qualidade dos dados gerados está diretamente ligada à qualidade deste processo (61).

Os parâmetros de validação de métodos têm sido definidos por diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais e algumas definições são diferentes entre os grupos. Uma tentativa em harmonizar as diferenças foi feita pela ICH (International Conference of Harmonization), com publicações de normas para aplicações farmacêuticas (62).

Organismos nacionais de credenciamento como ANVISA e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), e órgãos internacionais de credenciamento como IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Standard Organization (ISO 17025) e ICH, em caso de credenciamento exigem o item “validação de métodos analíticos” como requisito fundamental para demonstrar a qualidade e a competência técnica (4, 63).

3.6.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos

3.6.1.1 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Essas variações podem ser mudanças na porcentagem de fase orgânica na fase móvel, pH da fase móvel, concentração do tampão, temperatura e volume de injeção de amostra (4, 64).

A ANVISA (4) e o ICH (62) recomendam a avaliação da robustez no desenvolvimento do método e sugerem como variáveis a serem avaliadas para um método de CLAE: força iônica, composição da fase móvel, colunas de diferentes lotes ou fabricantes, fluxo da fase móvel, volume de amostra, temperatura do forno de coluna e pH da fase móvel.

3.6.1.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Estes interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas, isômeros, produtos de degradação, impurezas e outros (63).

As diretrizes da Comunidade Européia (65), ANVISA (4) e INMETRO (66) usam o termo especificidade como sinônimo de seletividade. Paschoal utiliza a definição de especificidade como o método que produz resposta para uma única substância, enquanto o termo seletividade refere-se ao método que produz respostas para várias substâncias, mas que, no entanto, é capaz de distinguir umas das outras (67).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (referência), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (5).

A segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de uma substância química de referência e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (5).

O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo (5).

3.6.1.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Para o estudo da linearidade faz-se necessária a obtenção de uma curva analítica, sendo o eixo x correspondente aos

valores de concentração da amostra e o eixo y , os valores de resposta obtidos com a variação da concentração (4).

De acordo com as recomendações da FDA - Food and Drug Administration (68), a curva analítica deve ser construída usando amostras com o analito para no mínimo cinco nível de concentrações, abrangendo a faixa de concentração esperada. Como critérios de avaliação, a FDA recomenda que os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos (regressão linear pelo método dos mínimos quadrados).

A ANVISA (4) segue as recomendações da FDA e acrescenta que devem ser apresentados os coeficientes linear (b) e angular (a), e que o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98. A equação da reta é definida pela Equação 4.

$$y = ax + b \quad (4)$$

onde:

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear.

A IUPAC (63) recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata.

3.6.1.4 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições experimentais definidas. Quanto mais próximos os valores experimentais obtidos estiverem entre si, maior será a precisão (63).

A avaliação da precisão é subdividida em três etapas: repetibilidade ou precisão intradia (mede-se o grau de variação de uma série de replicatas em um

curto intervalo de tempo), precisão intermediária ou precisão interdia (expressa-se o efeito das variações dentro do laboratório devido a análises em diferentes dias) e reprodutibilidade (mede a precisão do método quando executado em diferentes laboratórios) (4).

A precisão pode ser expressa como o desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) (coeficiente de variação) de uma série de medidas (Equação 5) (4).

$$DPR (\%) = \frac{(DP \times 100)}{CMD} \quad (5)$$

onde:

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (C_i - CMD)^2}{n-1}}$$

C_i = concentração determinada;

CMD = concentração média determinada;

n = número de medições.

De acordo com a ANVISA (4), o valor máximo aceitável de DPR é variável com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método e não deve ser superior a 5%.

3.6.1.5 Exatidão

A exatidão do método é definida pela relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência, sendo calculada pela Equação 6 (4).

$$Exatidão (\%) = \frac{(CMD \times 100)}{CT} \quad (6)$$

onde:

CMD = concentração média determinada;

CT = concentração teórica.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade (4).

3.6.1.6 Recuperação

Avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. A recuperação do analito pode ser estimada pelos resultados de análises em que são adicionadas quantidades conhecidas de uma substância químicas de referência (adição de padrão). Transferem-se alíquotas da solução de referência e da amostra para um balão volumétrico completando-o com um solvente apropriado até o volume final desejado.

A porcentagem de recuperação é determinada pela Equação 7 (69).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_a - C_{na}) \times 100}{CT} \quad (7)$$

onde:

C_a = concentração encontrada na amostra adicionada de padrão;

C_{na} = concentração encontrada na amostra não adicionada de padrão;

CT = concentração teórica.

Embora porcentagens de recuperação próximas a 100% sejam desejadas, admitem-se valores no intervalo 90– 107% desde que a recuperação seja precisa e exata (61).

3.6.1.7 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (4, 66).

A ANVISA (4) estabelece que a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha base. Pode ser determinado através da equação 8.

$$LD = \frac{(DP_a \times 3)}{IC} \quad (8)$$

onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo y ;

IC = inclinação da curva analítica.

A FDA (68) não menciona o procedimento a ser realizado para estimar o LD. A IUPAC (63) recomenda que se estime o LD a partir de pelo menos seis determinações independentes do analito no branco ou em uma amostra contendo o analito em uma concentração baixa, no entanto, distinguível de zero ou resultado negativo, sendo o valor de LD estabelecido pelo cálculo de três vezes a estimativa do desvio padrão das medidas.

Para calcular o LD, a curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (5). Softwares como Microsoft Excel ou Microcal Origin podem estimar os desvios padrão relativos e os parâmetros da curva.

3.6.1.8 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro é determinado pela equação 9 (4).

$$LQ = \frac{(DP_a \times 10)}{IC} \quad (9)$$

onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo y ;

IC = inclinação da curva.

O método mais utilizado para determinação de LD e LQ é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído não é trivial, pois a curva analítica é construída com o cálculo de área de um determinado pico e não somente o sinal do detector. Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Nas mesmas condições de ruído, a resposta do detector com maior sensibilidade resulta em coeficiente angular maior, e conseqüentemente LD e LQ menores (5).

3.7 Estabilidade

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía no momento da fabricação (70).

Os compostos devem ser estáveis *in vitro* e *in vivo*. Devem ser estabelecidas as condições ótimas de temperatura, pH e luz, pois determinarão as condições de preparação e armazenamento. A modificação do composto *in vivo* origina biodistribuição indesejável da radioatividade em se tratando de radiofármacos (14).

Para avaliar a estabilidade do(s) analito(s) na matriz, as agências FDA (68) e ANVISA (4) estabelecem ensaios envolvendo ciclos de congelamento/descongelamento, em períodos de curta e longa duração, além de verificar também a estabilidade do(s) analito(s) em soluções padrão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A fase experimental do trabalho foi realizada nos laboratórios de controle de qualidade da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes relacionados a seguir são de grau analítico (P.A.) ou de grau HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), pureza $\geq 99,9\%$:

- Acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$) - Merck;
- Acetato de etila ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) - Merck;
- Acetona (CH_3COCH_3) - Merck;
- Acetonitrila (CH_3CN) - Merck;
- Ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) - Merck;
- Azida de sódio (NaN_3) - Riedel de Hãen;
- Cloreto de amônio (NH_4Cl) - Merck;
- Cloreto de sódio (NaCl) - Merck;
- Cloreto estanoso diidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Merck;
- Diidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) - Merck;
- Diidrogeno fosfato de tetrabutilamônio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\text{PO}_4$) - (PIC A) - Waters;
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) - Merck;

- Hidróxido de sódio (NaOH) - Merck;
- Metanol (CH₃OH) - Merck;
- Monoidrogeno fosfato de disódio (Na₂HPO₄) - Merck;
- Pentanosulfonato de sódio (CH₃(CH₂)₄SO₃Na – (PIC B5)) – Waters;
- Pertecnetato de sódio (Na ^{99m}TcO₄) – DIRF, IPEN-CNEN/SP
- Solução salina (NaCl 0,9%) - DIRF, IPEN-CNEN/SP;
- Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) - Merck;
- Tetraidrofurano (C₄H₈O) – Merck.

As substâncias químicas utilizadas como referências foram obtidas da Advanced Biochemical Compounds (ABX) e Sigma, com pureza ≥ 95%.

- SAB, Sigma;
- EC, ABX;
- ECD, ABX e
- MIBI, ABX.

A solução de SAH 20% foi obtida da Baxter.

Os RL para marcação com tecnécio-99m utilizados neste trabalho foram produzidos na DIRF, IPEN-CNEN/SP. A TAB. 2 apresenta a composição dos RL.

TABELA 2- Composição dos RL produzidos na DIRF.

RL	Componente	mg frasco ⁻¹
SAH	SAH 20%	10
	SnCl ₂ .2H ₂ O	0,04
EC	EC	0,5
	SnCl ₂ .2H ₂ O	0,3
	Na ₂ HPO ₄	10,0
	Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O ^(*)	45,0
ECD	ECD	1,0
	SnCl ₂ .2H ₂ O	0,125
	Manitol	24,0
	EDTA ^(**)	0,36
MIBI	Cu[MIBI] ₄ BF ₄	1,0
	Citrato de sódio	1,1
	L- cisteína	5,0
	Manitol	20,0

^(*)Na₃PO₄- Fosfato dodecaidratado de trisódio

^(**)EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

4.1.2 Equipamentos

Os reagentes para preparação das soluções de referência foram pesados em balança analítica Shimadzu, modelo AW-220. Sistema Milli-RX 45 da Millipore foi utilizado para obtenção de água purificada. As diluições foram realizadas em balões volumétricos Pyrex utilizando-se micropipetas calibradas da marca Eppendorf. Bomba de vácuo portátil Millipore modelo WP 6111560 e membranas de filtração Millex – HV (Millipore) de diâmetro 47 mm e tamanho de poro 0,22 µm foram utilizadas para filtração das soluções tampão. O pH das soluções foi ajustado com o auxílio de pH-metro Micronal modelo B 474.

Para marcação de MIBI com ^{99m}Tc , foi utilizado banho-maria Eletrolab modelo 101/1. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada de acordo com os procedimentos operacionais padrão – POPs da Diretoria de Radiofarmácia, IPEN-CNEN/SP. Os ensaios de CCD para SAH- ^{99m}Tc , EC- ^{99m}Tc e Sestamibi- ^{99m}Tc foram realizados utilizando-se sílica-gel com suporte de fibra de vidro, ITLC-SG (Pall Life Sciences). Sílica-gel em suporte aluminizado, TLC-SG (Merck), foi utilizada para as análises de ECD- ^{99m}Tc . A concentração radioativa foi medida em câmara de ionização da marca Capintec, modelo CRC-35R. Contador Gama marca Perkin Elmer, modelo Cobra-D-5002 foi utilizado para a contagem de atividade (contagem por minuto, cpm) nas fitas de CCD.

4.1.2.1 Sistema CLAE

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com sistema quaternário de solventes marca Shimadzu, modelo LC-20AT Prominence, composto por duas bombas, forno de coluna modelo CTO 20A, sistema de controle modelo CBM 20A, degaseificador modelo DGU-20A₅, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, e dois detectores ligados em série: detector com arranjo de diodos (DAD) UV-visível modelo SPD-M20A e detector de radioatividade Bioscan modelo B-FC-3300. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software LC Solutions®.

4.2 Métodos

4.2.1 Marcação dos Reagentes Liofilizados

A marcação dos reagentes liofilizados foi feita de acordo com os procedimentos operacionais padrão – POPs da Diretoria de Radiofarmácia, IPEN-CNEN/SP. A diluição do pertecnetato de sódio proveniente do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ foi

feita com solução salina (NaCl 0,9%). O volume final após a marcação foi 1 mL para o radiofármaco de SAH, 2 mL para o radiofármaco EC e 3 mL para os radiofármacos de ECD e MIBI. A concentração radioativa de todos os radiofármacos analisados foi de $1,5 \text{ mCi mL}^{-1}$ ($55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$). A FIG. 14 ilustra as fases de marcação dos reagentes liofilizados SAH, EC, ECD e MIBI com ^{99m}Tc .

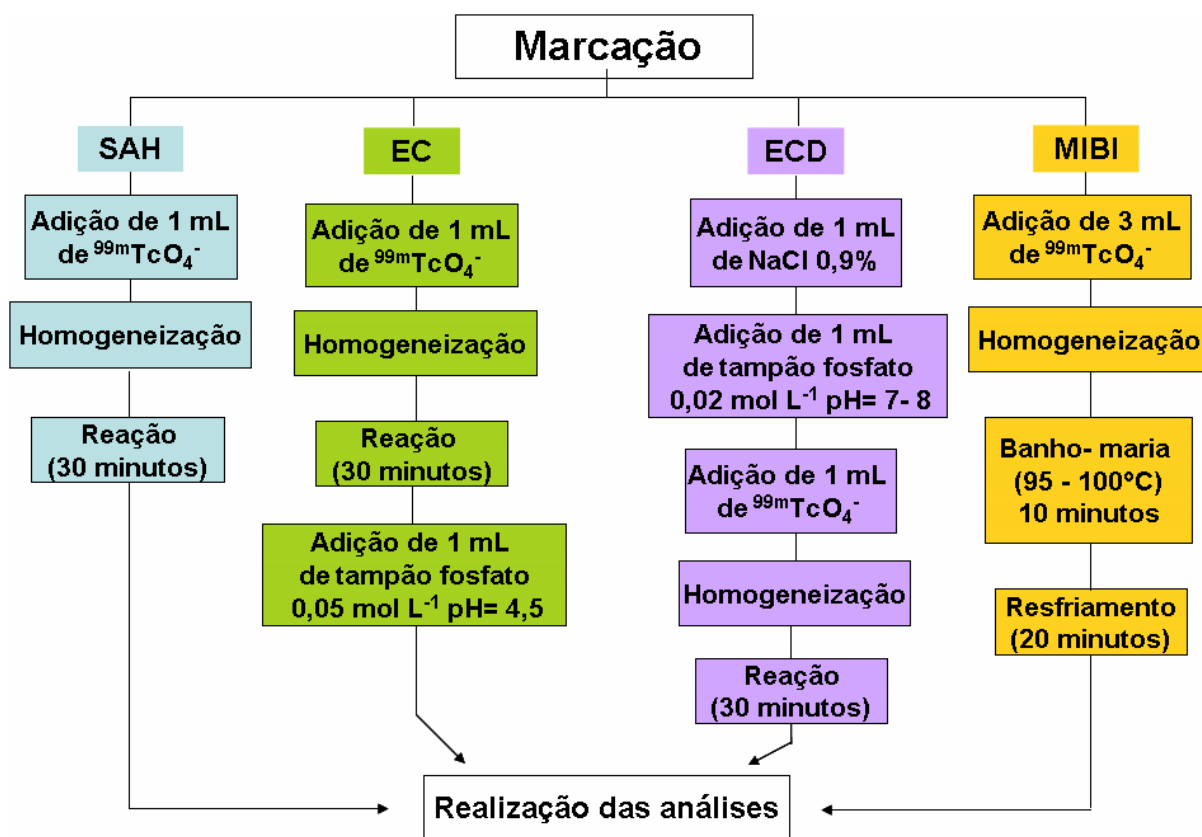


FIGURA 14- Fluxograma das fases de marcação dos RL com ^{99m}Tc .

4.2.2 Validação do método analítico por CLAE

As metodologias analíticas foram avaliadas segundo os parâmetros definidos pela ANVISA, Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (4) e RDC nº 46 de 18 de maio de

2000: Regulamento técnico para a produção e o controle de qualidade de hemoderivados de origem plasmática (apenas para as análises do SAH e SAH-^{99m}Tc) (46).

Modificações no fluxo da fase móvel, volume de amostra injetada, pH da fase móvel e temperatura do forno de coluna foram realizadas no desenvolvimento do método. A TAB. 3 apresenta as condições alteradas para a análise de matérias-primas e radiofármacos. Na TAB. 4 estão relacionadas algumas fases móveis e colunas utilizadas.

TABELA 3- Condições alteradas no desenvolvimento dos métodos.

Parâmetros	Condições alteradas
Fluxo da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,5
Volume de amostra (µL)	10; 20; 50; 100; 150 e 200
pH da fase móvel	2,00; 2,50; 4,00; 6,00; 7,50; e 9,00
Temperatura do forno de coluna (°C)	25, 30, 40, 50, 60 e 80

TABELA 4- Colunas e fases móveis utilizadas no desenvolvimento dos métodos.

Amostra	Condição	Coluna	Fase móvel	Ref.
SAH	A	Protein-Pack 300SW 300 x 7,5 mm; 10 µm	Na ₂ HPO ₄ (0,30 mol L ⁻¹), KH ₂ PO ₄ (0,08 mol L ⁻¹), NaCl (0,20 mol L ⁻¹) e NaN ₃ (0,030 mol L ⁻¹) : H ₂ O (50:50, v/v)	36
SAH	B	TSKgel G3000SW 600 x 7,5 mm; 10 µm	Na ₂ HPO ₄ (0,30 mol L ⁻¹), KH ₂ PO ₄ (0,08 mol L ⁻¹), NaCl (0,20 mol L ⁻¹) e NaN ₃ (0,030 mol L ⁻¹) : H ₂ O (50:50, v/v)	36
EC	C	Shim-Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5 µm	Na ₂ HPO ₄ (0,05 mol L ⁻¹): C ₂ H ₅ OH (80:20, v/v)	28
EC	D	Shim-Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5 µm	PIC B5 0,2%: C ₂ H ₅ OH (80:20, v/v)	28
EC	E	Shim-Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5 µm	PIC A 0,2%: C ₂ H ₅ OH (80:20, v/v)	28
EC/ECD	F	Shim-Pack VP-ODS 250 x 4,6 mm; 5 µm	PIC A 0,2%: C ₂ H ₅ OH Gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica	28
EC/ECD	G	Shim-Pack VP-ODS 250 x 4,6 mm; 5 µm	Na ₂ HPO ₄ (0,0125 mol L ⁻¹): C ₂ H ₅ OH Gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica	28
MIBI	H	Shim-Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5 µm	CH ₃ CN, (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05 mol L ⁻¹), CH ₃ OH 20:35:45 (v/v)	36

A seletividade do método foi avaliada comparando a matriz isenta de substância e a matriz adicionada da substância de referência (*spike*). ^{99m}TcO₂ foi preparado pela adição de ^{99m}TcO₄⁻ (40 MBq mL⁻¹) à solução de cloreto estano em pH 8,0, de acordo com Tsopeles (10). A hidrólise alcalina do complexo ECD-^{99m}Tc foi realizada misturando-se 3 mL de ECD-^{99m}Tc (30 MBq) e 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹. Após 15 minutos, adicionou-se HCl 1 mol L⁻¹ para ajustar o pH a 7,00, de acordo com Araújo (29).

Para o método de SAH, a seletividade foi avaliada analisando-se os espectros registrados pelo detector DAD (para uma faixa de comprimento de onda) em um determinado pico (pureza de pico).

As soluções estoques foram preparadas individualmente pela dissolução das substâncias de referência com água purificada, em balões volumétricos de 10 mL. Para as amostras de EC, a dissolução foi feita ajustando-se a acidez da solução a pH 9,00, com NaOH 0,10 mol L⁻¹. Os RL também foram analisados após dissolução semelhante às realizadas para as substâncias de referências. Todas as soluções foram filtradas e analisadas em triplicata.

As faixas de concentração das soluções de referência foram: zero, 2, 5, 10, 15 e 20 mg mL⁻¹ para SAH; zero, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL⁻¹ para EC, ECD e MIBI.

A linearidade do método foi avaliada estabelecendo-se correlação linear entre as concentrações das substâncias químicas de referência, considerada variável independente (x), e as absorvâncias de pico médias, variável dependente (y) (Equação 4 do item 3.6.1.3). Pela regressão linear na faixa de concentração estudada, utilizando-se o programa Origin, foram calculados os coeficientes de correlação (r²).

A precisão foi avaliada pelo cálculo de desvio padrão relativo (Equação 5, item 3.6.1.4) de seis concentrações diferentes, em três repetições. Avaliou-se a repetibilidade e a precisão intermediária.

O parâmetro exatidão foi avaliado pela análise de amostras em concentrações baixa, média e alta (triplicatas) e seu valor expresso segundo a Equação 6, item 3.6.1.5.

Ensaio de recuperação foram utilizados para averiguação da precisão e exatidão do método. A recuperação foi avaliada para os RL (SAH, EC e ECD). Inicialmente, as amostras de RL foram analisadas utilizando-se o método proposto. Separadamente, soluções de referências de SAH (2,5; 5,0 e 10 mg mL⁻¹), EC e ECD (50; 100 e 150 µg mL⁻¹) foram adicionadas a balões contendo as amostras de RL. Foram feitas três determinações para cada concentração e calculadas as

porcentagens de recuperação (% Recuperação), conforme Equação 7 (seção 3.6.1.6).

Para o cálculo de LD e do LQ, foram utilizadas as Equações 8 e 9 (seções 3.6.1.7 e 3.6.1.8), respectivamente. O desvio padrão (DP) do intercepto com o eixo y (coeficiente de correlação linear, b) de três curvas analíticas foi calculado para cada substância de referência dos RL.

A estabilidade foi avaliada pela determinação da pureza radioquímica (PRq) três meses após a data de fabricação dos RL. Durante o período, os RL foram mantidos em temperatura de 2 a 8 °C. A PRq foi avaliada por CLAE e CCD. Para MIBI, utilizou-se CLAE, CCD e CP.

4.2.3 Análise de pureza radioquímica por CCD

A pureza radioquímica do produto marcado foi avaliada por CCD para comparação com os resultados obtidos pelo método CLAE. Alíquota de 5 µL foi aplicada na origem da fita e esta foi colocada verticalmente em uma cuba de vidro contendo a fase móvel específica para cada radiofármaco. As fases móveis e os fatores de retardamento (R_f) das impurezas são relacionados na TAB. 5.

TABELA 5- Parâmetros para controle radioquímico em RL marcados com ^{99m}Tc

Produto	Fase móvel	R_f $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Fase móvel	R_f $^{99m}\text{TcO}_2$
SAH	CH_3OH 85%	1,0	----	---
EC	CH_3COCH_3 P.A.	1,0	CH_3COOH 0,5 mol L^{-1}	0,0
ECD	NaCl 20%	1,0	CH_3COCH_3 P.A.	0,0
MIBI	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ P.A.: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} : CH_3OH P.A.: CH_3CN P.A. (10: 20: 30: 40, v/v)	1,0	$^{(*)}\text{CH}_3\text{CN}$ P.A.: CH_3COOH 0,5 mol L^{-1} : NaCl 0,3 mol L^{-1}	0,0

^(*) CP

Após a separação cromatográfica, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm e a radioatividade contada em contador gama. As impurezas foram estimadas pelas Equações 1 e 2 (item 3.5.2) e a pureza radioquímica obtida pela Equação 3 do item 3.5.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises das matérias-primas (SAH, EC, ECD e MIBI) e dos radiofármacos (SAH-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc, ECD-^{99m}Tc e Sestamibi-^{99m}Tc) por CLAE, foram avaliados alguns métodos para separação, identificação e quantificação dos compostos de interesse.

5.3 Otimização das condições de análise por CLAE para SAH e SAH-^{99m}Tc

A otimização das condições operacionais do equipamento é essencial para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica. Utilizando-se solução de referência de SAH, foi feita a variação dos parâmetros de análise, conforme TAB. 3. A coluna cromatográfica e a fase móvel utilizada estão descritas na condição A (TAB. 4- página 44). Selecionou-se o comprimento de onda de 280 nm nos estudos com o SAH por se tratar de proteína.

As FIG. 15A e 15B apresentam os cromatogramas das soluções de referência de SAH de concentração 10 mg mL⁻¹ (monômero representado pelo pico de maior absorvância).

O efeito da variação do fluxo da fase móvel na absorvância (280 nm) e na largura do pico à meia altura de SAH está apresentado nas FIG. 16A e 16B, respectivamente.

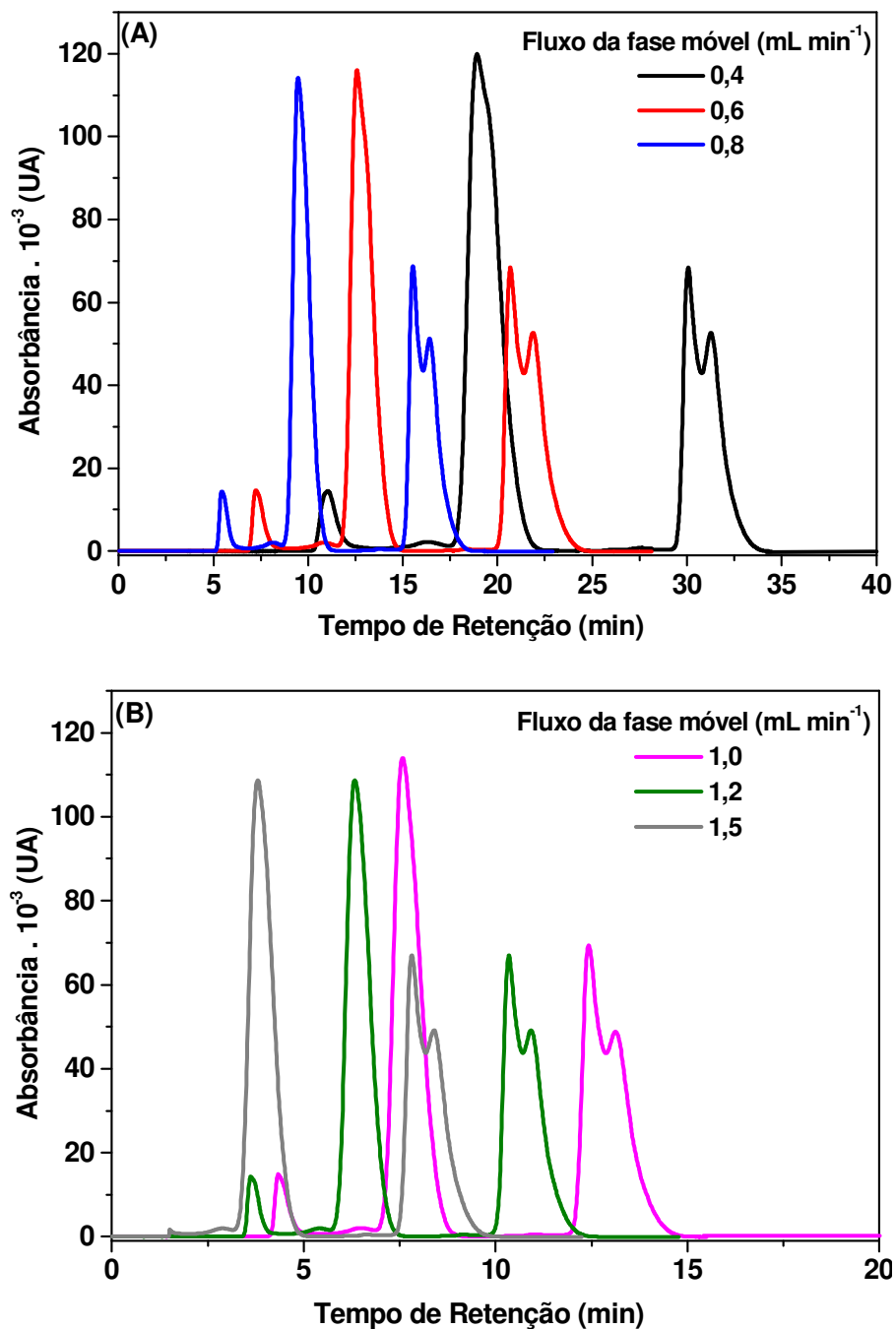


FIGURA 15- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação de fluxo da fase móvel. **(A)** Fluxos 0,4; 0,6 e 0,8 mL min⁻¹. **(B)** Fluxos 1,0; 1,2 e 1,5 mL min⁻¹. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Volume de amostra: 20 µL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

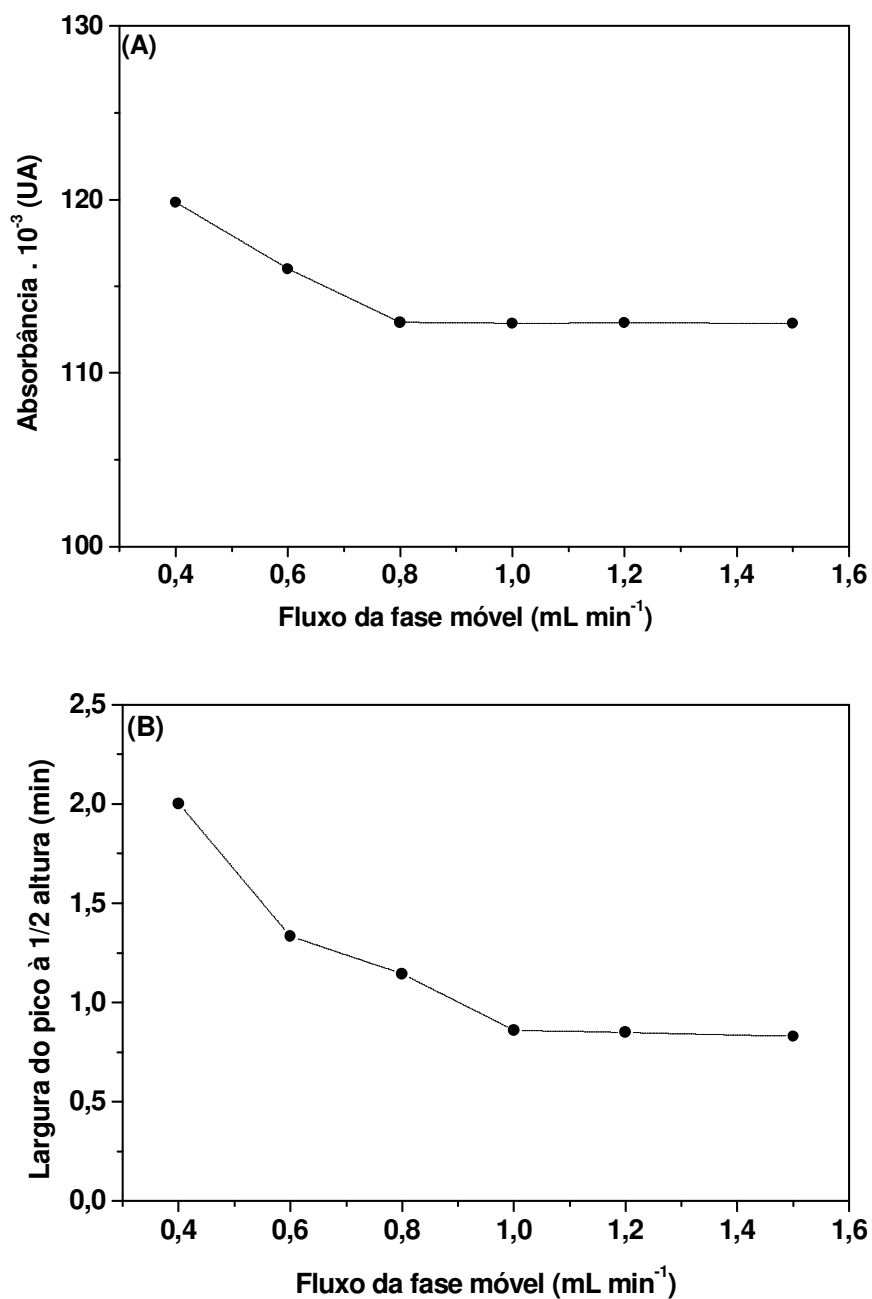


FIGURA 16- Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorbância (280 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de SAH. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Volume de amostra: 20 µL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

A variação do fluxo da fase móvel permitiu otimizar o tempo de análise (FIG. 15A e 15B). Com um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, o tempo total de análise foi de 40 minutos. Ao aumentar o fluxo até $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o tempo de análise reduziu à metade (20 minutos). Para fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, observou-se a eluição dos analitos em apenas 10 minutos, porém a separação foi afetada e picos com tempo de retenção menores que três minutos não foram observados.

Na FIG. 16A foi observado que fluxo superior ou igual a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ reduziu a absorvância em cerca de 6%. Alargamento de pico ocorreu para fluxo baixo ($0,4$ e $0,6 \text{ mL min}^{-1}$); para valores mais elevados ($1,0$; $1,2$ e $1,5 \text{ mL min}^{-1}$), o pico referente ao SAH ficou simétrico e mais estreito em 55% (FIG. 16B). O fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhido para a realização das análises de SAH.

O efeito da variação do volume de amostra injetada no cromatograma de SAH está representado na FIG 17. Nas FIG. 18A e 18B estão apresentados o efeito da variação de volume de amostra na absorvância (280 nm) e na largura do pico à meia altura, respectivamente.

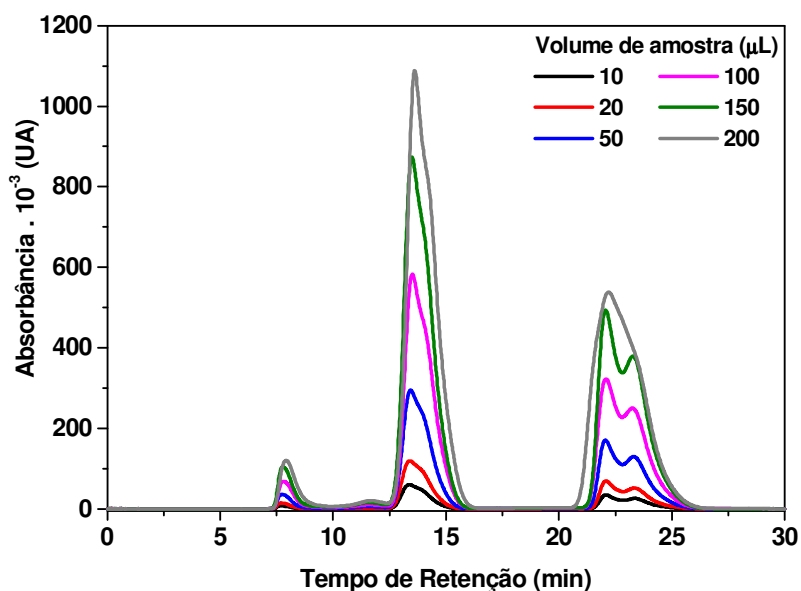


FIGURA 17- Cromatogramas de SAH 10 mg mL^{-1} com a variação de volume de amostra. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 : H_2O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

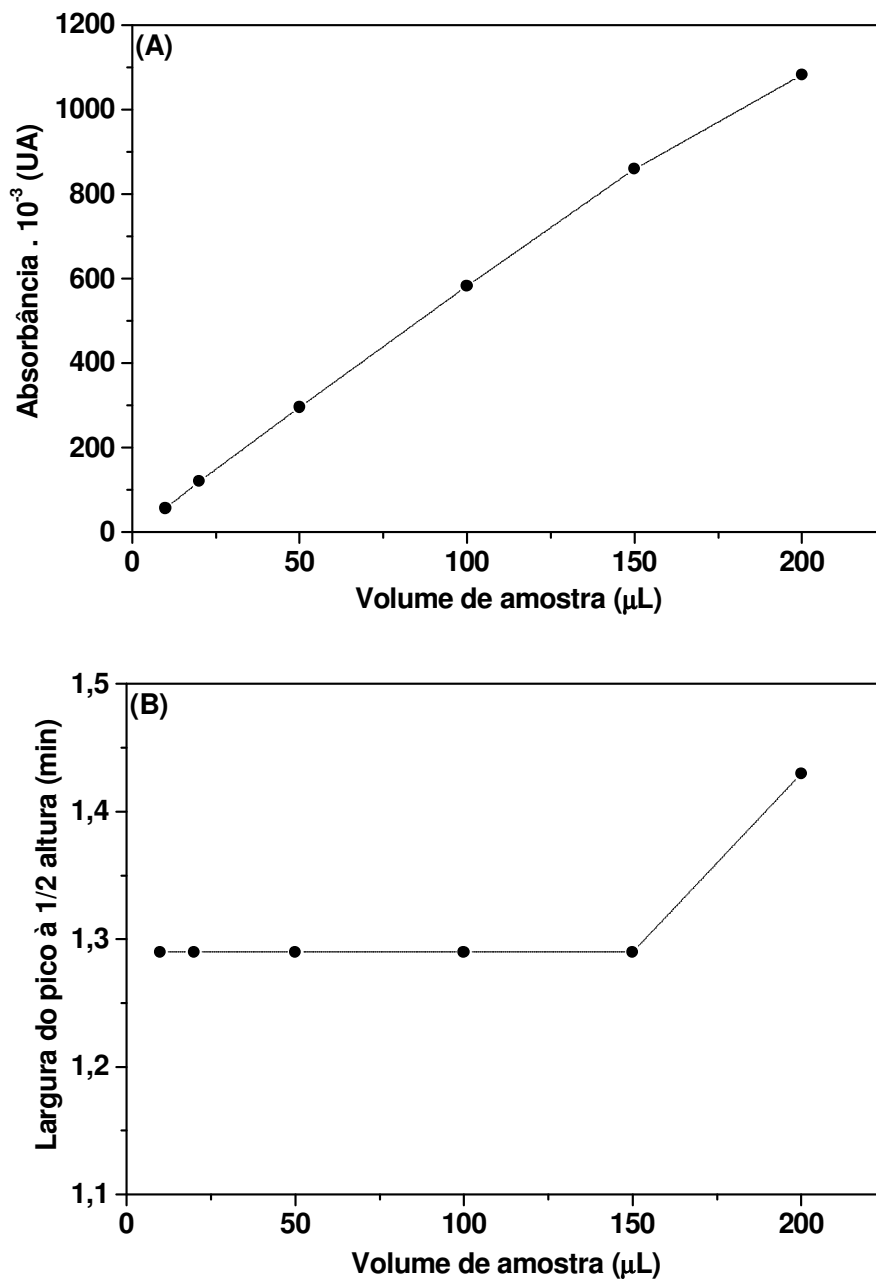


FIGURA 18- Efeito do volume de amostra **(A)** na absorbância (280 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de SAH. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 0,6 mL min⁻¹, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

A variação do volume de amostra injetada (FIG. 17) não provocou mudanças significativas no perfil cromatográfico, exceto para o volume de 200 μL que resultou em alargamento do pico em 22,50 minutos, que perdeu resolução. A variação da absorbância de SAH 10 mg mL^{-1} (FIG. 18A) com volume de injeção foi linear. Foi observado alargamento no pico de 23% para volume superior a 150 μL (FIG.18B). Foi escolhido volume de injeção de 100 μL para as análises de SAH por apresentar maior sensibilidade comparado aos volumes 10, 20 e 50 μL (FIG. 18A) e por estar numa região de pouca variação quanto à largura do pico à meia altura (FIG 18B). Volume de 100 μL tem sido usado por alguns autores (71, 72) em análises de SAH por cromatografia por exclusão de tamanho.

As FIG. 19A, 19B e 20 mostram o efeito do pH da fase móvel na robustez do método.

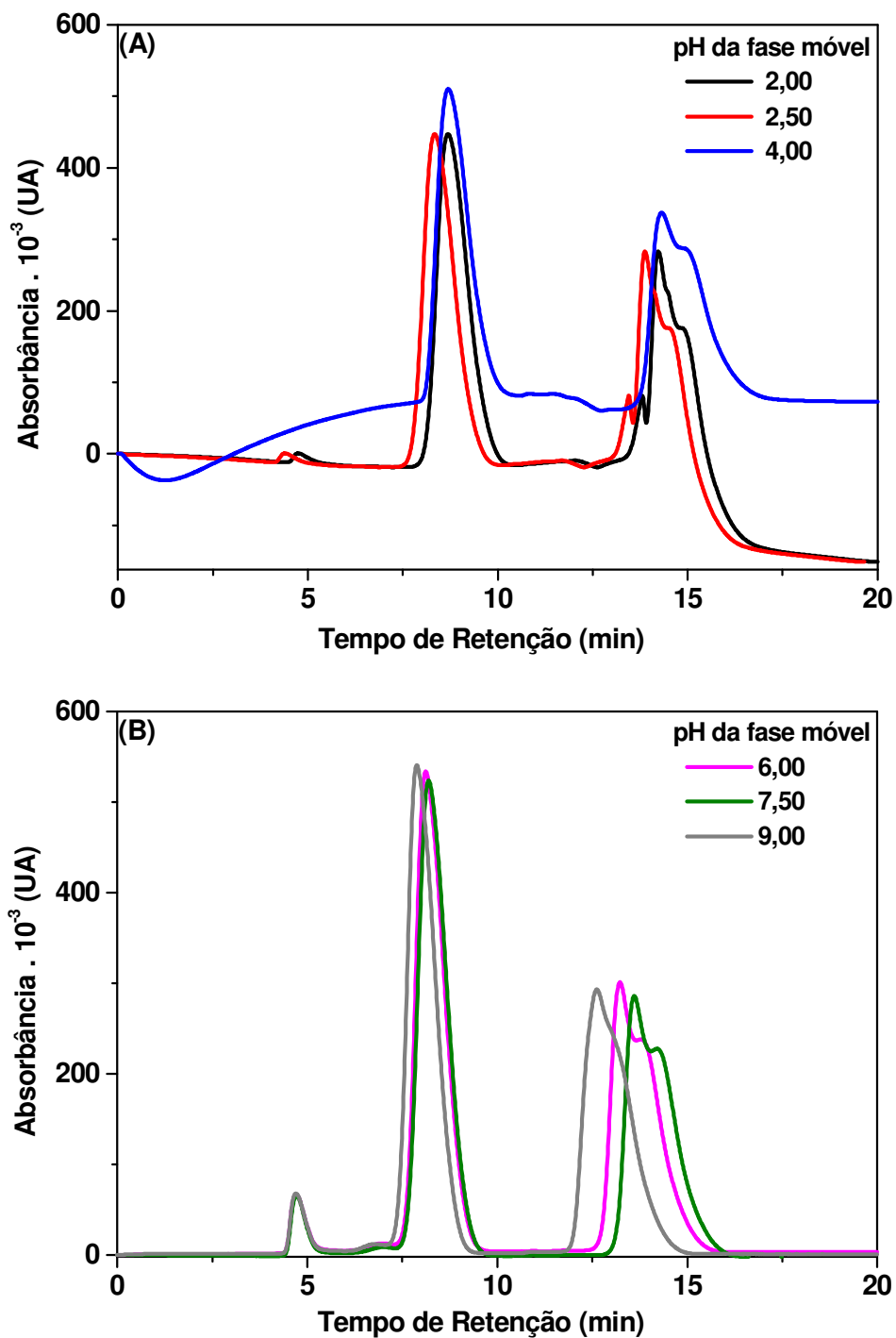


FIGURA 19- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação de pH da fase móvel. **(A)** pH: 2,00; 2,50 e 4,00. **(B)** pH 6,00; 7,50; e 9,00. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra: 100 μL e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

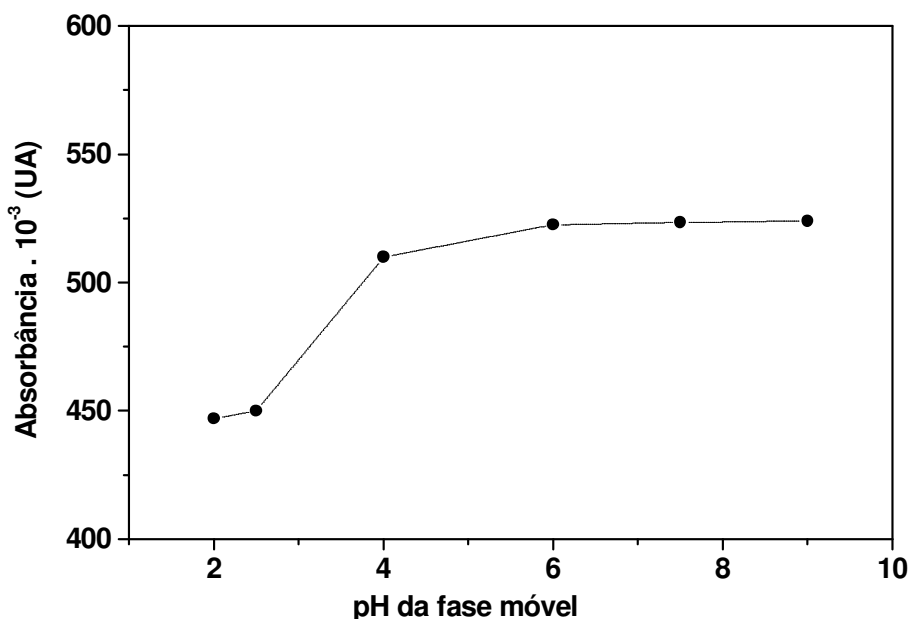


FIGURA 20- Efeito do pH da fase móvel na absorbância (280 nm) de SAH. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μ m), modo isocrático e fase móvel constituída de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 : H_2O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min^{-1} , volume de amostra: 100 μL e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

A variação da acidez da fase móvel demonstrou que em pH 2,00 e 2,50 (FIG. 19A) houve supressão em 15% na absorbância referente ao SAH (7,58 minutos) comparada ao observado em pH 7,50, ocorrendo perda de resolução dos picos em 4,35 e 6,51 minutos e aumento da instabilidade da linha base. Em pH 6,00; 7,50; e 9,00 (FIG. 19B, 20) não foi observada mudança significativa no perfil cromatográfico. Fase móvel em pH 7,50 demonstrou ser a melhor condição para análise de SAH.

Nas FIG. 21A e 21B estão apresentados os cromatogramas de 10 mg mL^{-1} de SAH, ao variar-se a temperatura do forno de coluna. A FIG. 21C apresenta o efeito da temperatura do forno de coluna na absorbância (280 nm) de SAH.

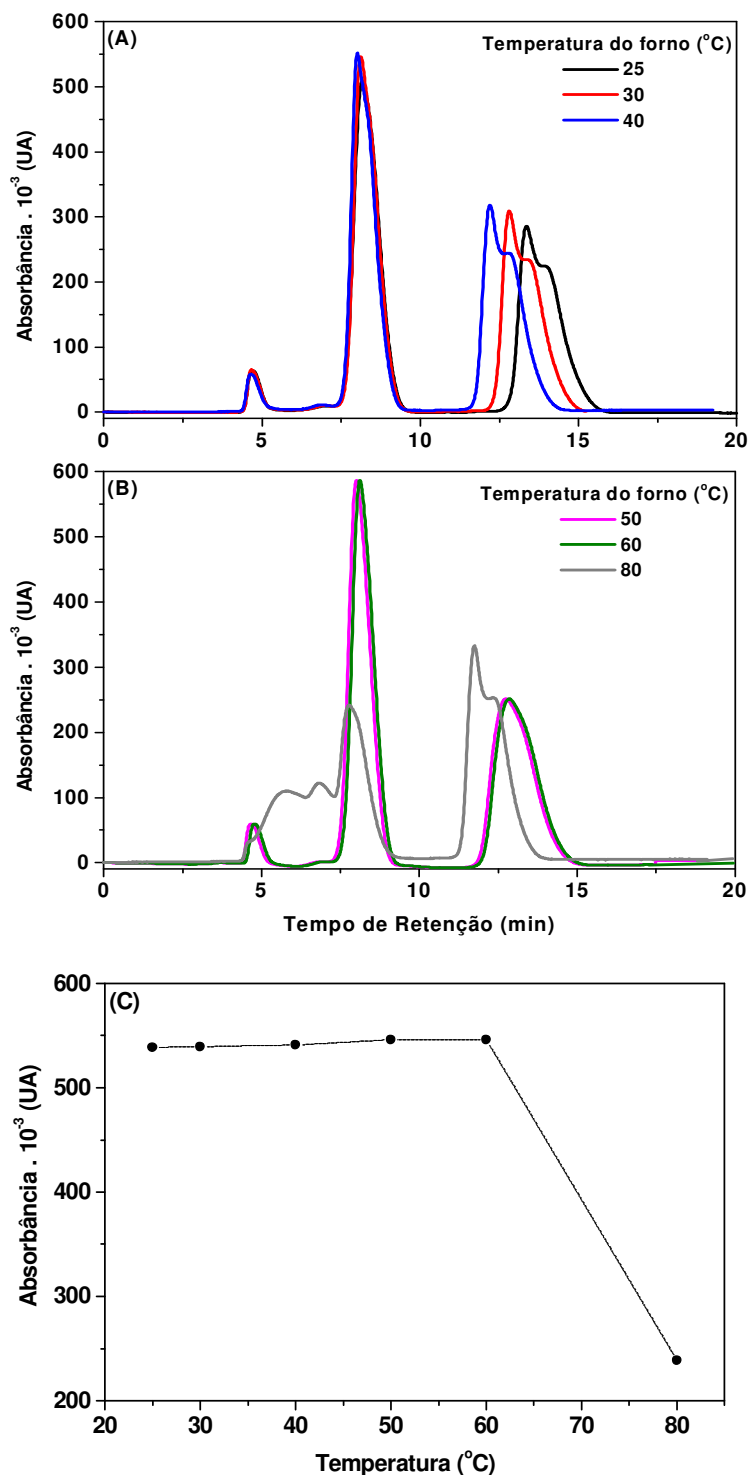


FIGURA 21- Cromatogramas de SAH 10 mg mL⁻¹ com a variação da temperatura do forno de coluna. **(A)** Temperaturas 25, 30 e 40 °C. **(B)** Temperaturas 50, 60 e 80 °C. **(C)** Efeito da temperatura do forno de coluna na absorbância (280 nm) de SAH. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 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 e pH da fase móvel: 7,50.

Observou-se alargamento de banda e aparecimento de picos secundários com baixa resolução em temperatura de 80 °C; em 50 °C e 60 °C ocorreram perda de resolução no pico com tempo de retenção de 12,5 minutos (FIG. 21B). A absorbância não variou significativamente nas análises entre 25 a 50 °C (FIG. 21A e 21C).

Snyder (57) descreveu em seu livro que um aumento de 1 °C na temperatura da coluna pode diminuir a retenção de alguns analitos por 1 a 2%. Essa mudança no fator de retenção (k) também pode resultar em mudanças na separação. Para o SAH, foi observada mudança de até 1,83% no tempo de retenção ao variar a temperatura de 25 a 40 °C. Variação de 55 °C (25 – 80 °C) diminuiu o tempo de retenção do SAH em 5,51%, com redução da absorbância (FIG. 21C) e do fator de separação (α), alterando a resolução dos picos. Efeito mais pronunciado ocorreu nos analitos que eluem após 10 minutos, com diminuição de até 12,20% no tempo de retenção.

O SAH é uma proteína. As proteínas são macromoléculas contendo um número elevado de aminoácidos. Estes estão ligados linearmente formando a estrutura primária e por estabelecerem outras ligações mais fracas entre as cadeias laterais originam estruturas secundárias e terciárias. Essas estruturas são mantidas por interações fracas e por isso são facilmente quebradas quando expostas ao calor ou ácidos ocasionando à perda da estrutura tridimensional o que se chama desnaturação. Portanto, a mudança do perfil cromatográfico para temperaturas elevadas pode estar relacionada ao processo de desnaturação, com formação de agregados de peso molecular maior (73).

Variação de coluna cromatográfica na análise de SAH foi realizada na condição B da TAB. 4 (página 44). A FIG. 22 apresenta o cromatograma de SAH em coluna de 300 mm (condição A) e 600 mm (condição B).

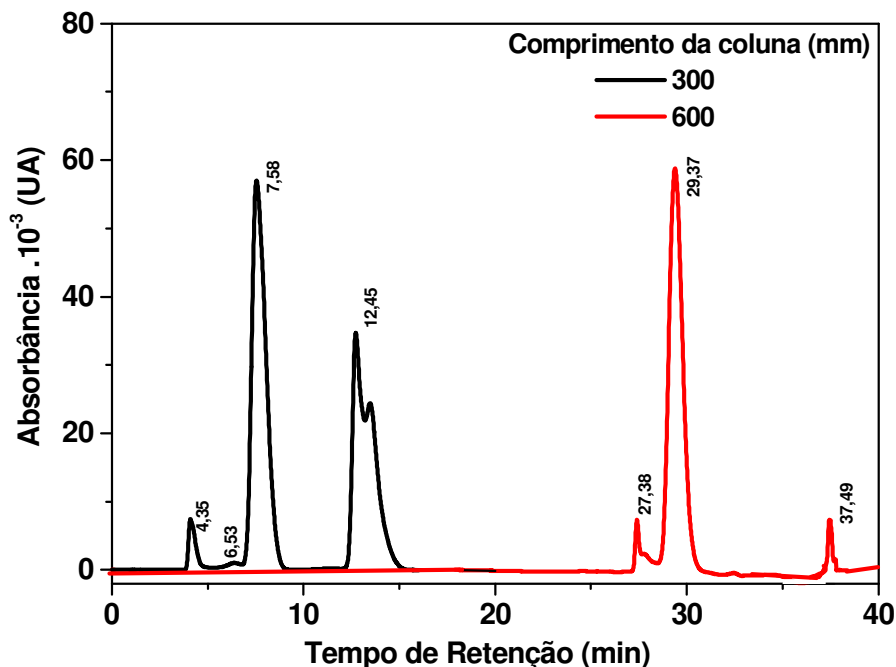


FIGURA 22- Cromatogramas de SAH 10 mg mL^{-1} com a variação do comprimento da coluna. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 : H_2O (50:50, v/v). Condição B: coluna TSKgel G3000SW (600 x 7,5 mm; 10 μm), fase móvel da condição A. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra: $100 \mu\text{L}$ e pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

O aumento no comprimento da coluna resultou em tempo maior de eluição de SAH (29,37 minutos). Picos em 4,35 e 6,53 minutos perderam resolução e foram coeluídos (27,38 minutos) ao trocar a coluna de 300 mm para 600 mm de comprimento. Pico em 12,45 minutos perdeu resolução apresentando-se em menor intensidade na coluna de 600 mm (37,49 minutos).

A coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 μm) apresentou melhor separação entre os analitos e foi utilizada para as análises de SAH.

O método desenvolvido, após a otimização das condições de análise, demonstrou-se adequado para análise de SAH em RL e SAH- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, obtendo-se separação dos picos de interesse e outros componentes da amostra.

5.4 Validação do método analítico para SAH e SAH-^{99m}Tc

5.2.1 Cromatogramas

A TAB. 6 apresenta as condições selecionadas para as análises das matérias-primas de SAH, RL de SAH e SAH marcado com ^{99m}Tc.

TABELA 6- Parâmetros otimizados para análise de SAH e SAH-^{99m}Tc.

Parâmetro	Condição
Coluna	Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm)
Modo de análise	Isocrático
Tempo de análise	10 minutos
Fase móvel	Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NaCl e NaN ₃ : H ₂ O (50:50, v/v)
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
pH da fase móvel	7,50
Volume de amostra injetada	100 µL
Temperatura do forno de coluna	25 °C

Os cromatogramas de SAH e RL de SAH estão apresentados na FIG. 23A e 23B, respectivamente. Os espectros de absorção de UV-Vis da SAH 10 mg mL⁻¹ e RL de SAH no intervalo de 230 a 400 nm estão apresentados na FIG. 24.

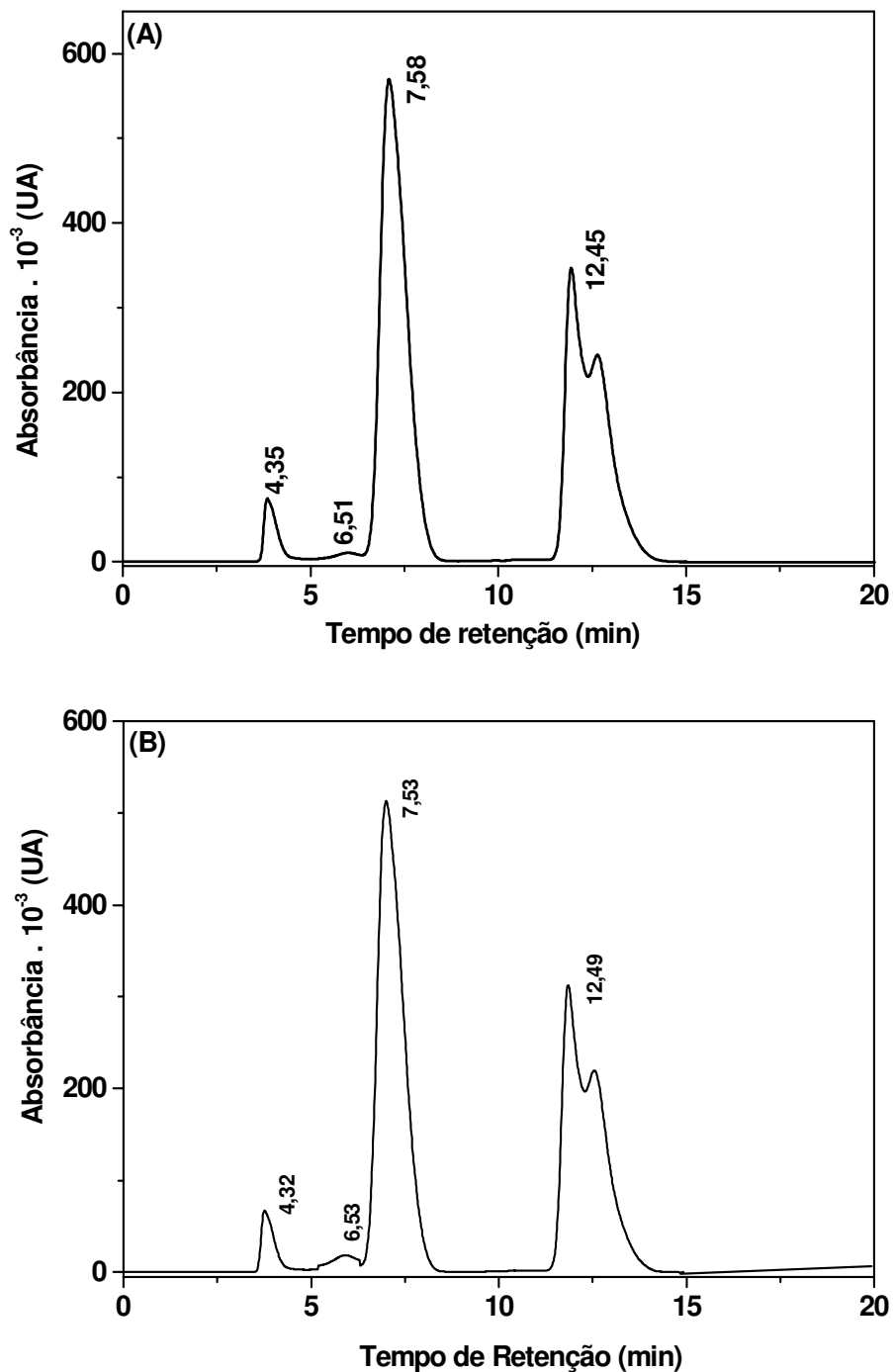


FIGURA 23- (A) Cromatograma de SAH 10 mg mL⁻¹. (B) Cromatograma de RL de SAH. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra: 100 µL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

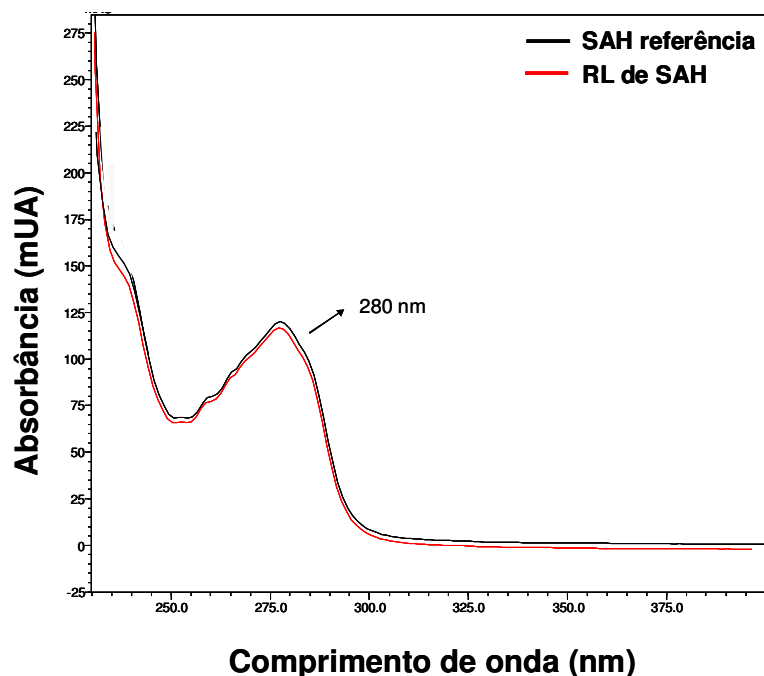


FIGURA 24- Espectros de UV-Visível de SAH 10 mg mL^{-1} e RL de SAH. Absorção em 280 nm. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; $10 \mu\text{m}$), modo isocrático e fase móvel constituída de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 : H_2O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra: $100 \mu\text{L}$, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A TAB. 7 apresenta os tempos de retenção correspondentes aos analitos. Foi utilizada solução de SAB (soro albumina bovina) para determinação do tempo de retenção referente ao monômero de massa molecular 69 kDa e ao dímero (138 kDa).

TABELA 7- Tempos de retenção dos analitos nos cromatogramas de SAH.

Amostra	Tempo de Retenção (minutos)			
	Monômero	Dímero	Agregados	Estabilizante
SAH	7,58	4,35	6,51	12,45
RL de SAH	7,53	4,32	6,53	12,48

Pode-se observar pela TAB. 7 que o tempo de retenção dos analitos na solução de referência e no RL são próximos. O agente estabilizante (triptofana) de baixa massa molecular eluiu em 12,45 minutos.

A distribuição molecular encontrada para o SAH referência foi de 91,86% de monômeros, 5,93% de dímero e 2,21% de agregados. Em um lote de RL SAH analisado, foram encontrados 86,52% de monômeros, 9,09% de dímero e 4,38% de agregados.

Segundo o método de análise para SAH recomendado pela ANVISA (46), a área correspondente ao monômero e dímero não deve ser inferior a 95% do total, enquanto que polímeros e agregados não devem ultrapassar 5% da área total. Portanto, o resultado de % de SAH e agregados no RL atende às especificações.

Tanaka e colaboradores (74) constataram aumento na porcentagem de dímeros nas soluções de SAH 20% (0,7% para 1,8%) e uma queda na concentração de monômero (99,0% para 98,2%) após dois anos de estocagem. Sviridov e colaboradores (75) também observaram a presença de dímeros e agregados em estudos para quantificar albumina em amostra de urina de pacientes saudáveis e diabéticos.

O cromatograma do SAH-^{99m}Tc é apresentado na FIG. 25. Os analitos encontrados e seus respectivos tempos de retenção estão relacionados na TAB. 8.

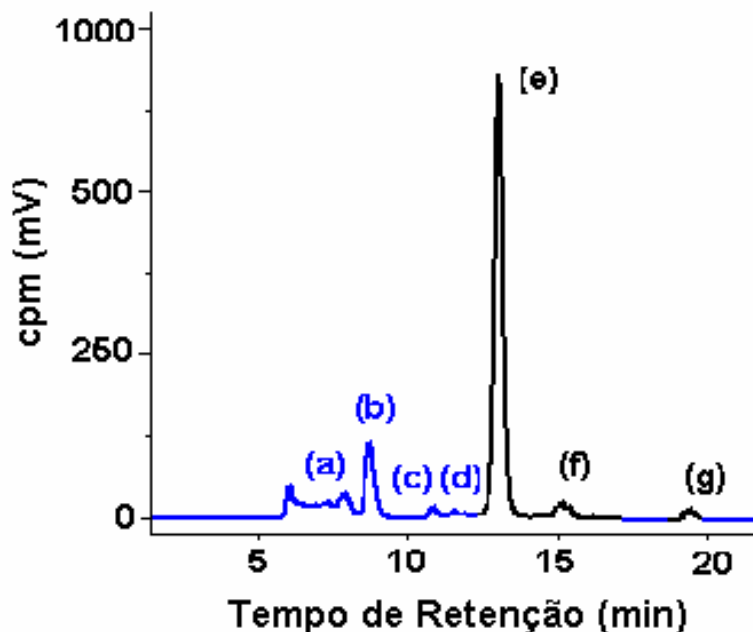


FIGURA 25- Cromatograma de SAH-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Identificação dos analitos na TAB. 8. Condição A: coluna Protein-Pack 300SW (300 x 7,5 mm; 10 µm), modo isocrático e fase móvel constituída de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NaN₃: H₂O (50:50, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra: 100 µL, pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

TABELA 8- Identificação dos analitos observados no cromatograma de SAH-^{99m}Tc.

Pico	Analito	Tempo de retenção (minutos)
(a)	Poli MM alta ^(*)	8,71
(b)	Dímero SAH- ^{99m} Tc	9,25
(c)	SAH poli-II	11,44
(d)	SAH poli-I	12,58
(e)	Monômero SAH- ^{99m} Tc	14,48
(f)	Sn- ^{99m} Tc	15,21
(g)	^{99m} TcO ₄ ⁻	18,91

^(*) MM: massa molecular

O analito representado por (a) corresponde aos compostos de massa molecular alta, superior 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 (76). Os analitos (c) e (d) representam agregados de massa molecular intermediária entre o dímero e o monômero de SAH marcado com ^{99m}Tc (e). Estanho coloidal (Sn-^{99m}Tc) foi identificado pela injeção do RL de Sn e comparação com o tempo de retenção. O pico (g) foi identificado pela adição de Na^{99m}TcO₄.

As análises por CLAE mostraram eficiência de marcação média da SAH-^{99m}Tc de (97,28 ± 0,09)%. Este método mostrou-se importante para aplicação no controle de qualidade, na determinação da pureza radioquímica, pela rapidez e capacidade em determinar as formas poliméricas que estão sendo marcadas, juntamente com o produto principal. Assim, a pureza radioquímica determinada por CLAE é referente apenas ao monômero marcado com tecnécio-99m. O tempo de análise por CLAE é inferior a outras técnicas.

Comparou-se o método por CLAE com o método por CCD, para determinação de pureza radioquímica em SAH marcado com tecnécio-99m, descrito na Farmacopéia Européia (37). O método CCD apenas exclui a porcentagem de impureza ^{99m}TcO₄⁻, e o resultado de pureza radioquímica é a soma de todas as formas poliméricas marcadas. A pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc foi (98,14 ± 0,20)% e (98,06 ± 0,22)% para CLAE e (99,95 ± 0,02)% e (99,96 ± 0,02)% para CCD, após 30 e 240 minutos de marcação, respectivamente. A diferença entre os métodos foi 1,90%.

Müller (23) realizou estudos comparativos entre CLAE e cromatografia em coluna para RL de SAH-^{99m}Tc. Três frações, poli-I, poli-II e poli-III, foram detectadas somente por CLAE. Estas frações de massa molecular maiores que o monômero de SAH podem ser, segundo Vallabhajosula (76), resultado da dimerização e polimerização da albumina.

Verbeke e colaboradores (55) estudaram um método alternativo para análise de SAH-^{99m}Tc. Substituíram a coluna cromatográfica por uma FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), e puderam observar que ^{99m}TcO₄⁻ não eluiu da

coluna FPLC, enquanto na coluna de CLAE a eluição da impureza ocorreu com tempo de retenção de 25 minutos.

5.3.2 Parâmetros de validação

Para avaliar a seletividade do método, em 3 pontos diferentes do pico (início, topo e fim) referente ao SAH (FIG. 23), foram avaliados os espectros registrados pelo detector DAD. Os espectros se sobrepuseram, demonstrando a pureza dos picos (superior a 98,99%) e confirmando a seletividade do método. Não foi verificada a presença de interferentes que pudessem comprometer a quantificação do monômero de SAH por eluir na região de interesse.

Os gráficos de 3 curvas analíticas de SAH (experimentos 1, 2, 3) estão representados na FIG. 26.

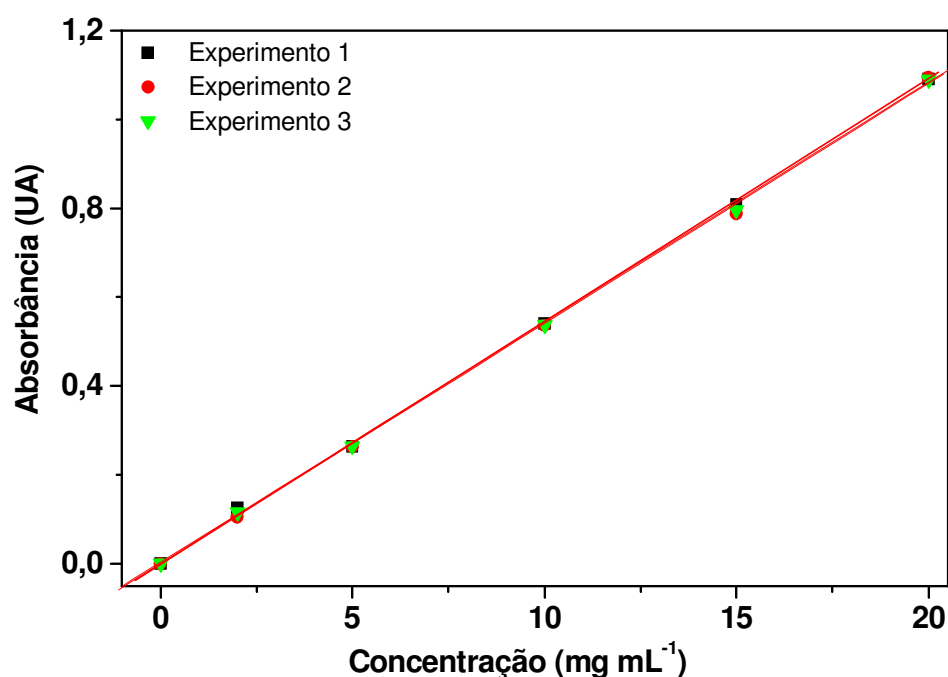


FIGURA 26- Curvas analíticas de SAH na faixa de concentração 0- 20 mg mL⁻¹ ($\lambda = 280$ nm).

O método mostrou-se linear no intervalo de concentração de 0– 20 mg mL⁻¹ (FIG. 26). A curva analítica pode ser representada pela equação $Abs = a [SAH] + b$, onde os valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de correlação (r^2) estão apresentados na TAB. 9.

TABELA 9- Parâmetros das curvas analíticas para o SAH.

Experimento	n	a	b	r^2
1	6	0,0523	0,0039	0,9998
2	6	0,0512	0,0040	0,9995
3	6	0,0526	0,0041	0,9996

n: número de amostra; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r^2 : coeficiente de correlação.

Observou-se que o coeficiente de correlação (r^2) de todos os experimentos foi no mínimo igual a 0,999, superior ao critério mínimo aceitável pela ANVISA (4) ($r^2 = 0,99$), indicando baixa dispersão dos dados experimentais.

Os resultados dos ensaios de precisão do método (expresso como DPR) e exatidão intradia para os experimentos 1, 2 e 3 estão apresentados nas TAB. 10, 11 e 12, respectivamente.

TABELA 10- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 1.

CT (mg mL ⁻¹)	CMD ± DP (mg mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
2	2,13 ± 0,02	0,94	106,50
5	4,98 ± 0,01	0,20	99,60
10	10,21 ± 0,12	1,18	102,10
15	15,15 ± 0,21	1,39	101,00
20	20,57 ± 0,05	0,23	102,85

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 11- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 2.

CT (mg mL⁻¹)	CMD ± DP (mg mL⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
2	1,97 ± 0,02	1,02	98,50
5	5,07 ± 0,03	0,59	101,40
10	10,09 ± 0,13	1,29	100,90
15	15,29 ± 0,23	1,50	101,93
20	20,31 ± 0,03	0,15	101,55

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 12- Precisão (DPR) e exatidão intradia de SAH no experimento 3.

CT (mg mL⁻¹)	CMD ± DP (mg mL⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
2	2,09 ± 0,10	4,78	104,50
5	4,95 ± 0,23	4,65	99,00
10	10,19 ± 0,09	0,88	101,90
15	15,29 ± 0,19	1,24	101,93
20	20,26 ± 0,09	0,44	101,30

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

As curvas analíticas de quantificação de SAH apresentaram precisão intradia entre 0,15 e 4,78%. Os valores de precisão expressos como DPR (TAB. 10, 11 e 12) estão dentro dos critérios aceitáveis (DPR ≤ 5%) (4). A exatidão obtida situa-se no intervalo de 98,50 a 106,50%.

Os resultados do ensaio de precisão e exatidão interdia do método estão apresentados na TAB. 13.

TABELA 13- Precisão (DPR) e exatidão interdia de SAH.

CT (mg mL⁻¹)	CMD ± DP (mg mL⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
2	1,96 ± 0,07	3,57	98,00
5	5,01 ± 0,17	3,39	100,20
10	10,16 ± 0,34	3,35	101,60
15	15,04 ± 0,13	0,86	102,27
20	20,38 ± 0,17	0,83	101,90

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

Os resultados na TAB. 13 mostraram que a precisão intermediária (interdia) variou entre 0,83 e 3,57%. Os valores de exatidão obtidos estão no intervalo 98,00- 102,27%. Valores de precisão superiores a 3% foram obtidos para concentrações baixas, indicando maior dispersão dos resultados, quando comparados às concentrações mais elevadas e com os resultados das análises realizadas no mesmo dia (intradia).

O valor encontrado para SAH no RL foi de 8,95 mg. A diferença observada em relação ao descrito na bula (10,00 mg) pode ser atribuída à marcação de agregados de massa molecular intermediária entre a forma monomérica de SAH e o dímero.

Os dados da recuperação das soluções referência adicionadas às amostras de RL de SAH pelo método CLAE podem ser observados na TAB. 14.

TABELA 14- % Recuperação em amostras de RL de SAH.

SAH adicionado (mg mL⁻¹)	Recuperação (mg mL⁻¹)^(*)	Recuperação (%)	DPR (%)
2,50	2,36	94,40	4,71
5,00	4,91	98,20	4,03
10,00	9,94	99,40	3,54

(*) Média de triplicata em cada nível

Os valores de recuperação variaram de 94,40 a 99,40 % com DPR entre 3,54 e 4,71%.

O limite de detecção (LD) calculado foi de 5,77 µg mL⁻¹ e limite de quantificação (LQ) foi de 19,23 µg mL⁻¹. Os resultados mostraram que o método é sensível em detectar e quantificar SAH, cuja concentração seja igual ou superior a 5,77 µg mL⁻¹ e 19,23 µg mL⁻¹, respectivamente.

A estabilidade foi analisada através do cálculo de pureza radioquímica do SAH-^{99m}Tc após três e seis meses da data de fabricação do RL. Os resultados de pureza radioquímica obtidos pelo método CLAE e CCD (tempo de reação de 30 minutos) estão apresentados na TAB. 15.

TABELA 15- %Pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc determinadas nos estudos de estabilidade.

Método	(PRq ± DP)%		
	Data da fabricação	3 meses	6 meses
CLAE	98,14 ± 0,20	97,02 ± 0,14	96,98 ± 0,20
CCD	99,95 ± 0,02	99,34 ± 0,11	99,05 ± 0,16

PRq: pureza radioquímica DP: desvio padrão

A pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc (TAB. 15) em ambos os métodos são superiores a 96%.

Diferença máxima de 2,32% foi observada entre o método CLAE e CCD após três meses de fabricação. A pureza radioquímica pelo método CCD não variou no período analisado. Isso pode ser atribuído ao fato do método CCD não identificar a presença de formas poliméricas. A pureza radioquímica determinada pelo método CLAE variou em 1,16%, durante o período avaliado. A variação pode ser atribuída ao aumento na porcentagem de dímero (9,09% para 9,16%), 0,07 durante o período de estudo. Girard e colaboradores (72) observaram em seus estudos com SAH que as condições de armazenamento podem favorecer a polimerização.

5.5 Otimização das condições de análise por CLAE para EC e EC-^{99m}Tc

Para a determinação simultânea e validação do método analítico de EC-^{99m}Tc, ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ por CLAE em radiofármacos, as condições C, D, E, F e G da TAB. 4. (página 44) foram avaliadas.

Nas FIG. 27 e 28 são apresentados os cromatogramas de EC-^{99m}Tc e as impurezas ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻, adicionadas no EC-^{99m}Tc, nas condições C e D, respectivamente.

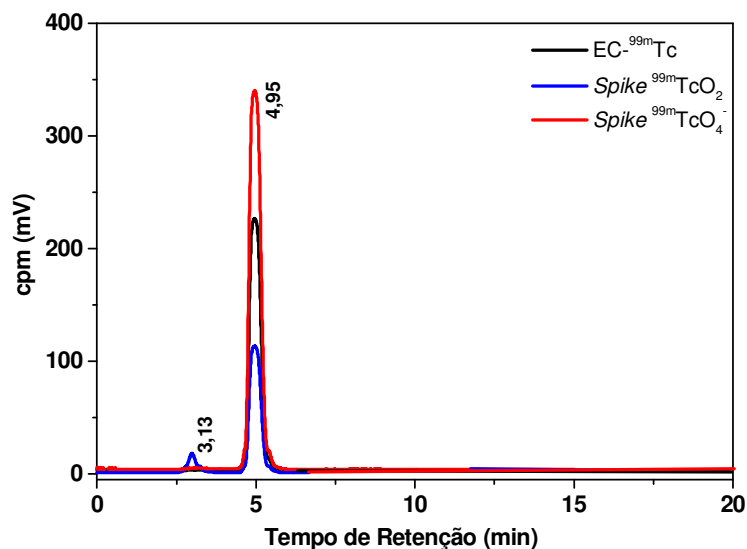


FIGURA 27- Cromatogramas de EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição C: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,05 mol L⁻¹, pH 2,50): C₂H₅OH, (80:20 v/v). Fluxo de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.

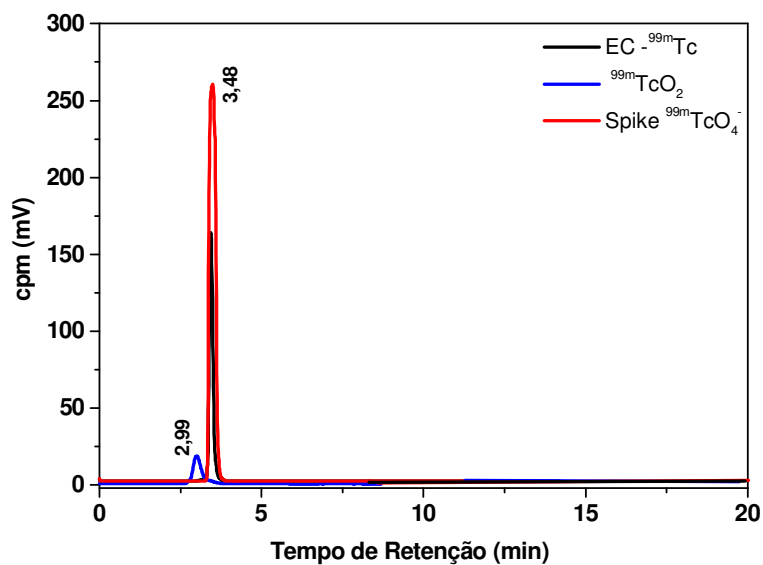


FIGURA 28- Cromatogramas de EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição D: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: PIC B5 0,2%:

C₂H₅OH, (80:20, v/v). Fluxo de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Observou-se que ao se adicionar ^{99m}TcO₄⁻ (*spike*) em EC-^{99m}Tc não houve separação do produto marcado e da impureza ^{99m}TcO₄⁻ na condição C, ocorrendo coeluição em tempo de retenção de 4,95 minutos (FIG. 27). A impureza ^{99m}TcO₂ apareceu em 3,13 minutos, não interagindo com a fase estacionária da coluna, pois para as condições avaliadas, o tempo morto ($t_M = (\pi r^2 C / 2) \times \text{fluxo}$; onde r= raio interno da coluna; C= comprimento da coluna; fluxo da fase móvel) (52) – tempo de eluição de um analito não retido - é de 3,11 minutos.

Na condição D foram observados resultados similares, porém houve um decréscimo de aproximadamente 30% do tempo de retenção de EC-^{99m}Tc e de ^{99m}TcO₄⁻ e de 5% para ^{99m}TcO₂, com menor resolução entre os picos (FIG. 28).

Segundo Bidlingmeyer e colaboradores (58), a redução do tempo de retenção pode ser explicada pela presença do reagente de interação iônica pentanosulfonato de sódio (PIC B5) na fase móvel. O PIC B5, carregado negativamente, é adsorvido na fase estacionária e cria uma camada de íons carregados negativamente na superfície da fase reversa (camada primária). Íons carregados positivamente (contra-íon sódio Na⁺) formam uma segunda camada iônica (camada secundária). Com a passagem do eluente contendo os analitos da amostra os íons carregados negativamente (EC-^{99m}Tc e ^{99m}TcO₄⁻) tendem a sofrer repulsão eletrostática da camada primária de maneira que são eluídos rapidamente pela fase móvel.

Bidlingmeyer e colaboradores (58) observaram o comportamento de moléculas neutras diante da presença de reagente de interação iônica. Homólogos neutros não tiveram os tempos de retenção modificados em análises com a utilização de octanosulfonato de sódio (PIC B8) na fase móvel, quando comparados com análises na ausência desse reagente.

^{99m}TcO₂ foi eluído em 2,99 minutos, implicando em tempo de retenção menor que o t_M, o que sugere diminuição do t_M da coluna. Bidlingmeyer e colaboradores (58) verificaram que a adsorção do reagente de interação iônica na

fase estacionária aumenta ligeiramente o volume desta e assim acarreta em diminuição do t_M da coluna.

Nas FIG. 29, 30 e 31 estão apresentados os cromatogramas do $EC-^{99m}Tc$ e das impurezas $^{99m}TcO_2$ e $^{99m}TcO_4^-$ adicionadas ao $EC-^{99m}Tc$ nas condições E, F e G, respectivamente.

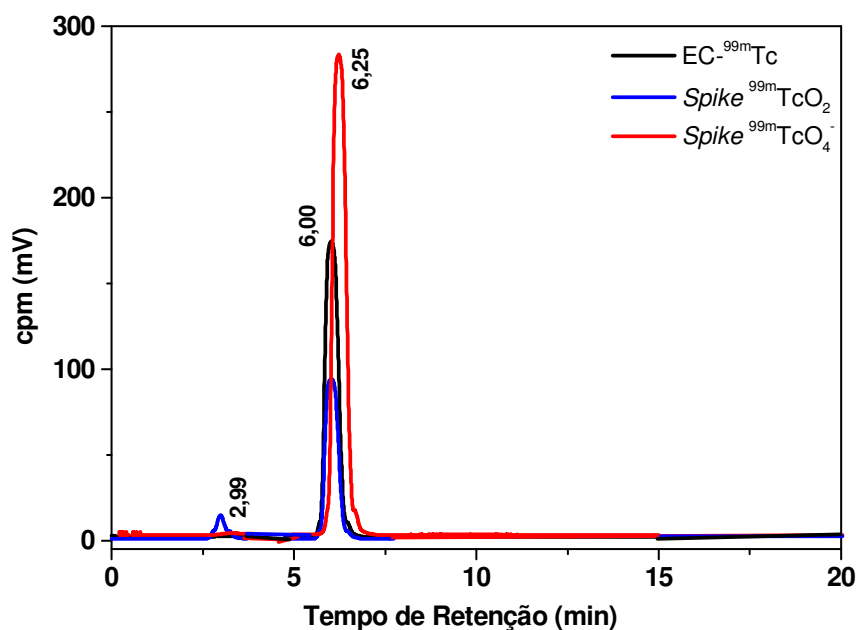


FIGURA 29- Cromatogramas do $EC-^{99m}Tc$, $EC-^{99m}Tc$ adicionado de $^{99m}TcO_2$ e $EC-^{99m}Tc$ adicionado de $^{99m}TcO_4^-$. Concentração radioativa: $55,0\text{ MBq mL}^{-1}$. Condição E: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel PIC A 0,2%: C_2H_5OH , (80:20, v/v). Fluxo de $0,4\text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL ; temperatura do forno de coluna: 25 $^{\circ}\text{C}$.

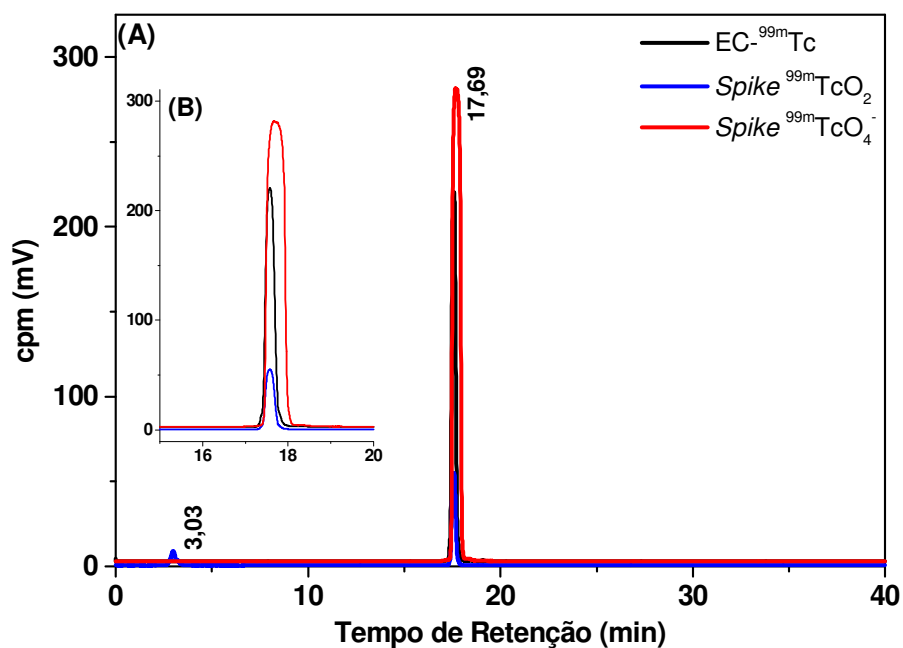


FIGURA 30- (A) Cromatogramas do EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. (B) Ampliação do intervalo de 15 – 20 minutos. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição F: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: PIC A 0,2%: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.

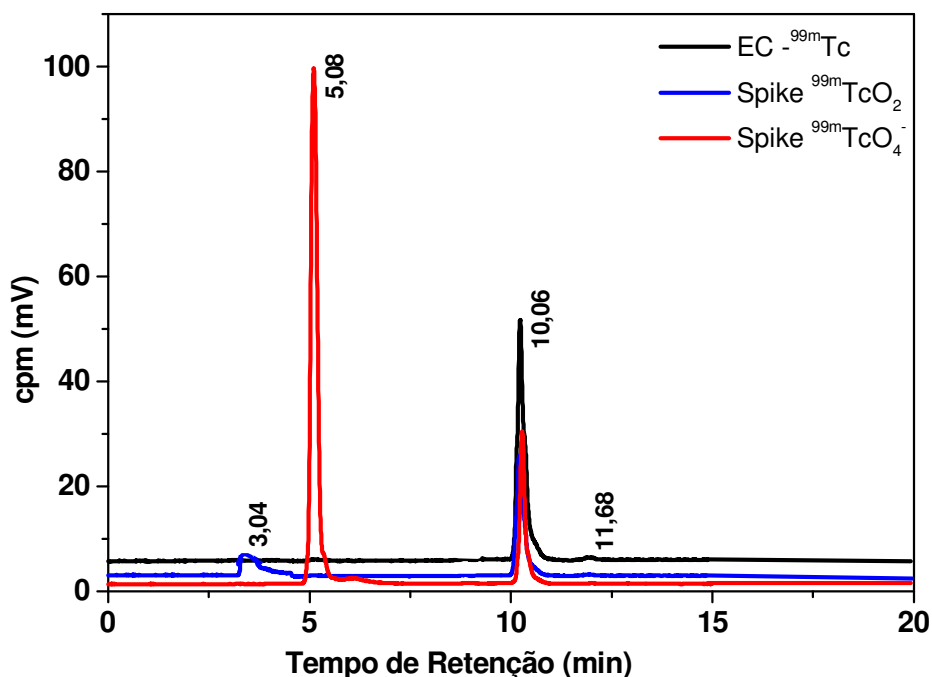


FIGURA 31- Cromatogramas do EC-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₂ e EC-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹, pH 2,50): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 10 μL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Na FIG. 29 pode-se observar que houve aumento na retenção de EC-^{99m}Tc e ^{99m}TcO₄⁻, comparado às condições C e D, porém com separação entre ambos picos de aproximadamente 4%, o que equivale a uma resolução de 0,21

(resolução = $(2 t_{rb} - t_{rA}) / w_A + w_B$; onde t_r = tempo de retenção; w = largura do pico) (52) desejável: $>1,5$) e sobreposição de 60%. O efeito do pareador iônico na fase móvel afetou ambas as espécies e não interferiu na retenção de $^{99m}\text{TcO}_2$. Esta condição (análise no modo isocrático) não foi adequada para separar os componentes da amostra.

Análises no modo gradiente linear, mantendo-se a mesma fase móvel (FIG. 30), não permitiram a separação entre $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$, causando aumento na retenção de ambas espécies, em aproximadamente 86%.

Jankowsky e colaboradores (51) determinaram a constante de dissociação (pK_a) do $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ por eletroforese capilar. O valor determinado foi de 2,90 para o grupo carboxil. Isto pode explicar a desprotonação dos grupos carboxil em pH básico tornando-o um complexo aniônico. $^{99m}\text{TcO}_4^-$, também aniônico, apresentou comportamento semelhante ao $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ na presença do PIC A - pareador catiônico. O mecanismo de interação, segundo Knox e colaboradores (77), pode ser explicado pela formação de um par iônico que se torna menos hidrofóbico e interage mais fortemente com a fase estacionária da coluna de fase reversa, aumentando o tempo de retenção.

Na ausência de PIC A na fase móvel (condição G) (FIG. 31), ocorreu separação entre os picos e a detecção de uma possível forma isomérica não detectada por outros sistemas anteriormente utilizados. Assim, a condição G foi a que apresentou melhores resultados, permitindo a separação das espécies presentes na amostra e foi utilizada para realizar os estudos de robustez (variação do fluxo da fase móvel, volume de amostra injetada, pH da fase móvel e temperatura do forno de coluna).

Nas FIG. 32 estão apresentados os cromatogramas de $\text{EC } 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ com a variação do fluxo da fase móvel. Os resultados obtidos pela variação de fluxo da fase móvel na absorbância e na largura do pico à meia altura estão apresentados nas FIG. 33A e 33B, respectivamente.

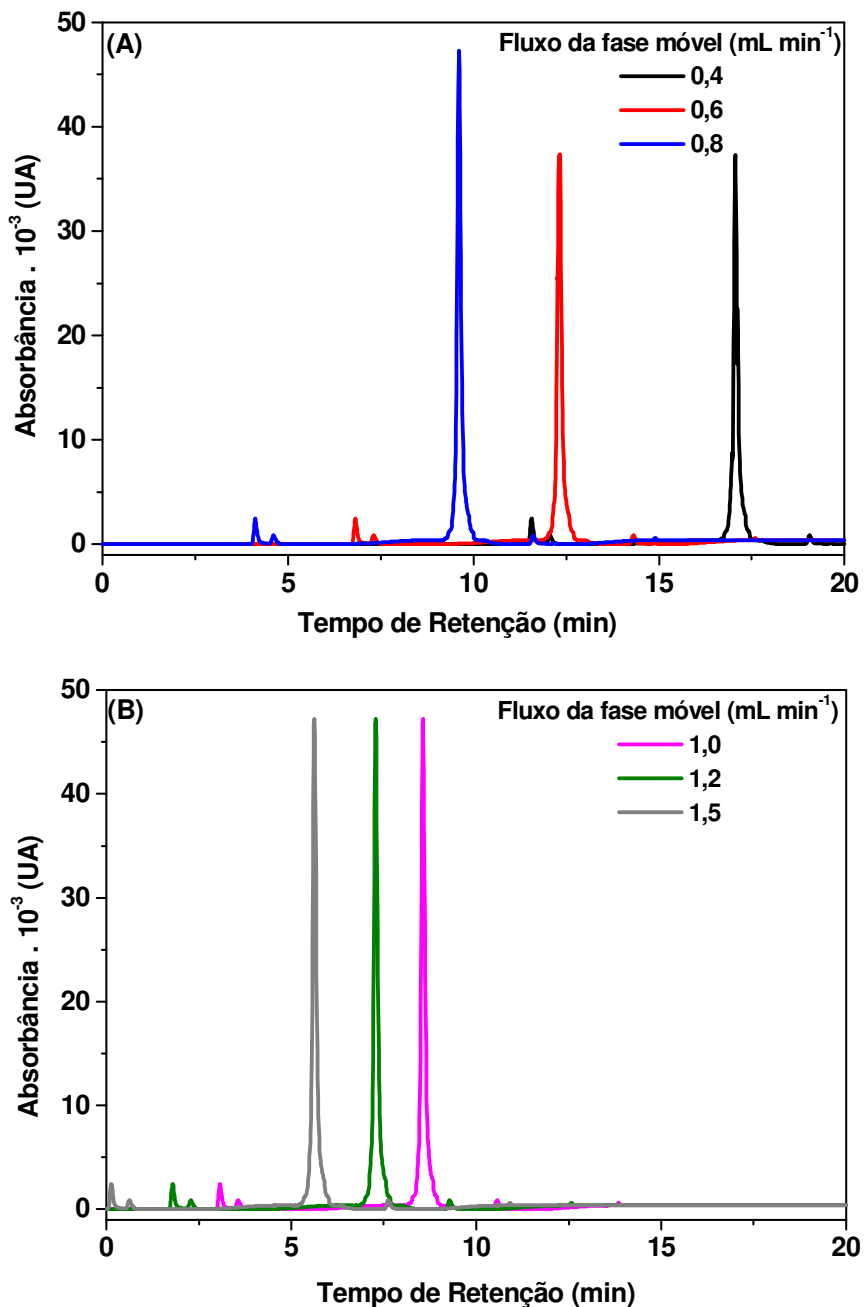


FIGURA 32- Cromatogramas de EC 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com a variação de fluxo da fase móvel. **(A)** Fluxos 0,4; 0,6 e 0,8 mL min^{-1} . **(B)** Fluxos 1,0; 1,2 e 1,5 mL min^{-1} . Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 (0,0125 mol L^{-1}): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

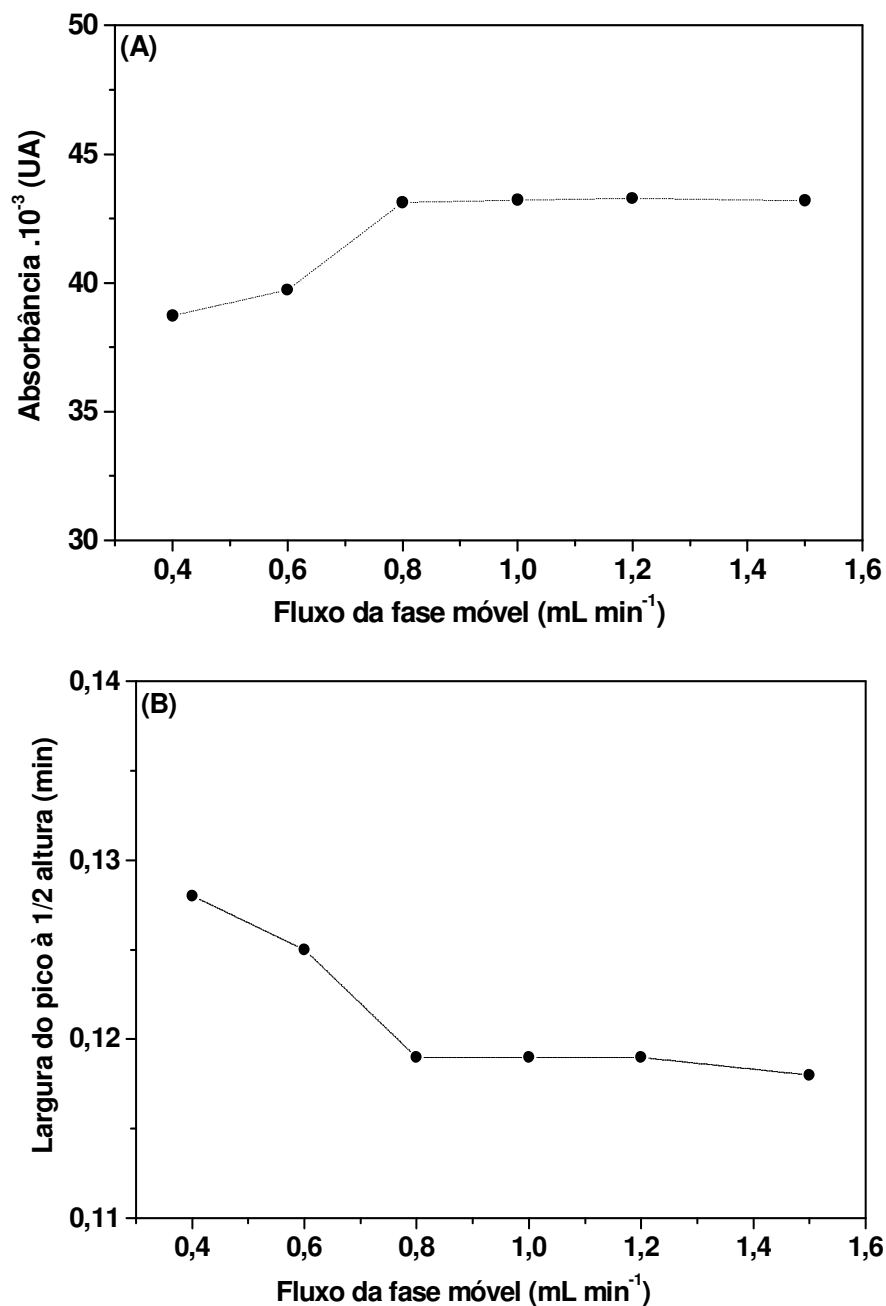


FIGURA 33- Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorbância (265 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 μ L; pH da fase móvel: 7,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Pode-se observar que fluxo de 0,4 e 0,6 mL min⁻¹ reduziram a absorvância no pico de EC (pico de máxima absorvância) em 12% em relação a fluxos acima de 0,8 mL min⁻¹ (FIG. 32A e 33A). A largura do pico a meia altura ficou menor em 7% para fluxos no intervalo 0,8- 1,5 mL min⁻¹ (FIG. 33B). A condição de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ foi escolhida para analisar EC e EC-^{99m}Tc.

O efeito do volume de amostra injetada no cromatograma de EC 500 µg mL⁻¹, na absorvância (265 nm) e na largura do pico à meia altura estão representados nas FIG. 34, 35A e 35B.

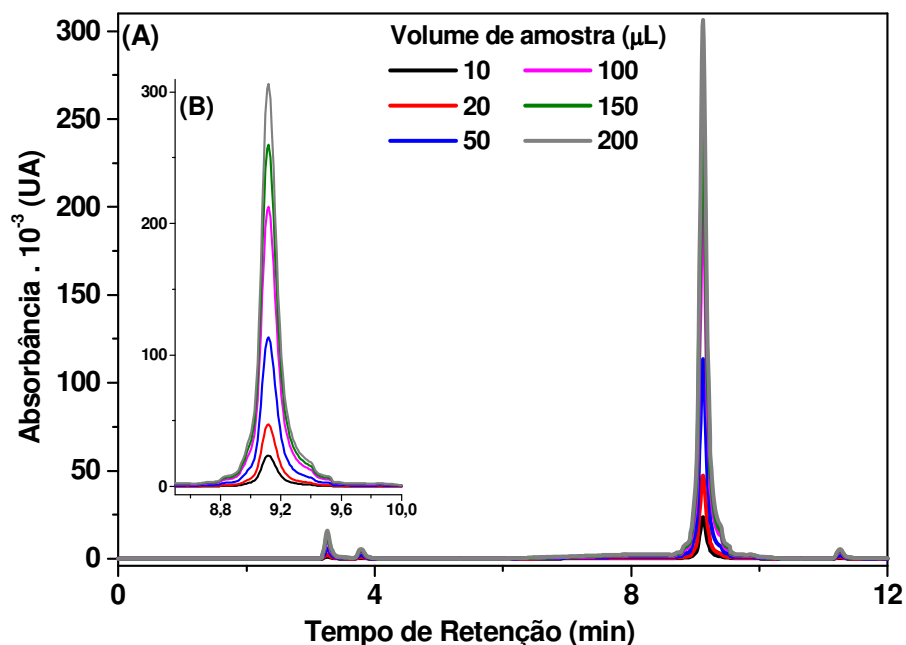


FIGURA 34- (A) Cromatogramas de EC 500 µg mL⁻¹ com a variação do volume de amostra. (B) Ampliação do intervalo 8,5- 10,0 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

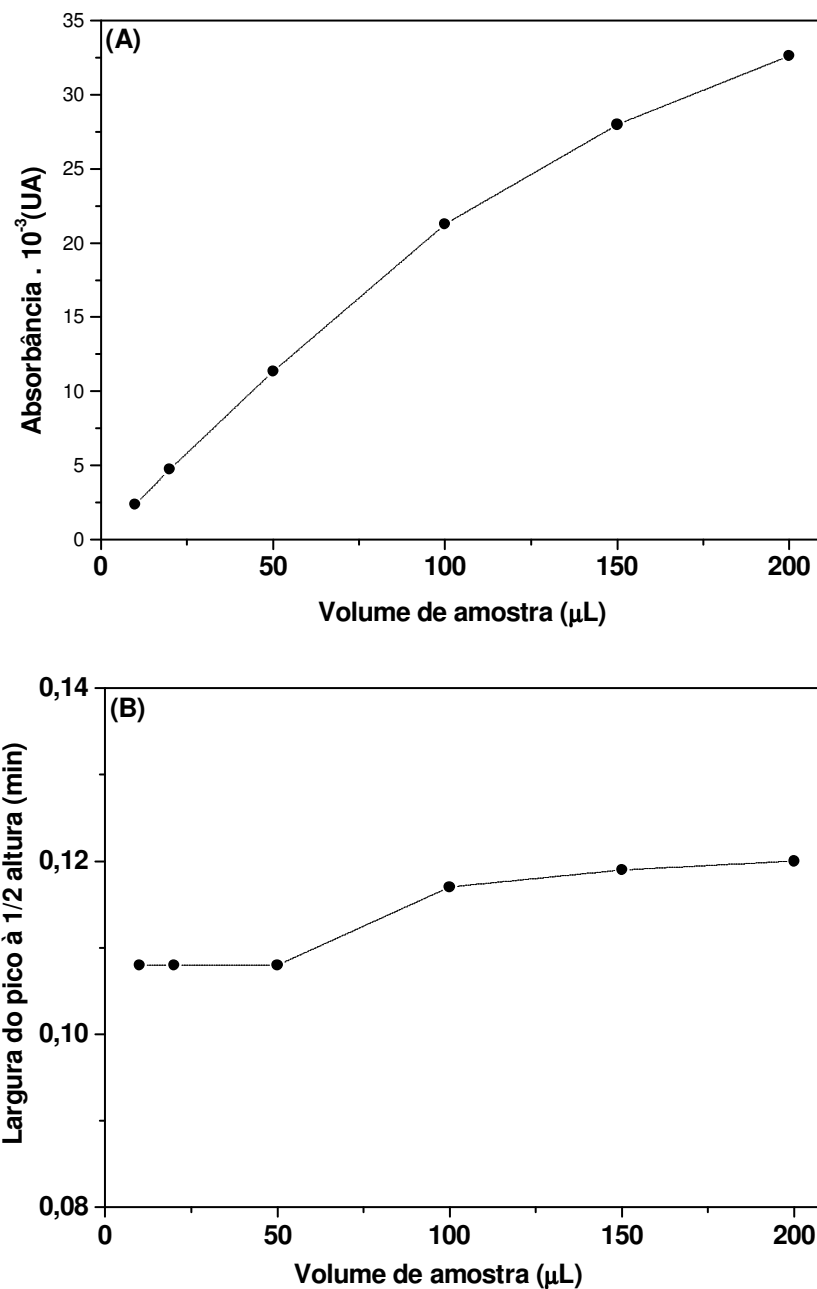


FIGURA 35- Efeito do volume de amostra **(A)** na absorbância (265 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

A absorvância foi linearmente dependente do volume de amostra injetada até 100 μL . Alargamento de pico foi maior para volumes acima de 50 μL (3%). O volume de amostra de 20 μL demonstrou ser o mais adequado para a validação do método.

Para verificar o efeito da acidez da fase móvel na análise de EC, o pH da fase móvel (tampão fosfato 0,0125 mol L^{-1}) foi alterado. Os cromatogramas de EC 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em função do pH da fase móvel e o efeito do pH da fase móvel no tempo de retenção e na absorvância do EC em 265 nm estão apresentados nas FIG. 36, 37A e 37B, respectivamente.

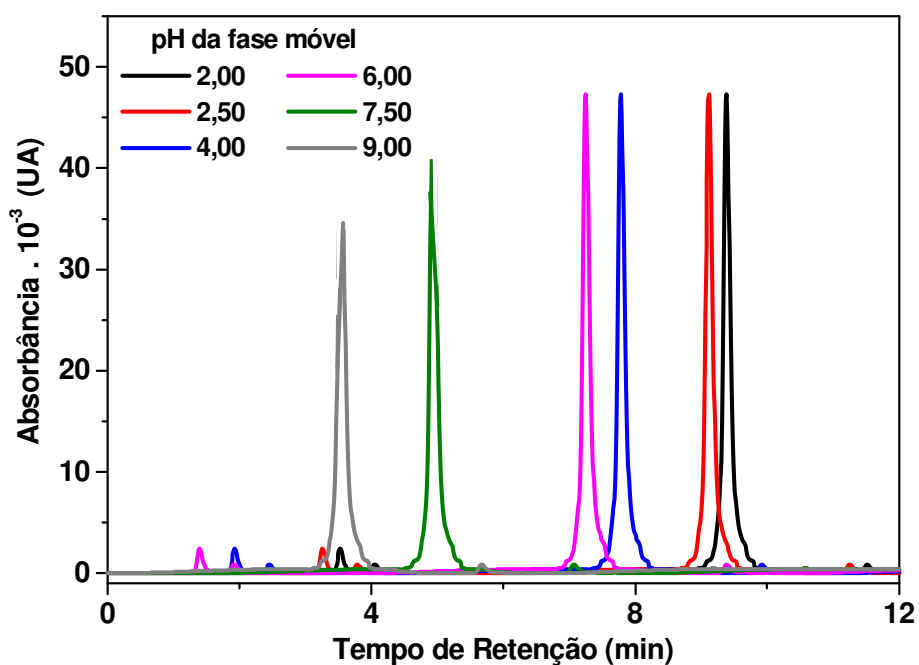


FIGURA 36- Cromatogramas de EC 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com a variação de pH da fase móvel. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 (0,0125 mol L^{-1}): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 20 μL e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

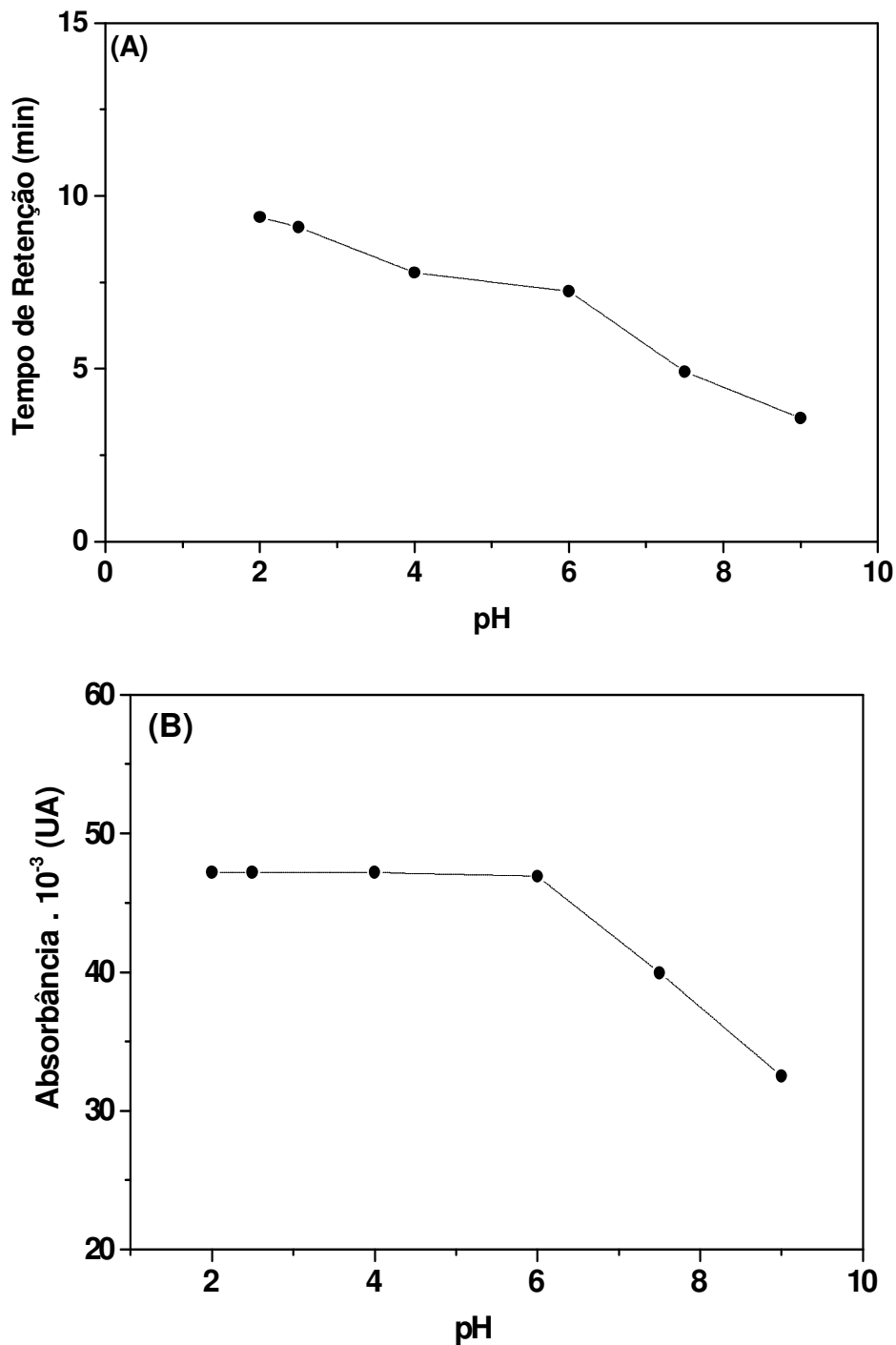


FIGURA 37- Efeito do pH da fase móvel **(A)** no tempo de retenção de EC e **(B)** na absorbância (265 nm). Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Ocorreu redução no tempo de retenção do EC com o aumento do pH (FIG. 36 e 37A). Para pH 2,00, o EC foi eluído em 9,12 minutos enquanto em pH 9,00 a eluição ocorreu em 3,55 minutos (redução de 39%), acarretando diminuição da absorbância em 28% (FIG. 37B).

Mang'era e colaboradores (78) estudaram o efeito do pH da fase móvel no tempo de retenção do complexo EC-^{99m}Tc. As análises foram realizadas na faixa de pH 2,63 a 6,85. Os resultados obtidos mostraram que o EC-^{99m}Tc eluiu rapidamente da coluna com o aumento de pH da fase móvel. O fato foi atribuído a um maior grau de ionização e maior hidrofiliçidade para o complexo com o aumento do pH do solvente.

Marzilli e colaboradores (79) descreveram que durante titulação potenciométrica em água, EC marcado com rênio (EC-Re) apresentou valores de pKa de 3,8; 6,64 e 10,20. Utilizando cristalografia, eles encontraram que esses valores de pKa correspondiam a desprotonação dos grupos carboxil, amina (*anti*-) e amina (*sin*), respectivamente. Sendo a química de complexação do rênio similar a do tecnécio, a desprotonação sugerida por Manzilli e colaboradores (79) pode explicar a menor retenção do EC na fase estacionária hidrofóbica. A amostra foi preparada em meio alcalino, que favorece a desprotonação.

O pH da fase móvel escolhido para a realização das análises de EC no RL e EC-^{99m}Tc foi 2,50.

Nas FIG. 38 e 39 estão representados o efeito da temperatura nas análises de EC 500 µg mL⁻¹.

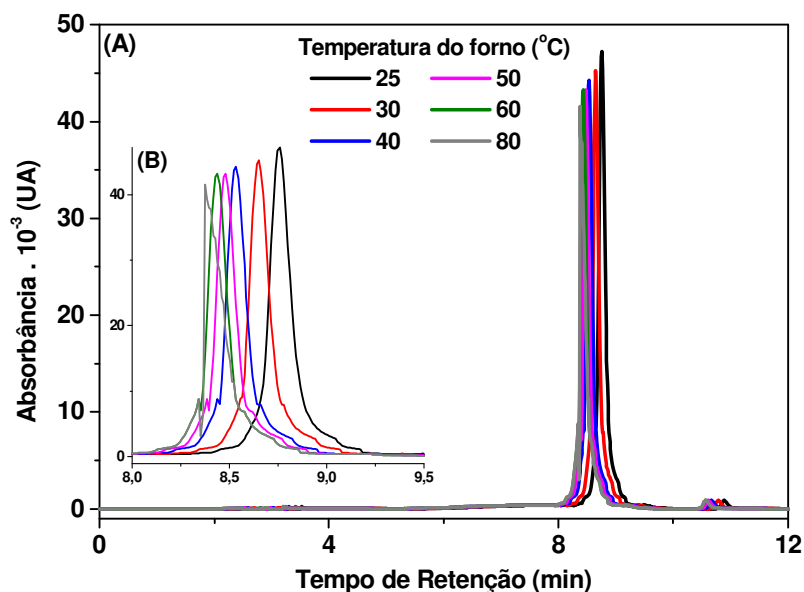


FIGURA 38- (A) Cromatogramas de EC $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ com a variação da temperatura do forno de coluna. (B) Ampliação do intervalo 8,0- 9,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$); fase móvel: Na_2HPO_4 ($0,0125 \text{ mol L}^{-1}$): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: $20 \mu\text{L}$ e pH da fase móvel: 2,50.

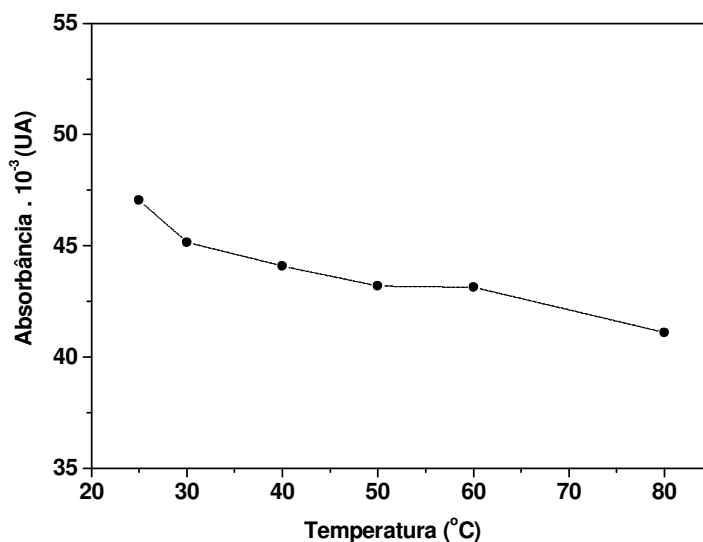


FIGURA 39- Efeito da temperatura do forno na absorbância (265 nm) de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$); fase móvel: Na_2HPO_4 ($0,0125 \text{ mol L}^{-1}$): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: $20 \mu\text{L}$ e pH da fase móvel: 2,50.

A variação da temperatura nas análises de EC mostrou diminuição de 5% (ao aumentar a temperatura de 25 para 80 °C) na retenção e 12% na absorbância em 265 nm (FIG. 38 e 39). Segundo Snyder (57), a temperatura da coluna geralmente não afeta a retenção de compostos neutros, ao contrário de amostras iônicas que podem apresentar diferentes tempos de retenção devido a processos de ionização entre outros e conseqüentemente interferir na separação.

Estes resultados podem evidenciar que o EC, nas condições de análise, comporta-se como composto aniônico resultado da desprotonação (total ou parcial) dos grupos carboxil.

Os resultados obtidos demonstraram que é necessário controle das condições de fluxo, volume, pH e temperatura na análise de EC.

5.6 Validação do método analítico para EC e EC-^{99m}Tc

5.6.1 Cromatogramas

A TAB. 16 apresenta as condições selecionadas para os parâmetros nas análises de EC, RL de EC e EC marcado com ^{99m}Tc.

TABELA 16 – Condições de análise para EC, RL de EC e EC-^{99m}Tc.

Parâmetro	Valor
Coluna	Shim-pack (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Modo de análise	Gradiente linear
Tempo de análise	15 minutos
Fase móvel	Tampão fosfato (0,0125 mol L ⁻¹): etanol
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
pH da fase móvel	2,50
Volume de amostra injetada	20 µL
Temperatura do forno de coluna	25 °C

Os cromatogramas de EC e RL de EC estão apresentados nas FIG. 40A e 40B, respectivamente.

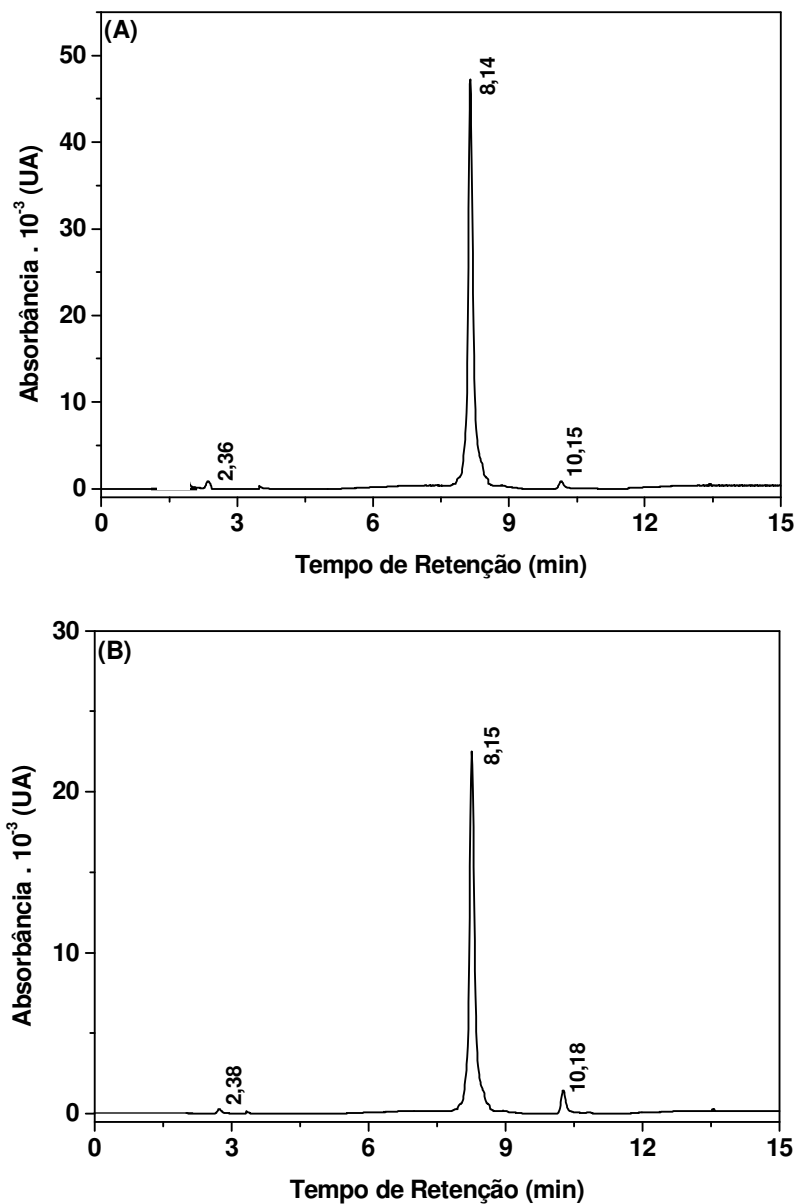


FIGURA 40- (A) Cromatograma de EC 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (B) Cromatograma de RL de EC. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 (0,0125 mol L^{-1}): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

Os cromatogramas de EC e RL de EC apresentaram três picos, além do produto principal. Para avaliar a presença de resíduo de reagentes de partida da síntese (FIG. 5) no EC utilizado, foi feita adição (*spike*) de cisteína e de ácido tiazolidínico carboxílico, separadamente, em amostras de EC e RL de EC. O ácido tiazolidínico é preparado pela reação de cisteína com formaldeído (30).

Na TAB. 17 estão relacionados alguns analitos e os respectivos tempos de retenção em ensaios de *spike*.

TABELA 17- Identificação dos analitos nos cromatogramas de EC e RL de EC.

Amostra	Tempo de Retenção (minutos)		
	Ácido tiazolidínico carboxílico	EC	EC-I
EC	2,36	8,14	10,15
RL de EC	2,38	8,15	10,18

Foi definido o tempo de retenção atribuído ao ácido tiazolidínico carboxílico. O EC referência e EC no RL eluíram em 8,14 e 8,15 minutos. O pico em 10,15 pode ser associado a alguma impureza do EC. Verduyck colaboradores (34) utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel constituída de tampão fosfato/etanol observaram a presença de impureza radioativa a qual ele identificou por espectrometria de massas como sendo isômero do EC-^{99m}Tc.

Os espectros de UV-Visível de EC e RL de EC no intervalo de 200 a 400 nm estão apresentados na FIG. 41.

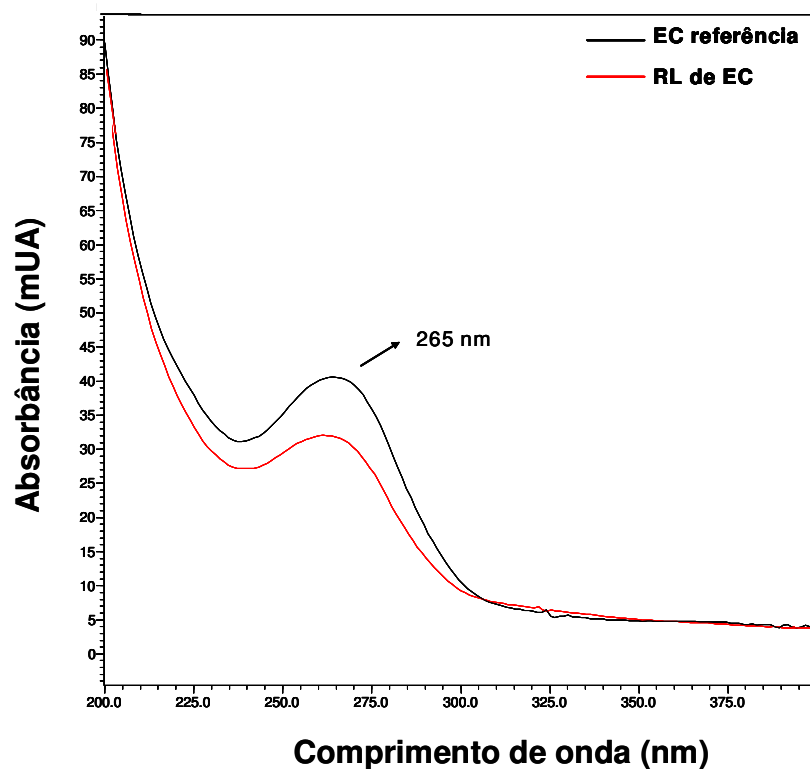


FIGURA 41- Espectros de UV-Visível de EC $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de RL de EC no intervalo de 200 a 400 nm. Absorção em 265 nm. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$); fase móvel: Na_2HPO_4 ($0,0125 \text{ mol L}^{-1}$): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: $20 \mu\text{L}$; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os espectros de UV-Visível de EC e de RL de EC apresentaram absorção característica em 265 nm.

O cromatograma do $\text{EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ na concentração radioativa de 55 MBq mL^{-1} está apresentado na FIG. 42. A identificação dos analitos está descrita na TAB. 18.

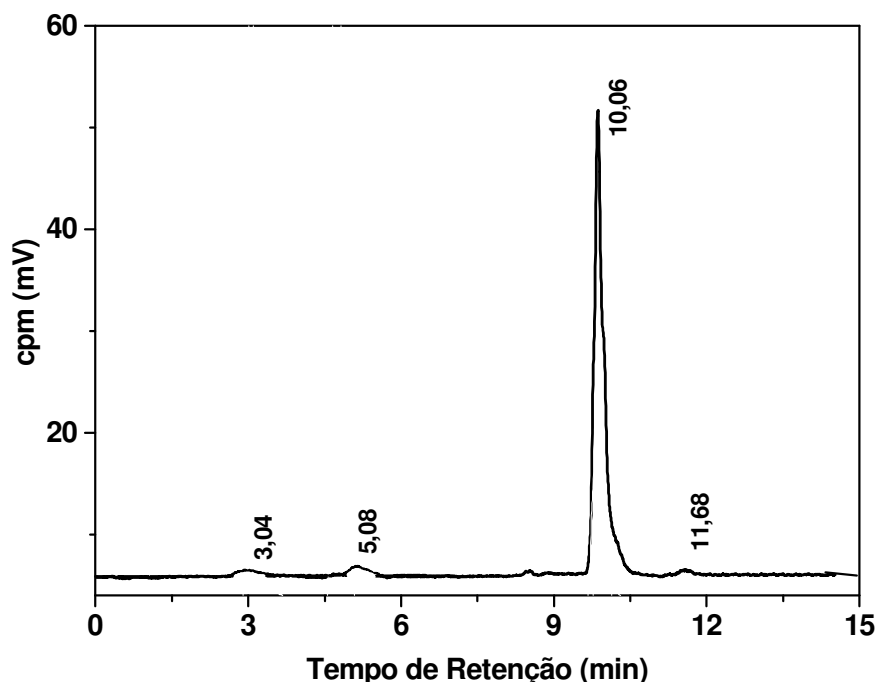


FIGURA 42- Cromatograma de EC-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹): C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

TABELA 18- Identificação dos analitos no cromatograma de EC-^{99m}Tc.

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Analito
1	3,04	^{99m} TcO ₂
2	5,08	^{99m} TcO ₄ ⁻
3	10,06	EC- ^{99m} Tc
4	11,68	EC-I- ^{99m} Tc

Comparou-se o método por CLAE com o método CCD utilizado na DIRF nos procedimentos de controle de qualidade de EC-^{99m}Tc. Os valores de pureza radioquímica obtidos nos métodos CLAE e CCD 30 e 240 minutos após a marcação estão apresentados na TAB. 19.

TABELA 19- %Pureza radioquímica de EC-^{99m}Tc obtida por CLAE e CCD.

Método	Pureza Radioquímica (%)	
	30 minutos	240 minutos
CLAE	98,96 ± 0,03	98,01 ± 0,05
CCD	99,18 ± 0,04	98,96 ± 0,52

A análise por CLAE revelou eficiência máxima de marcação do EC-^{99m}Tc de (98,96 ± 0,03)% no primeiro tempo (30 minutos) diminuindo para (98,01 ± 0,05)% no último tempo (240 minutos). Os resultados por CCD revelaram que EC-^{99m}Tc teve eficiência máxima de marcação de (99,18 ± 0,04)% aos 30 minutos enquanto que a eficiência decresce para (98,96 ± 0,52)% após 240 minutos da marcação.

A diferença entre os métodos CLAE e CCD foi de aproximadamente 0,22% para 30 minutos de marcação e 1% para 240 minutos. O método CLAE conseguiu quantificar três impurezas em quanto o método CCD apenas duas (^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂)

5.6.2 Parâmetros de validação

O método proposto demonstrou ser seletivo não apresentando interferência dos reagentes utilizados no processo de fabricação do RL ou por impurezas radioquímicas (FIG. 40 e 42).

Três curvas analíticas de EC (experimentos 1, 2, 3) estão representadas na FIG. 43.

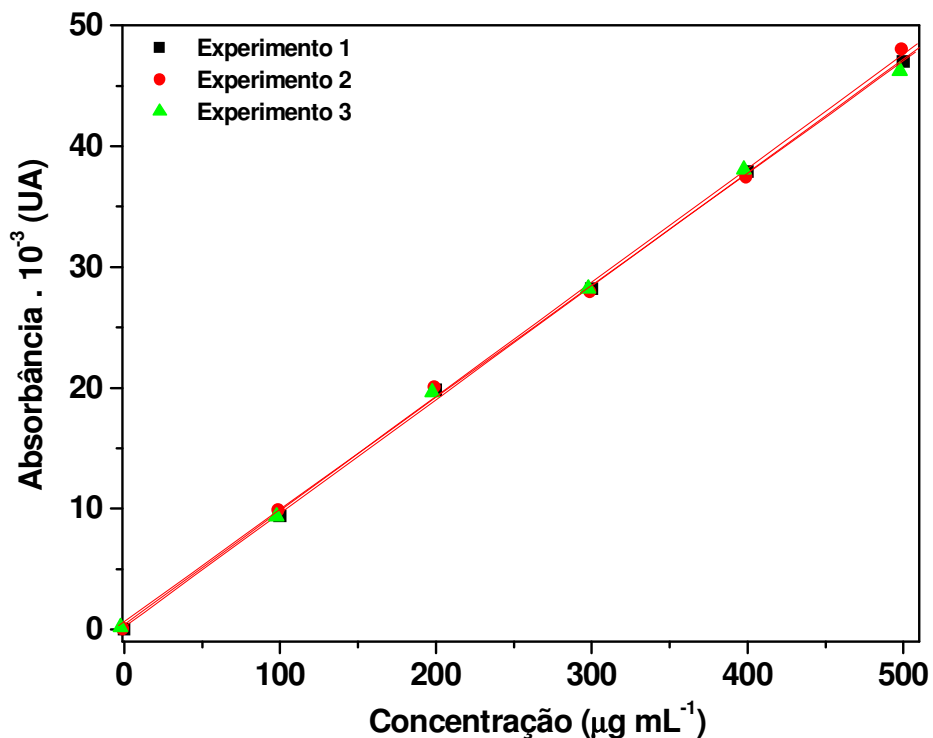


FIGURA 43- Curvas analíticas de EC na faixa de concentração 0- 500 µg mL⁻¹ ($\lambda = 265$ nm).

A curva analítica pode ser representada pela equação $Abs = a [EC] + b$, e os valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de correlação (r^2) dos experimentos 1, 2 e 3 estão descritos na TAB. 20.

TABELA 20- Parâmetros das curvas analíticas de EC.

Experimento	n	a	b	r^2
1	6	0,0940	0,2141	0,9997
2	6	0,0944	0,2303	0,9994
3	6	0,0928	0,2184	0,9996

n: número de amostra; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r^2 : coeficiente de correlação.

O método foi linear na faixa de 0 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FIG. 43). As equações de retas apresentaram coeficiente de correlação linear (r^2) maiores que 0,999 em todos os experimentos, atendendo as exigências da ANVISA ($r^2 > 0,99$) (4), indicando baixa dispersão dos dados experimentais.

Os resultados dos ensaios de precisão (expresso como DPR) e exatidão intradia do método para os experimentos 1, 2 e 3 estão apresentados nas TAB. 21, 22 e 23, respectivamente.

TABELA 21– Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 1.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	98,53 \pm 1,12	1,14	98,53
200	204,00 \pm 0,63	0,31	102,00
300	297,74 \pm 0,54	0,18	99,25
400	400,91 \pm 0,82	0,20	100,23
500	497,81 \pm 0,97	0,19	99,56

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão
CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 22 – Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 2.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	101,37 \pm 1,82	1,80	101,37
200	197,92 \pm 1,45	0,73	98,96
300	293,98 \pm 0,99	0,34	98,00
400	404,34 \pm 1,03	0,25	101,08
500	501,99 \pm 1,13	0,23	100,40

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão
CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 23 – Precisão e exatidão intradia de EC no experimento 3.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	98,37 \pm 1,03	1,05	98,37
200	204,98 \pm 1,52	0,74	102,49
300	299,38 \pm 0,97	0,32	99,79
400	406,05 \pm 1,74	0,43	101,51
500	493,43 \pm 0,99	0,20	98,69

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

A precisão intradia variou entre 0,18 e 1,80%. O valor máximo de DPR foi observado para EC 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no experimento 2 (TAB. 22) e foi inferior ao estabelecido pela ANVISA (DPR \leq 5%). O método mostrou repetitividade nas análises realizadas no mesmo dia.

Os resultados de exatidão intradia estão no intervalo 98-102,49%, indicando concordância entre valores experimentais e teóricos.

Os resultados de precisão e exatidão interdia estão apresentados na TAB. 24.

TABELA 24 – Precisão e exatidão interdia de EC referência.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	99,42 \pm 3,97	3,99	99,42
200	206,10 \pm 5,20	2,52	103,05
300	297,03 \pm 2,50	0,84	99,01
400	403,77 \pm 3,59	0,89	100,94
500	497,74 \pm 3,09	0,62	99,55

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

A precisão interdia apresentou valor maior quando comparado com os valores de DPR encontrados na precisão intradia, porém abaixo dos limites estabelecidos. Os valores de exatidão também atenderam aos critérios.

A massa de EC encontrada no RL foi de 0,49 mg (valor esperado 0,50 mg). A literatura não descreve métodos para a quantificação de EC em RL e em EC-^{99m}Tc. Alguns trabalhos descrevem a análise de pureza do EC pelo método de eletroforese capilar (50, 70).

Os dados da recuperação das soluções de referência adicionadas às amostras de RL de EC podem ser observados na TAB. 25.

TABELA 25- % Recuperação em amostras de RL de EC.

EC adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)^(*)	Recuperação (%)	DPR (%)
50	48,90	97,80	1,92
100	95,57	95,57	1,03
150	148,66	99,11	0,32

(*) Média de triplicata em cada nível

A porcentagem de recuperação variou de 95,57 a 99,11%, mostrando que o método é eficiente no tratamento da amostra.

Os valores de coeficiente linear e coeficiente angular obtidos pela Equação da reta (TAB. 20) permitiram calcular o LD e LQ através das Equações 8 e 9, respectivamente. Os valores encontrados foram $0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o LD e $0,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o LQ, respectivamente. Os resultados demonstram que o método proposto é capaz em detectar e quantificar EC no RL e no EC-^{99m}Tc.

A pureza radioquímica do EC-^{99m}Tc após 3 meses de fabricação do RL foi determinada pelos métodos CLAE e CCD estão apresentadas na TAB. 26

TABELA 26- %Pureza radioquímica de EC-^{99m}Tc determinadas nos estudos de estabilidade por CLAE e CCD.

Método	(PRq ± DP)%	
	Data da fabricação	3 meses
CLAE	98,96 ± 0,03	96,99 ± 0,09
CCD	99,18 ± 0,04	98,06 ± 0,09

PRq: pureza radioquímica DP: desvio padrão

Os resultados dos estudos de estabilidade para o método CLAE mostraram redução de aproximadamente 2% da PRq após 3 meses da data de fabricação do RL, enquanto para o método CCD a redução foi de 1%. As PRq estimadas em ambos os métodos nos estudos de estabilidade são maiores que 95%.

5.7 Otimização das condições de análise por CLAE para ECD e ECD-^{99m}Tc

Para a determinação simultânea de ECD-^{99m}Tc, ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ em radiofármacos e validação do método analítico por CLAE, as condições F e G da TAB. 4 (página 44) foram avaliadas. Na FIG. 44 e 45 são apresentados os cromatogramas de ECD-^{99m}Tc e das impurezas ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ adicionadas ao ECD-^{99m}Tc nas condições F e G, respectivamente.

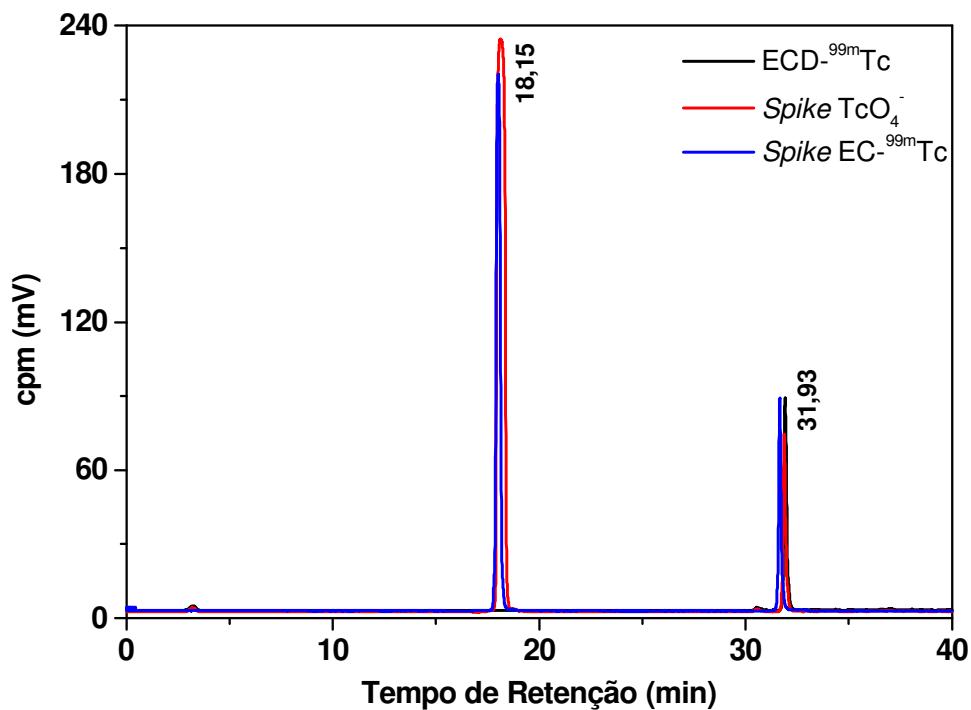


FIGURA 44- Cromatogramas de ECD-^{99m}Tc, ECD-^{99m}Tc adicionado de ^{99m}TcO₄⁻ e ECD-^{99m}Tc adicionado de EC-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição F: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: PIC A 0,2%: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL; temperatura do forno de coluna: 25 °C.

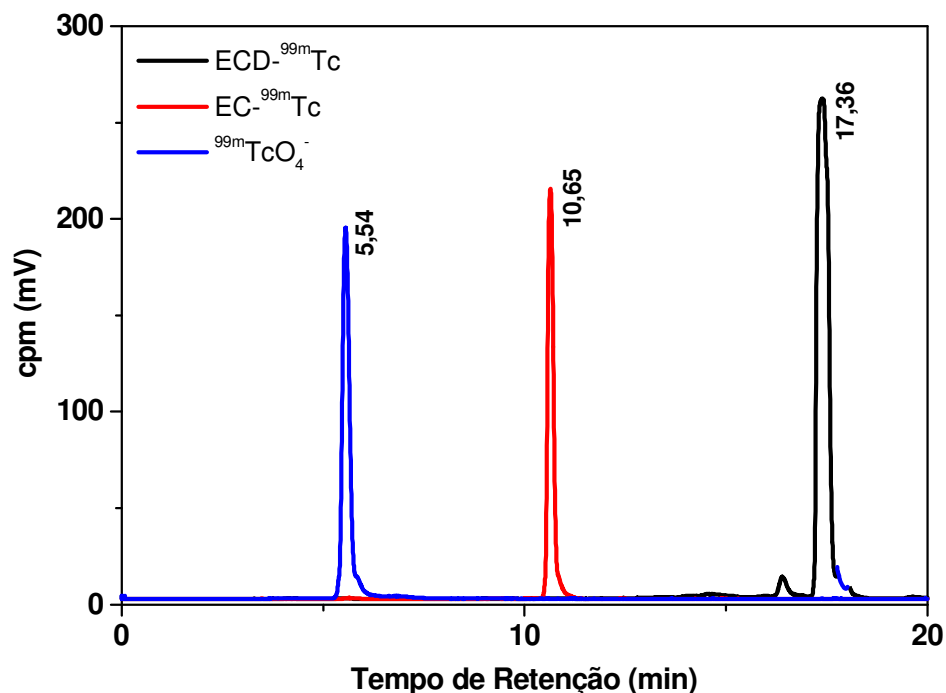


FIGURA 45- Cromatogramas de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$, $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Concentração radioativa: $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

A condição F (FIG. 44), em que é feita a utilização de pareador iônico, não permitiu separação entre $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, nas análises de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$. $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ é um composto neutro e apresentou o tempo de retenção independente da presença de PIC A. A presença de PIC B5 não alterou o tempo de retenção de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ (dados não mostrados).

Jankowsky e colaboradores (51) usaram $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ como padrão não protonável em análises por eletroforese capilar para determinar as constantes de dissociação de alguns radiofarmácios de tecnécio-99m.

A condição G (FIG. 45) permitiu separação das impurezas e foi utilizada nos ensaios para avaliar a robustez do método: fluxo da fase móvel, volume de amostra, pH da fase móvel e temperatura do forno de coluna.

Os cromatogramas das análises de ECD $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes fluxos de fase móvel estão representados na FIG. 46.

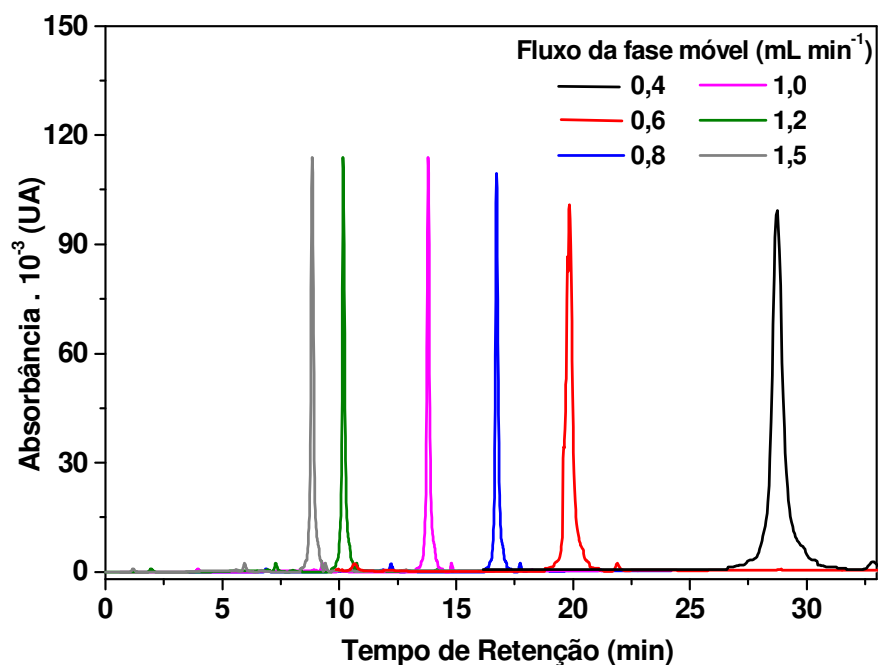


FIGURA 46- Cromatogramas de ECD $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Volume de amostra: $20 \mu\text{L}$; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25°C . Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: $20 \mu\text{L}$; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25°C .

Pode-se observar que o fluxo da fase móvel influenciou a absorvância (FIG. 47A), largura de pico à meia altura (FIG. 48B) e tempo de análise.

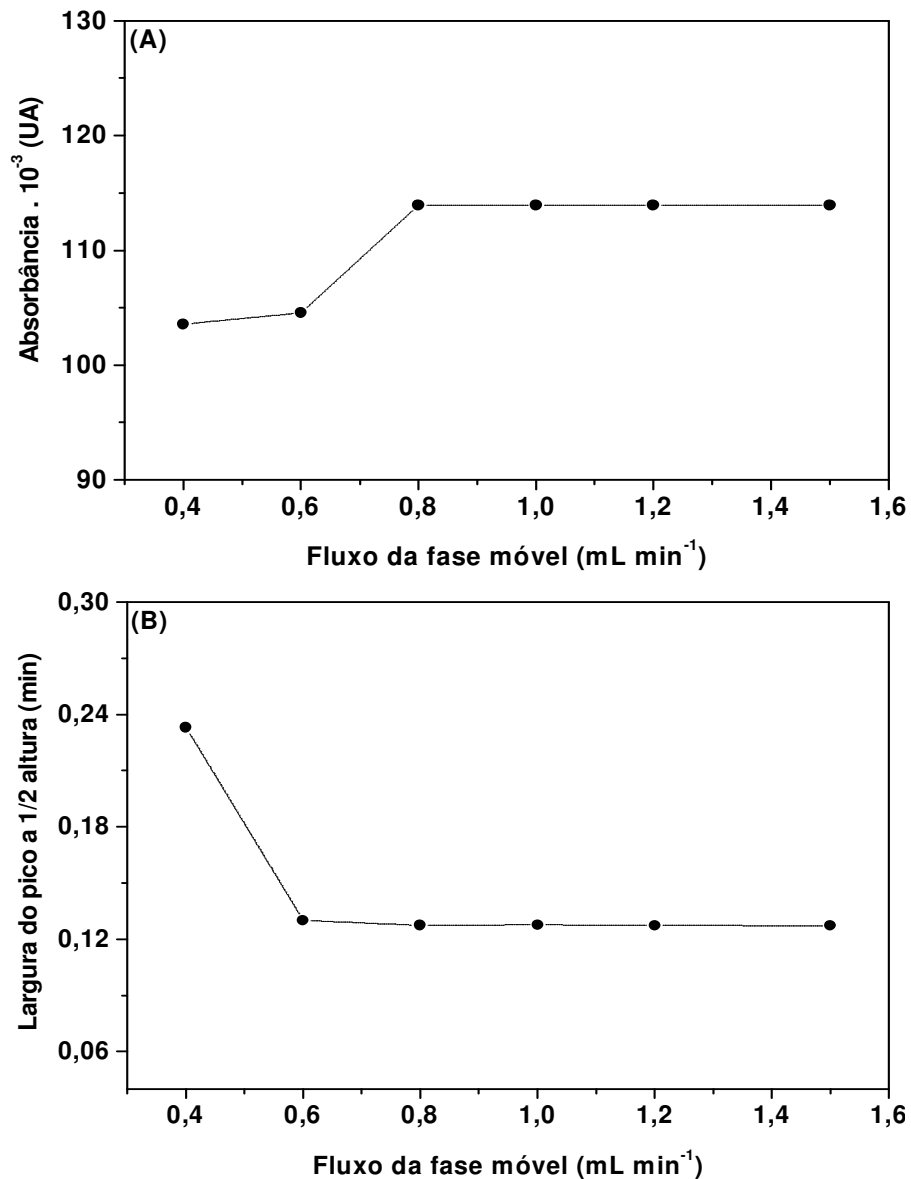


FIGURA 47- Efeito do fluxo da fase móvel **(A)** na absorbância (215 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Efeito pronunciado na absorbância (aumento de 8,9%) foi observado com o aumento do fluxo da fase móvel de 0,6 a 0,8 mL min⁻¹ (FIG. 47A). A largura do pico à meia altura reduziu em 10% quando o fluxo foi alterado de 0,4 a 0,6 mL min⁻¹ (FIG. 47B).

Os cromatogramas de ECD com a variação do volume de injeção de amostra estão representados nas FIG. 48A e 48B. As FIG. 49A e 49B apresentam a variação da absorbância e da largura de pico à meia altura com o volume de injeção, respectivamente.

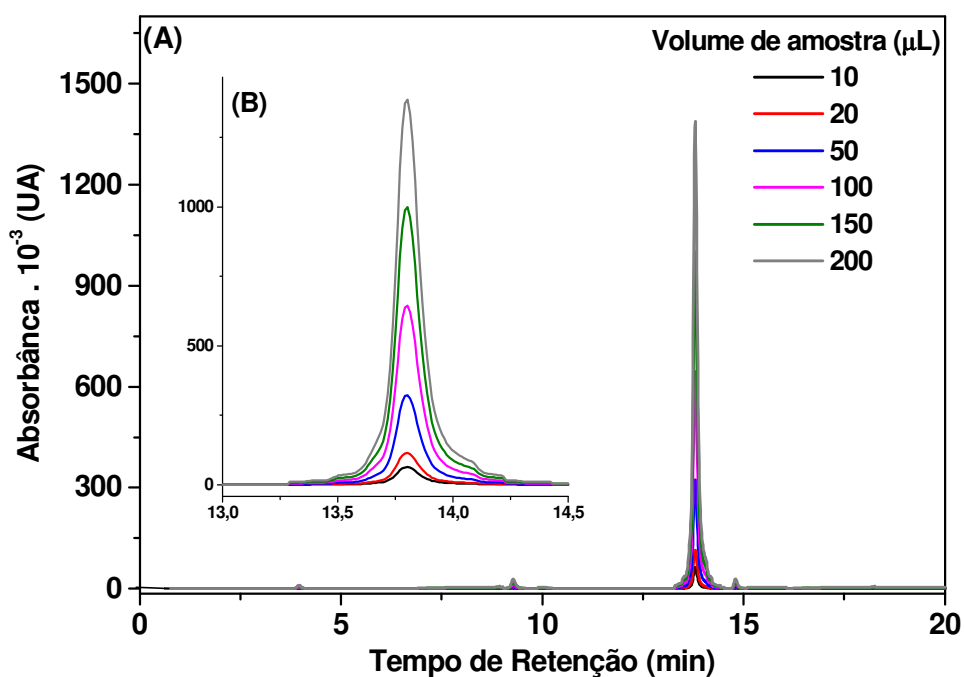


FIGURA 48- (A) Cromatogramas de ECD 500 µg mL⁻¹. (B) Ampliação do intervalo 13,00- 14,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

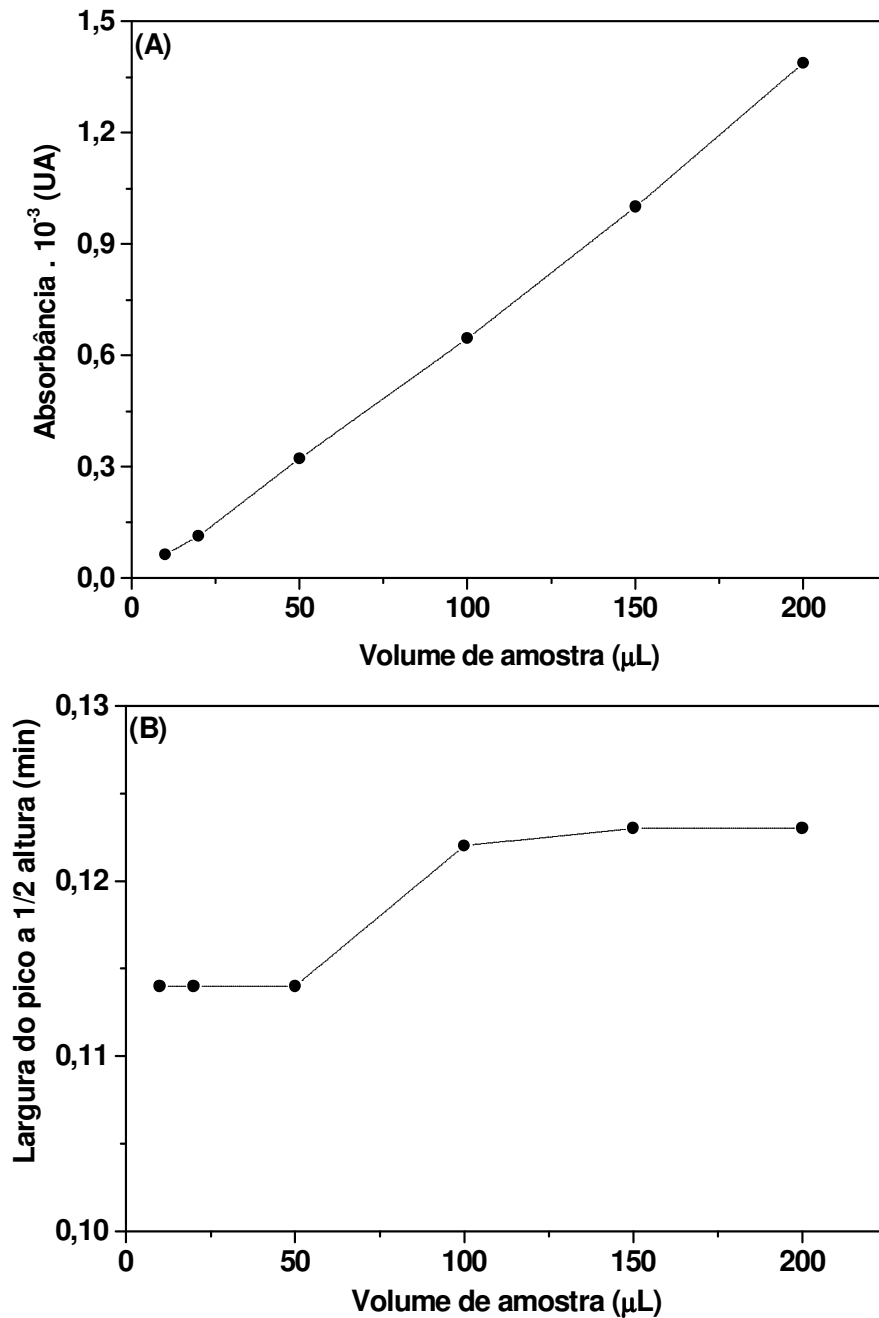


FIGURA 49- Efeito do volume de amostra **(A)** na absorbância (215 nm) e **(B)** na largura do pico à meia altura de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

A absorvância foi linear com o aumento de volume de amostra no intervalo de 10 a 200 μL (FIG. 48 e 49A). A largura do pico à meia altura aumentou em aproximadamente 7% com alteração de 50 a 100 μL (FIG. 49B). Volume de 20 μL foi escolhido para realizar as análises de validação de método.

Nas FIG. 50A, 50B estão apresentados os cromatogramas do ECD em diferentes valores de pH. Os efeitos da acidez da fase móvel no tempo de retenção e na absorvância de ECD estão apresentados nos cromatogramas das FIG. 51A e 51B, respectivamente.

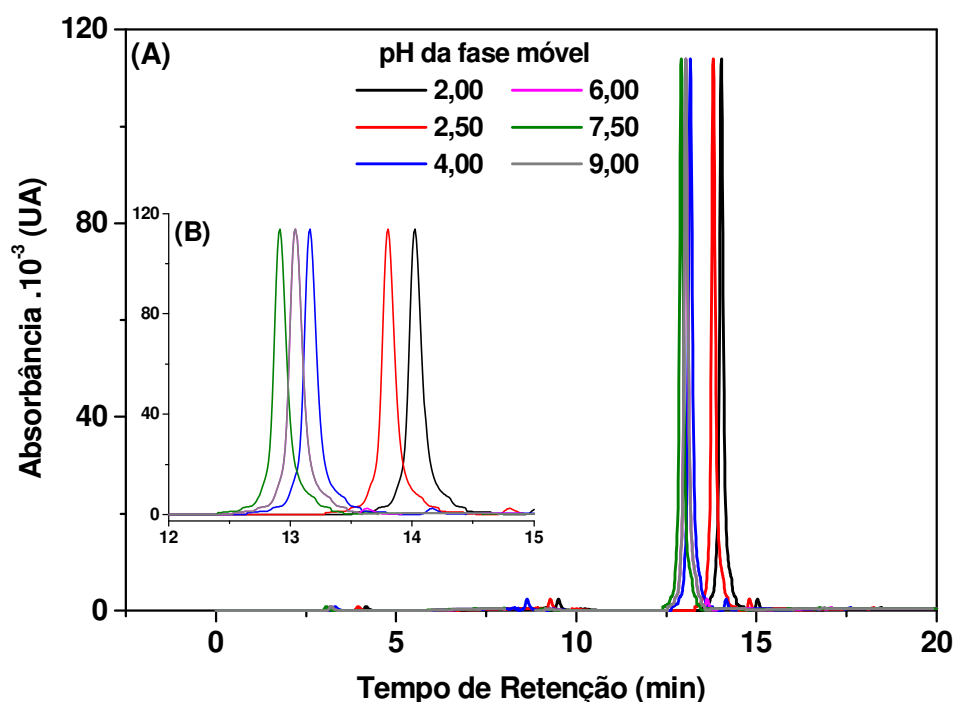


FIGURA 50- (A) Cromatogramas de ECD $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ com a variação do pH da fase móvel. (B) Ampliação do intervalo 12- 15 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 20 μL e temperatura do forno de coluna: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

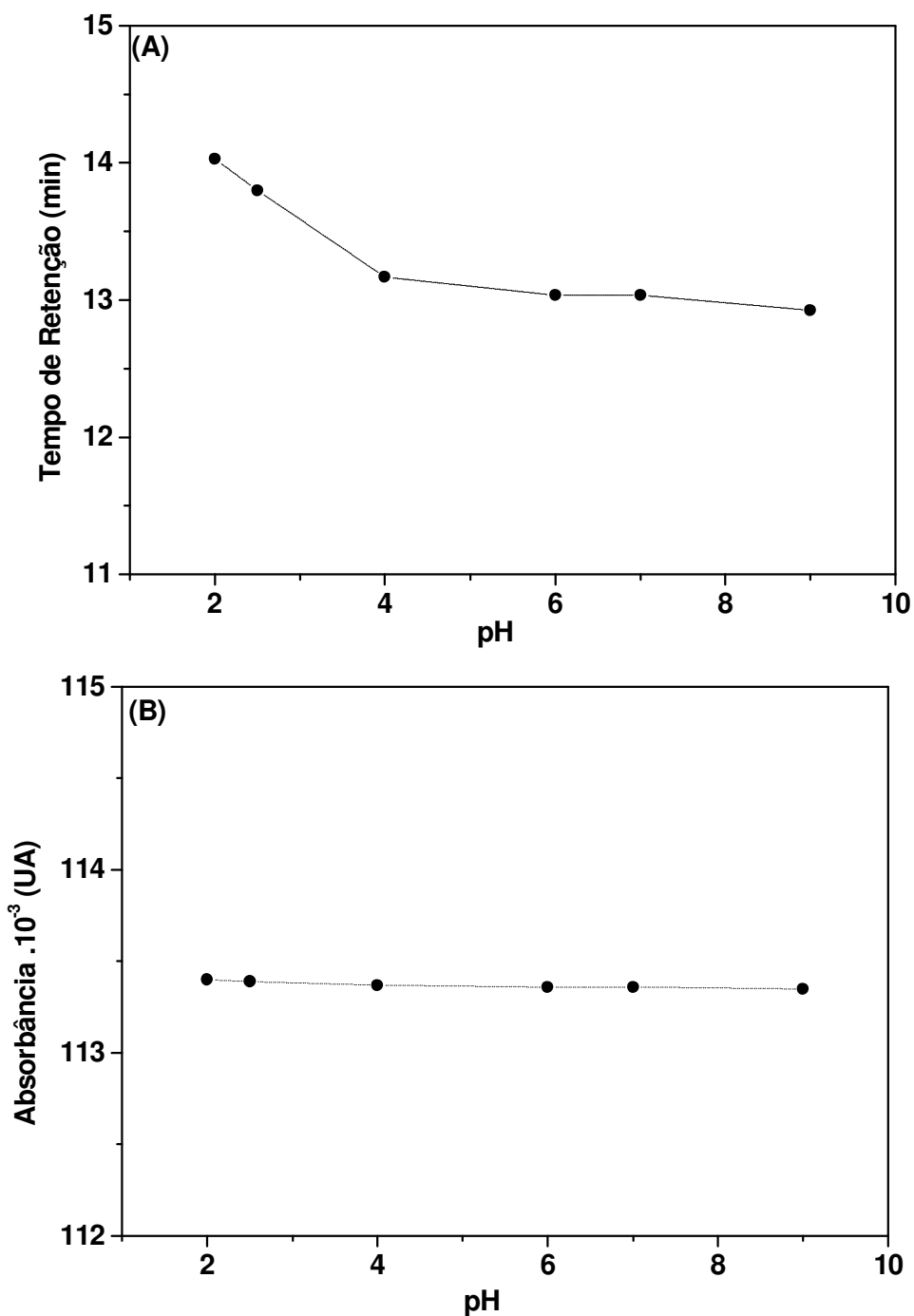


FIGURA 51- Efeito do pH da fase móvel **(A)** no tempo de retenção e **(B)** na absorbância (215 nm) de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μ L e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

O aumento de pH da fase móvel modificou o tempo de retenção do ECD e causou perda de resolução entre ECD e um de seus isômeros ou uma possível impureza, o que pode ser observado na ampliação da FIG. 50A (FIG. 50B). Para pH 2,50, a resolução entre o pico de ECD e impureza foi de 1,71. Aumentando o pH para 6,00, a resolução diminuiu para 1,04 e em pH 9,00, a resolução foi de 0,46, com perda de aproximadamente 27% na resolução entre os picos (FIG. 50B).

Vanderghinste e colaboradores (81) analisaram a pureza isomérica do Hexametilpropilenoamina oxima-^{99m}Tc (HMPAO-^{99m}Tc) por CLAE (coluna C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 µm- XTerra™) e separaram as formas D,L das formas meso isoméricas. Observaram o efeito do pH da fase móvel na separação e perceberam que pH entre 3- 4 era favorável a melhor resolução entre os picos. Os isômeros separados foram analisados por espectrometria de massas para assegurar a identidade do das preparações D,L-HMPAO-^{99m}Tc e meso- HMPAO-^{99m}Tc.

A variação no tempo de retenção de ECD com o pH da fase móvel foi de 8% (pH 2,00 para pH 9,00) (FIG.51A). O pH da fase móvel não influenciou a absorvância do ECD em 215 nm (FIG. 51B). O pH de fase móvel escolhido para ensaios de validação foi de 2,50.

Os cromatogramas de ECD com variação da temperatura do forno de coluna estão apresentados nas FIG. 52 e 53.

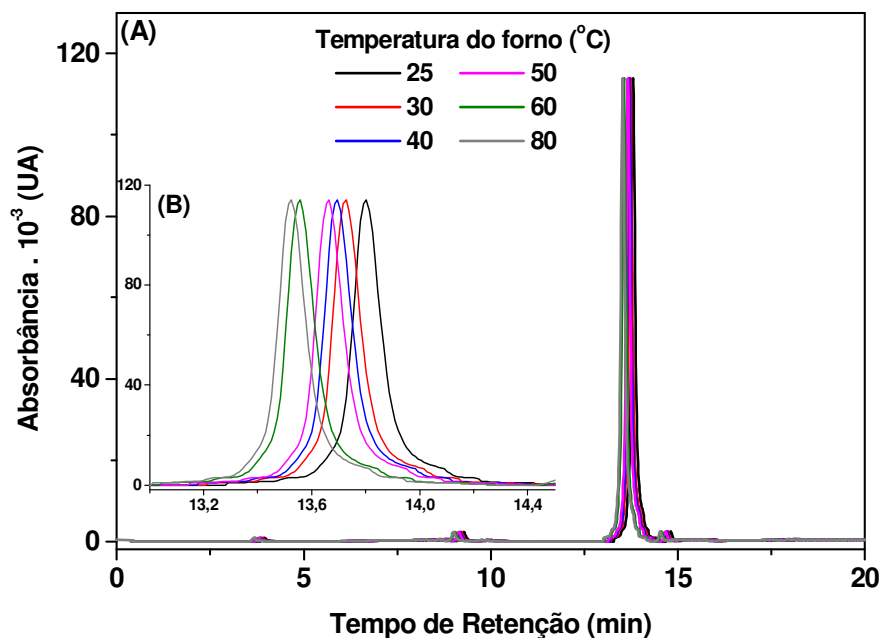


FIGURA 52- (A) Cromatogramas de ECD 500 µg mL⁻¹ com a variação da temperatura do forno de coluna. (B) Ampliação do intervalo de 13- 14,5 minutos. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL e pH da fase móvel: 2,50.

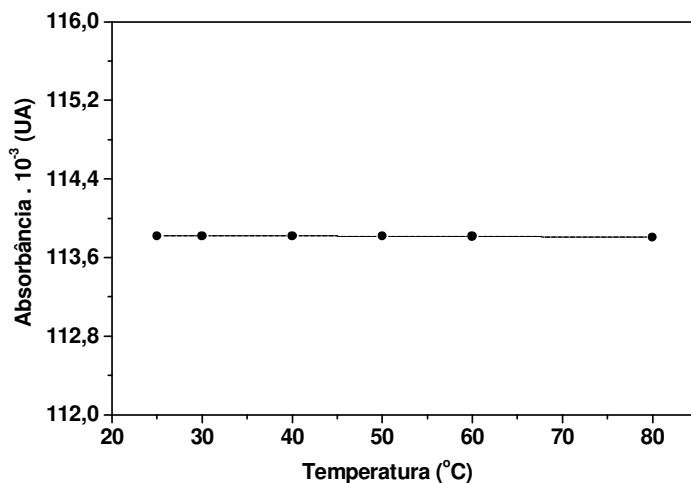


FIGURA 53- Efeito da temperatura do forno na absorbância (215 nm) de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL e pH da fase móvel: 2,50.

O aumento da temperatura do forno de coluna não alterou significativamente o cromatograma do ECD (FIG. 52). A retenção diminuiu em menos de 2% e a absorbância (FIG. 53) apresentou diminuição de apenas 0,05%.

5.8 Validação do método analítico para ECD e ECD-^{99m}Tc

Os ensaios de robustez permitiram definir as condições de análise para ECD, RL de ECD e ECD-^{99m}Tc (condição G da TAB. 4) (TAB. 27)

TABELA 27– Condições de análise para ECD, RL de ECD e ECD-^{99m}Tc

Parâmetro	Valor
Coluna	Shim-pack (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Modo de análise	Gradiente linear
Tempo de análise	20 minutos
Fase móvel	Tampão fosfato (0,0125 mol L ⁻¹): etanol
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
pH da fase móvel	2,50
Volume de amostra	20 µL
Temperatura do forno de coluna	25 °C

5.8.1 Cromatogramas

Os cromatogramas de ECD e RL de ECD estão apresentados nas FIG. 54A e 54B, respectivamente. Na TAB. 28 estão relacionados os tempos de retenção e os respectivos analitos encontrados nos cromatogramas das FIG. 54A e 54B.

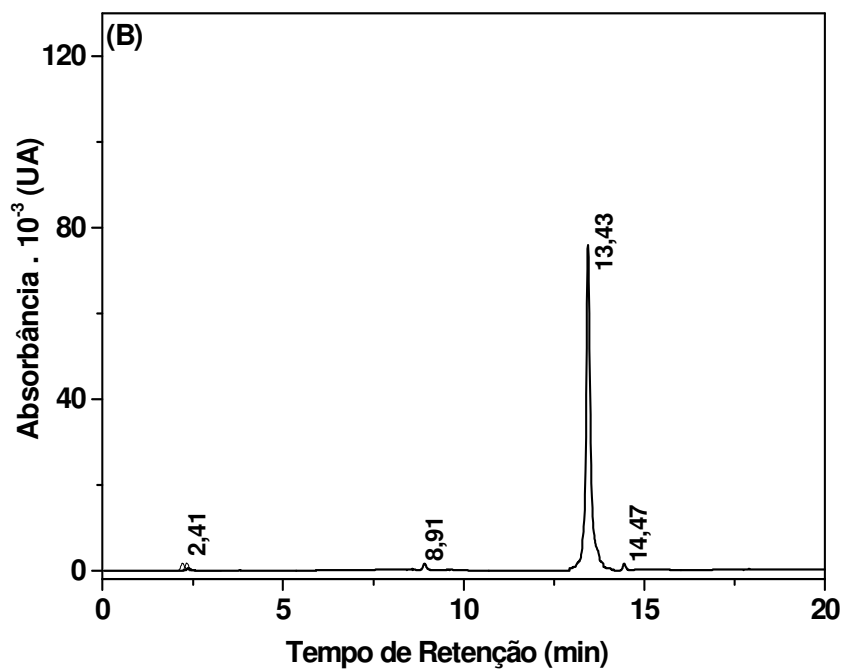
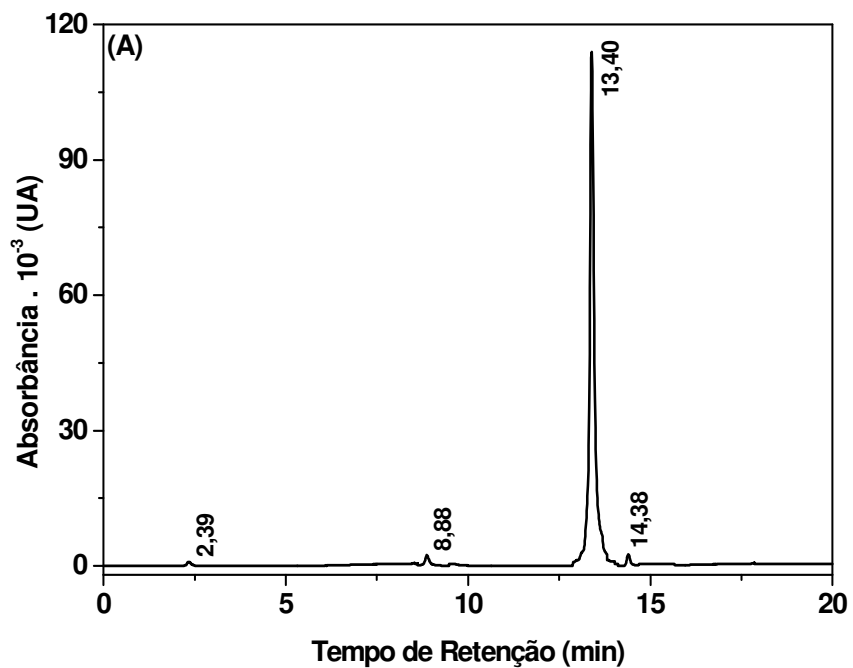


FIGURA 54- (A) Cromatograma de ECD 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (B) Cromatograma de RL de ECD. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 20 μL ; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

TABELA 28- Identificação dos analitos no cromatograma de ECD.

Amostra	Tempo de Retenção (minutos)			
	Cisteína	EC	ECD	ECD-I
ECD	2,39	8,88	13,40	14,38
RL de ECD	2,41	8,91	13,43	14,47

Ambos os cromatogramas, ECD e RL de ECD apresentaram quatro picos principais. O pico em 2,39 minutos foi atribuído à cisteína e em 8,88 minutos, ao EC. EC é uma impureza resultante da hidrólise total do ECD. O pico em 14,38 e 14,47 minutos (ECD-I) podem ser atribuídos às impurezas do ECD.

Os espectros na região do UV-Visível de ECD e de RL de ECD estão representados na FIG. 55.

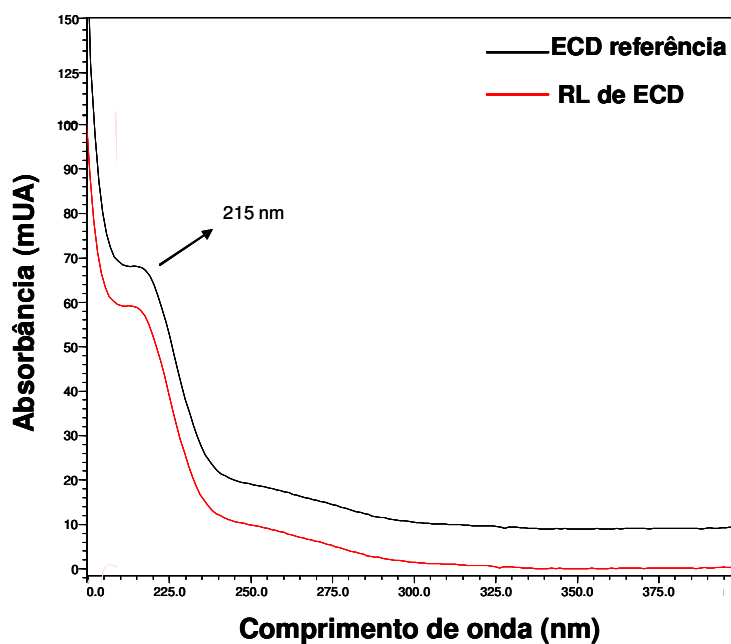


FIGURA 55- Espectros de UV-Visível de ECD 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e RL de ECD. Absorção em 215 nm. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na_2HPO_4 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase

orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Os espectros de UV-Visível de ECD, RL de ECD do produto marcado (ECD-^{99m}Tc) mostraram-se similares.

O cromatograma do ECD-^{99m}Tc na concentração radioativa de 55 MBq mL⁻¹ está apresentado na FIG. 56A. Ampliação do cromatograma da FIG. 56A no intervalo de 0 a 12 minutos pode ser observada na FIG. 56B.

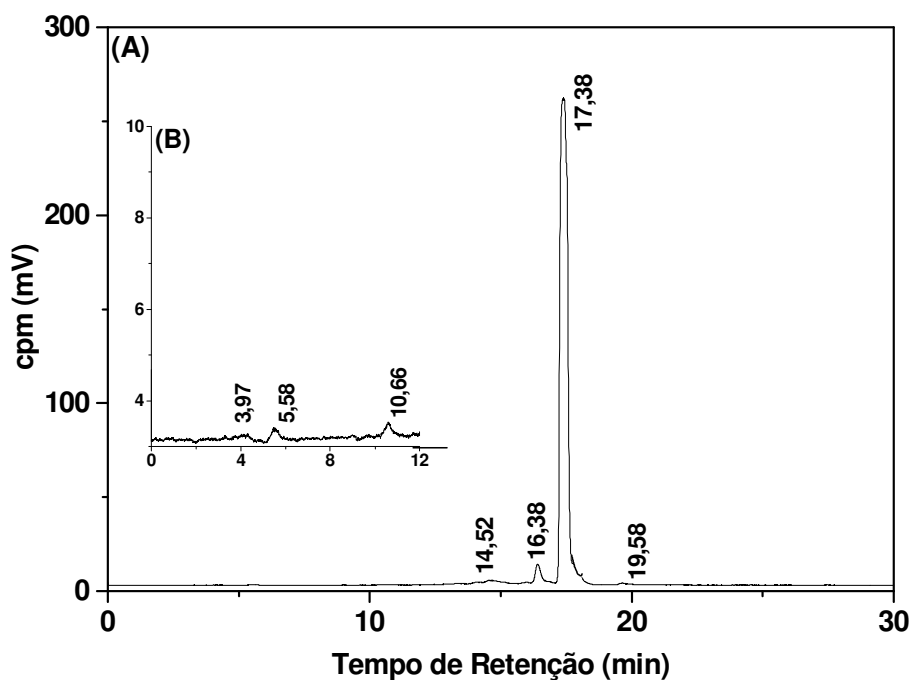


FIGURA 56- (A) Cromatograma de ECD-^{99m}Tc. **(B)** Ampliação do intervalo de 0-12 minutos. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

Para identificação das espécies, realizou-se adição, separadamente, de possíveis impurezas para comparação com os tempos de retenção obtidos no cromatograma da FIG. 56. Na FIG. 57 estão apresentados os cromatogramas de

ECD-^{99m}Tc e de impurezas radioativas. Os analitos identificados estão relacionados na TAB. 29.

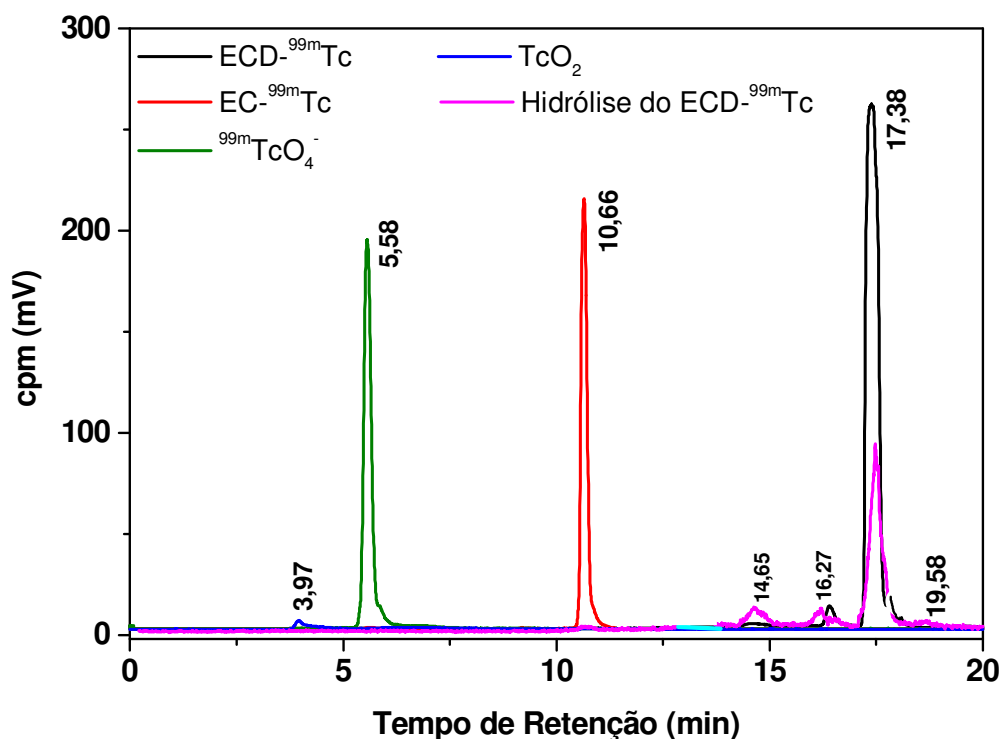


FIGURA 57- Cromatogramas de ECD-^{99m}Tc, EC-^{99m}Tc, ^{99m}TcO₄⁻, ^{99m}TcO₂ e de compostos resultantes da hidrólise básica de ECD-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. Condição G: coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄: C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL; pH da fase móvel: 2,50 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

TABELA 29- Identificação dos analitos no cromatograma de ECD-^{99m}Tc.

Tempo de retenção (minutos)	Analito
3,97	TcO ₂
5,58	^{99m} TcO ₄ ⁻
10,66	EC- ^{99m} Tc
14,65	ECM1- ^{99m} Tc
16,27	ECM2- ^{99m} Tc
17,38	ECD- ^{99m} Tc
19,58	ECD-I- ^{99m} Tc

O cromatograma do ECD-^{99m}Tc apresentou seis picos de impurezas.

As impurezas ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ são frequentemente determinadas pelo método CCD (10, 82, 83), porém as demais impurezas ou não são detectadas separadamente ou apresentam a separação em fitas de CCD ocorre com pouca resolução. Tecnécio coloidal (^{99m}TcO₂) tem sido identificado apenas por CP e CCD. EC-^{99m}Tc eluiu em tempo de retenção de 10,66 minutos, e pode ser resultante da esterificação incompleta do EC ou da hidrólise de ECD.

As impurezas ECM1-^{99m}Tc e ECM2-^{99m}Tc podem ser provavelmente as formas monoéster-monoácidas, mais polar que ECD-^{99m}Tc e menos polar que o EC-^{99m}Tc. Outros autores também observaram a presença dessas impurezas (7, 28, 34, 35, 83).

A espécie que eluiu em 19,58 minutos (ECD-I-^{99m}Tc) pode ser alguma impureza do ECD-^{99m}Tc.

A eficiência de marcação foi estimada pela determinação de pureza radioquímica. Para a técnica CLAE e CCD foram encontrados (98,95 ± 0,38)% e (99,35 ± 0,24)% de pureza radioquímica após 30 minutos da marcação, respectivamente.

5.6.2 Parâmetros de validação

O método proposto demonstrou ser seletivo, pois conseguiu separar as impurezas do princípio ativo de interesse (FIG. 54 e 56), fato confirmado pela ausência de interferentes nos tempos de retenção dos picos referentes ao ECD e ECD-^{99m}Tc.

Na FIG. 58 estão apresentadas as curvas analíticas de três experimentos com ECD. Na TAB. 30 estão relacionados os parâmetros das equações de retas dos experimentos 1, 2 e 3.

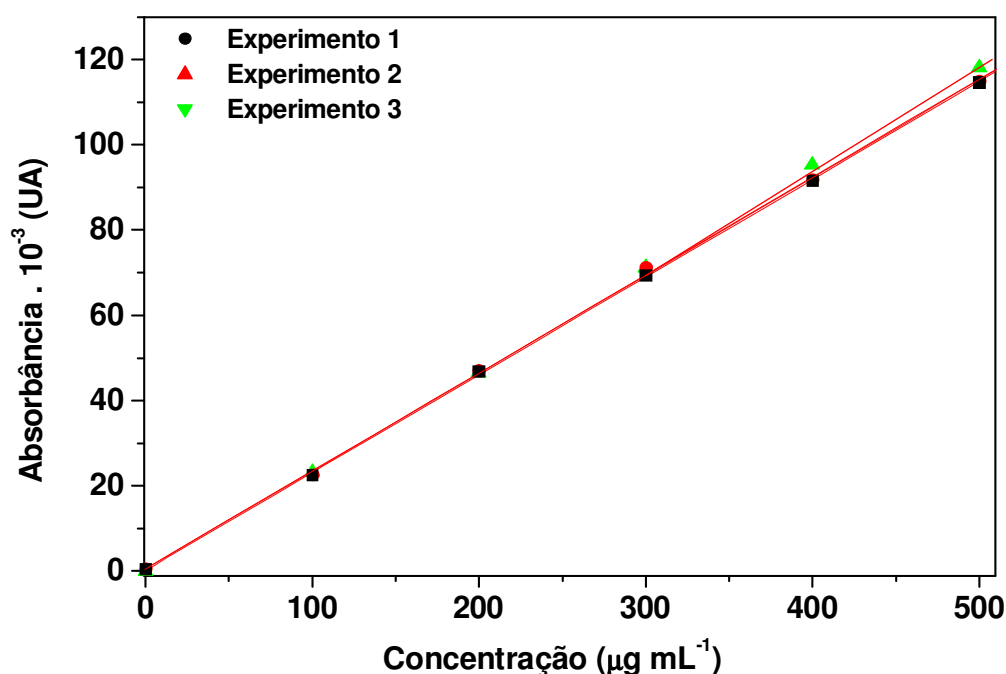


FIGURA 58- Curvas analíticas para ECD na faixa de concentração de 0- 500 µg mL⁻¹

TABELA 30- Parâmetros das curvas analíticas de ECD.

Experimento	n	a	b	r ²
1	6	0,2294	0,2402	0,9995
2	6	0,2297	0,2445	0,9995
3	6	0,2392	0,2048	0,9996

n: número de amostra; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r²: coeficiente de correlação.

Os valores calculados de precisão e exatidão intradia estão descritos nas TAB. 31, 32 e 33, referentes aos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente.

TABELA 31– Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 1.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	95,38 \pm 2,01	2,11	95,38
200	201,27 \pm 1,78	0,88	100,64
300	298,93 \pm 0,95	0,32	99,64
400	396,31 \pm 0,91	0,23	99,08
500	496,55 \pm 0,99	0,20	99,31

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 32– Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 2.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	95,66 \pm 0,90	0,94	95,66
200	201,42 \pm 1,73	0,86	100,71
300	298,09 \pm 0,75	0,25	99,36
400	396,21 \pm 0,71	0,18	99,05
500	496,75 \pm 0,33	0,07	99,35

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 33– Precisão (DPR) e exatidão intradia de ECD no experimento 3.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	96,16 \pm 1,07	1,11	96,16
200	194,00 \pm 1,15	0,60	97,00
300	296,31 \pm 1,05	0,35	98,77
400	397,13 \pm 0,90	0,23	99,28
500	497,02 \pm 0,75	0,15	99,41

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

A precisão máxima nos três experimentos foi 2,11% para o nível de menor concentração (experimento 1). Exatidão de 95,38% foi a menor, também encontrada para o nível de concentração baixa (experimento 1). Os resultados das análises interdiárias estão apresentados na TAB. 34

TABELA 34– Precisão (DPR) e exatidão interdiária de ECD.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	96,73 \pm 3,98	4,11	96,73
200	198,90 \pm 4,66	2,34	99,45
300	297,78 \pm 2,75	0,92	99,26
400	396,55 \pm 2,52	0,63	99,14
500	496,77 \pm 2,07	0,41	99,35

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão
CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

Os resultados de precisão e de exatidão são menores que 5% e maiores que 96%, respectivamente.

Foi obtida massa de 0,99 mg (valor de bula: 1,00 mg) no frasco de RL de ECD, pelo método desenvolvido.

A TAB. 35 apresenta os valores de recuperação do ECD adicionado às amostras de RL de ECD.

TABELA 35- %Recuperação em amostras de RL de ECD.

EC adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)^(*)	Recuperação (%)	DPR (%)
50	48,93	97,86	2,52
100	99,02	99,02	1,08
150	148,92	99,28	0,68

^(*)Média de triplicata em cada nível

Os resultados de porcentagem de recuperação estão no intervalo de 97,86- 100,35%, com precisão na faixa de 0,68- 2,52%.

A menor concentração que pode ser detectada por este método (LD) foi 0,281 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o LQ calculado foi 0,936 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A pureza radioquímica do ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ determinada nos ensaios de estabilidade utilizando os métodos CLAE e CCD estão apresentadas na TAB. 36

TABELA 36- Pureza radioquímica de ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ determinadas nos estudos de estabilidade

Método	Data de fabricação (PRq \pm DP)%	3 meses (PRq \pm DP)%
CLAE	98,95 \pm 0,38	97,13 \pm 0,07
CCD	99,35 \pm 0,24	98,37 \pm 0,14

PRq: pureza radioquímica **DP:** desvio padrão

O método CLAE mostrou redução de 1,84% enquanto para o método CCD a redução foi de 0,98%. Esta diferença entre os métodos pode ser explicada pelo fato do método CLAE determinar um número maior de impurezas.

5.9 Validação do método analítico para MIBI e Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$

A Farmacopéia Européia (37) descreve metodologia para avaliar pureza radioquímica de Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ combinando as técnicas de CP, CCD e CLAE. A condição de análise descrita na farmacopéia foi utilizada (condição H, TAB. 4 – página 44), com a substituição da coluna de 250 mm pela coluna de 150 mm.

A TAB. 37 apresenta os valores para os parâmetros usados nas análises de MIBI, RL de MIBI e Sestamibi- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

TABELA 37- Condições de análise para MIBI, RL de MIBI e Sestamibi-^{99m}Tc

Parâmetro	Condição
Coluna	Shim-pack (150 x 4,6 mm; 5 µm)
Modo de análise	Isocrático
Tempo de análise	10 minutos
Fase móvel	CH ₃ CN, (NH ₄) ₂ SO ₄ , CH ₃ OH 20:35:45 (v/v)
Fluxo da fase móvel	1,5 mL min ⁻¹
pH da fase móvel	5,00
Volume de amostra injetada	25 µL
Temperatura do forno de coluna	25 °C

5.9.1 Cromatogramas

Nas FIG. 59A e 59B estão apresentados os cromatogramas de MIBI e de RL de MIBI, respectivamente. A FIG. 59C é ampliação da região entre 1,3 e 2,3 minutos da FIG. 59B. Os espectros de UV-Visível de MIBI 100 µg mL⁻¹ e RL de MIBI no intervalo de 200- 400 nm estão representados na FIG. 60, em que é possível verificar máximo de absorção em 245 nm.

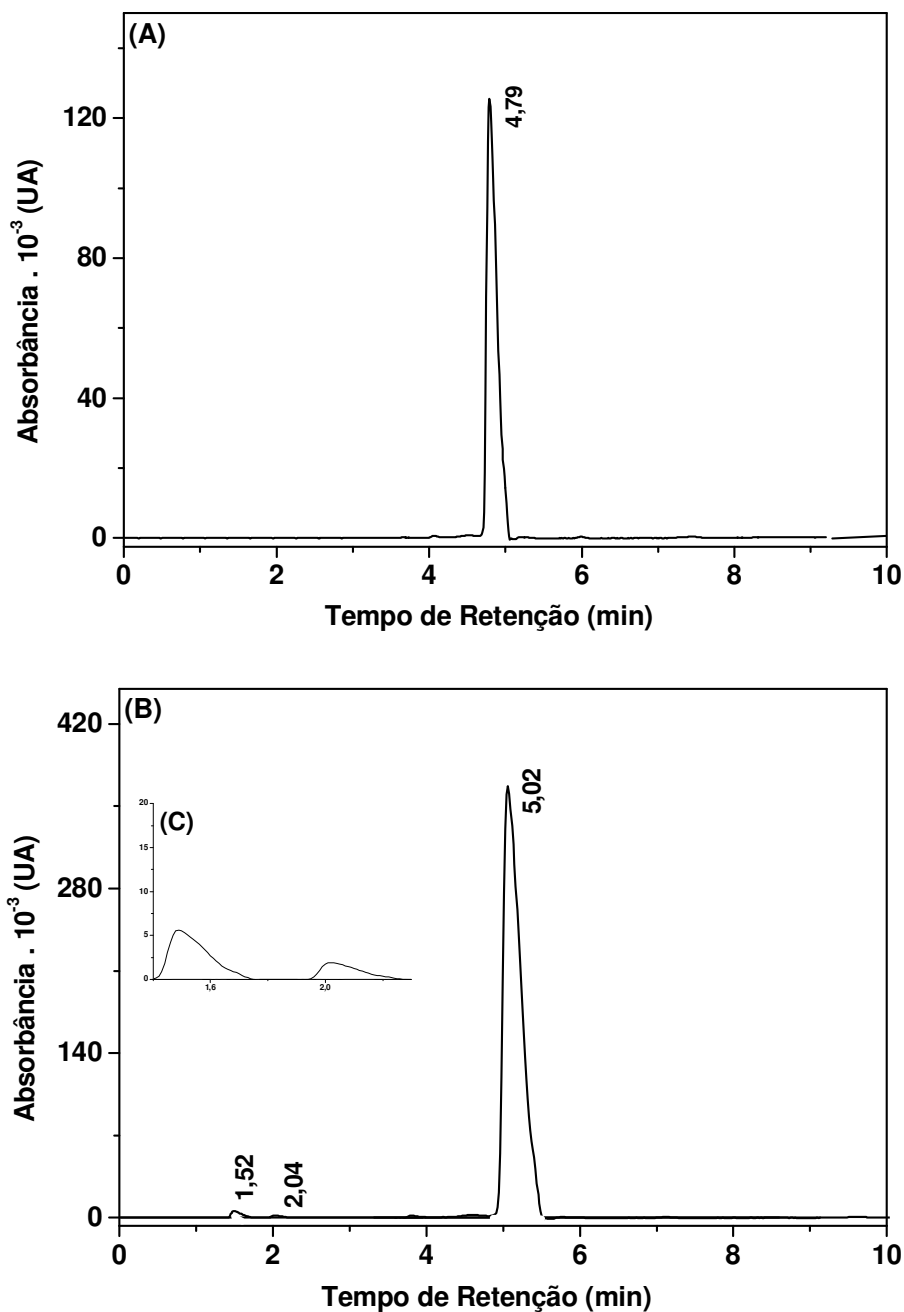


FIGURA 59- (A) Cromatograma de MIBI 100 µg mL⁻¹. (B) Cromatograma de RL de MIBI. (C) Ampliação do intervalo 1,3 e 2,3 minutos da FIG. 59B. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: (NH₄)₂SO₄: CH₃CN: C₂H₅OH (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 25 µL; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

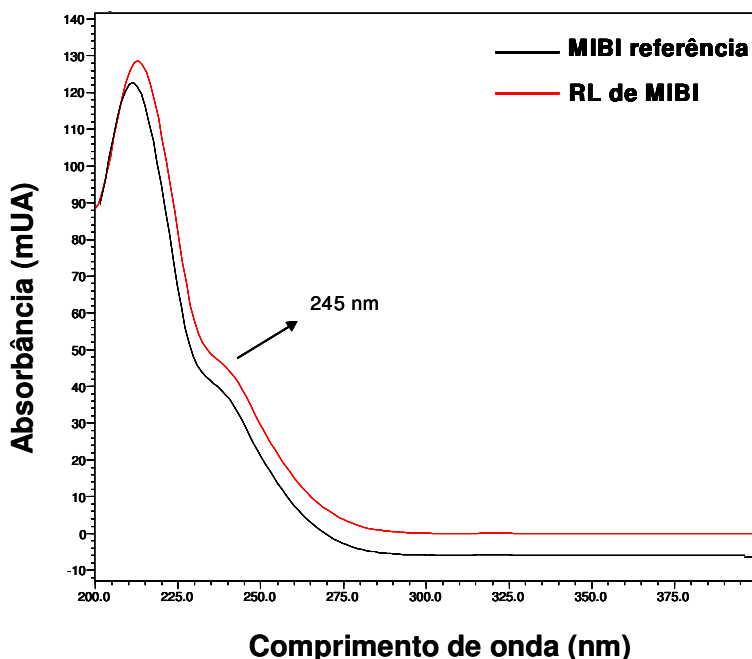


FIGURA 60- Espectros de UV-Visível de MIBI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e RL de MIBI $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Absorção em 245 nm. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: CH_3CN : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: 25 μL ; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 $^\circ\text{C}$.

No cromatograma de MIBI (FIG. 59A) foi observado um único pico em 4,79 minutos. Pasquali e colaboradores (84) utilizaram CLAE em fase reversa e fase móvel composta por acetato de amônio/acetoneitrila (gradiente 50 a 100% de acetoneitrila) e também observaram um único pico em 8,1 min. Deicas e colaboradores (85) atribuíram ao MIBI o pico em 4,9 minutos utilizando fase móvel composta com sulfato de amônio/metanol (95:5, v/v). Um pico adicional associado ao $[\text{Cu} (\text{MIBI})_3]^+$ foi encontrado somente ao utilizar outras técnicas como espectrômetro de massas, análises por infravermelho ou ressonância magnética nuclear (85).

O cromatograma de RL de MIBI (FIG. 59B) apresentou o pico em 5,76 minutos referente ao MIBI e picos com retenção em 1,52 e 2,04 minutos, que podem ser referentes ao citrato de sódio e cisteína, respectivamente, reagentes utilizados na preparação do RL, conforme descrito na TAB. 2.

Os espectros de absorvância (FIG. 60) apresentaram perfil semelhante para MIBI referência e RL de MIBI, ambos com máximo de absorção em 245 nm.

O cromatograma do Sestamibi-^{99m}Tc na concentração radioativa de 55,0 MBq mL⁻¹ está representado na FIG. 61A. A FIG. 61B é uma ampliação da região compreendida entre 1 e 4 minutos do cromatograma da FIG. 61A. A identificação das espécies no cromatograma da FIG. 61 está descrita na TAB. 38.

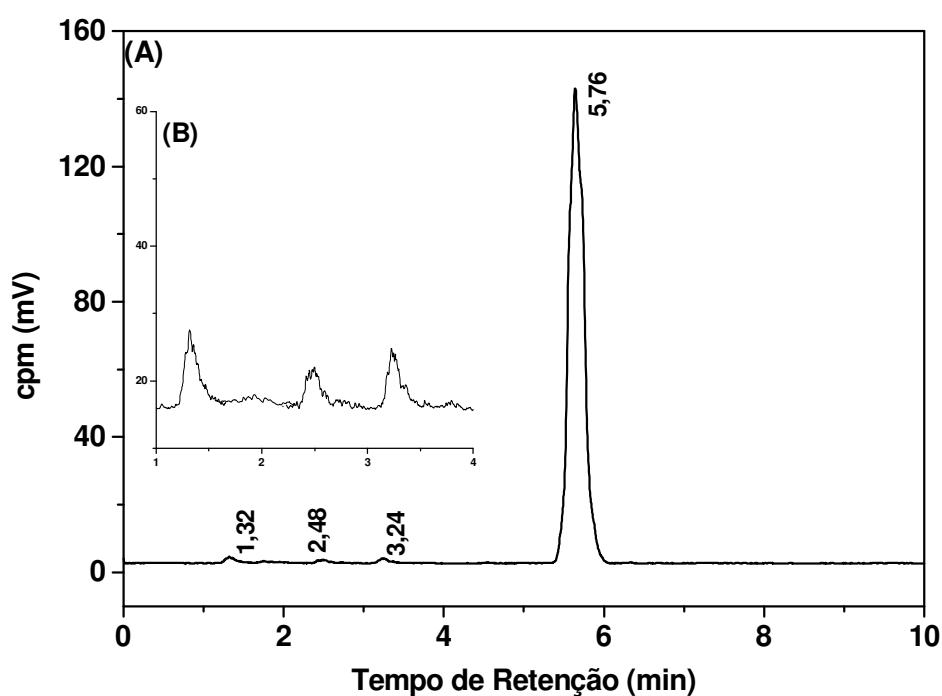


FIGURA 61- (A) Cromatograma de Sestamibi-^{99m}Tc. Concentração radioativa: 55,0 MBq mL⁻¹. (B) Ampliação do intervalo 1 e 4 minutos da FIG 61A. Identificação das espécies na TAB. 25. Condição H: coluna Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: (NH₄)₂SO₄: CH₃CN: C₂H₅OH (35: 20: 45, v/v). Fluxo da fase móvel: 1,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 25 µL; pH da fase móvel: 5,00 e temperatura do forno de coluna: 25 °C.

TABELA 38- Identificação das espécies no cromatograma de Sestamibi-^{99m}Tc.

Tempo de retenção (minutos)	Analito
1,32	^{99m} TcO ₄ ⁻ (A)
2,48	^{99m} TcO ₂ (B)
3,24	Pentamibi- ^{99m} Tc (C)
5,76	Sestamibi- ^{99m} Tc

A impureza (A), com tempo de retenção em 1,32 min (FIG. 61A e 61B, TAB. 38) foi atribuída ao ^{99m}TcO₄⁻. Segundo o método descrito na Farmacopéia Européia (37), a relação entre os tempos de retenção de Sestamibi-^{99m}Tc e da impureza (C) (Pentamibi-^{99m}Tc) deve ser no mínimo de 1,2. A relação calculada entre o tempo de retenção Sestamibi-^{99m}Tc e do tempo de retenção Pentamibi-^{99m}Tc foi de 1,78. A Farmacopéia Européia não estabelece o cálculo da porcentagem de impurezas (A) e (B) pelo método CLAE; o método CCD é utilizado para determinar a impureza (A) (^{99m}TcO₄⁻) e o método CP para determinar a impureza (B) (^{99m}TcO₂).

A eficiência de marcação do Sestamibi-^{99m}Tc foi determinada pelos métodos CLAE, CP e CCD e após 30 minutos de marcação, em três lotes de RL (1, 2 e 3) (TAB. 39).

TABELA 39- %Pureza radioquímica de Sestamibi-^{99m}Tc determinada pelos métodos CLAE, CP e CCD.

Lote	CLAE (Média ± DP)%	CP+CCD (Média ± DP)%
1	97,96 ± 0,05	98,89 ± 0,03
2	98,07 ± 0,03	98,98 ± 0,07
3	97,22 ± 0,02	98,65 ± 0,04

Observou-se que a pureza radioquímica determinada pelo método CLAE foi menor em todos os lotes analisados (TAB. 39). Isto pode ser explicado pelo fato

do método CLAE determinar simultaneamente o produto principal marcado e mais três diferentes impurezas como apresentado no cromatograma da FIG. 61. A pureza radioquímica determinada pelo método CP determina a impureza $^{99m}\text{TcO}_2$, método CCD determina a impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$, porém nenhum destes métodos determinam Pentamibi- ^{99m}Tc

Vários autores determinaram a pureza radioquímica do Sestamibi- ^{99m}Tc pelos métodos CP ou CCD (86- 89). O método CLAE é descrito na literatura por alguns autores (34, 90), porém as impurezas não foram identificadas.

5.9.2 Parâmetros de validação

O método mostrou-se seletivo para análise simultânea de Sestamibi- ^{99m}Tc e impurezas (FIG. 61).

Na FIG. 62 estão apresentadas as curvas analíticas no intervalo de concentração de 0- 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para quantificação de MIBI em RL e no radiofármaco Sestamibi- ^{99m}Tc por CLAE. A TAB. 40 apresenta os coeficientes lineares, coeficientes angulares e coeficientes de correlação das curvas analíticas da FIG. 62.

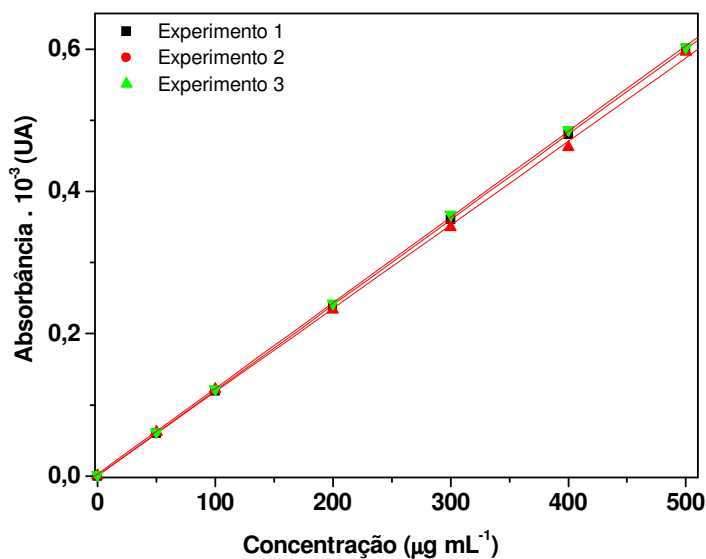


FIGURA 62- Curvas analíticas de MIBI na faixa de concentração de 0- 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

TABELA 40- Parâmetros das curvas analíticas de MIBI.

Experimento	n	a	b	r²
1	6	1,2016	0,0031	0,9999
2	6	1,1731	0,7598	0,9997
3	6	1,2056	0,2693	0,9995

n: número de amostra; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r²: coeficiente de correlação.

As curvas analíticas do princípio ativo MIBI apresentaram coeficiente de correlação r² maiores que 0,999. Os resultados de precisão e exatidão intradia para os três experimentos estão apresentados nas TAB. 41, 42 e 43.

TABELA 41– Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 1.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	98,74 \pm 1,07	1,07	98,74
200	200,01 \pm 0,98	0,49	100,01
300	298,09 \pm 0,83	0,28	99,36
400	398,46 \pm 0,96	0,24	99,62
500	499,00 \pm 1,12	0,22	99,80

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 42– Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 2.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	102,08 \pm 1,05	1,03	102,08
200	198,29 \pm 0,73	0,37	99,14
300	297,36 \pm 0,97	0,33	99,12
400	402,60 \pm 0,85	0,21	100,65
500	502,39 \pm 1,05	0,21	100,48

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

TABELA 43– Precisão (DPR) e exatidão intradia de MIBI no experimento 3.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	102,78 \pm 1,13	1,10	102,78
200	198,00 \pm 1,18	0,60	98,00
300	302,93 \pm 0,78	0,26	100,98
400	401,77 \pm 0,74	0,18	100,44
500	497,29 \pm 1,23	0,25	99,46

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

Os resultados de precisão intradia, expressos como DPR, dos três experimentos foram inferiores a 5%. Níveis de concentrações mais baixos foram os que apresentaram DPR maiores. A exatidão intradia variou de 98 a 102,78% mostrando concordância com os valores adotados como referência (CT).

Os resultados de precisão e exatidão interdia são mostrados na TAB. 44.

TABELA 44– Precisão (DPR) e exatidão interdia de MIBI referência.

CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CMD \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
100	101,20 \pm 1,08	1,07	101,20
200	198,77 \pm 0,96	0,48	99,38
300	299,46 \pm 0,86	0,29	99,82
400	400,94 \pm 0,85	0,21	100,23
500	499,56 \pm 1,13	0,23	99,91

CT: Concentração teórica
DP: desvio-padrão

CMD: concentração média determinada
DPR: desvio-padrão relativo

Os valores de DPR e exatidão interdia estão dentro da faixa de aceitação estabelecidos pela ANVISA (4). DPR máximo foi de 1,07 e exatidão de 101,20%.

O teor de princípio ativo MIBI encontrado foi de 0,97 mg, correspondendo a 97,4% do valor em bula (1,00 mg). O LD e LQ determinados foram 0,965 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3,217 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Os ensaios de estabilidade foram realizados para o método CLAE, CP e CCD (TAB. 45) 3 meses após data de fabricação.

TABELA 45- %Pureza radioquímica do Sestamibi-^{99m}Tc nos estudos de estabilidade.

Método	Pureza Radioquímica (%)	
	Data da fabricação	3 meses
CLAE	98,07 ± 0,03	97,02 ± 0,09
CP+CCD	98,98 ± 0,07	98,15 ± 0,11

Observou-se diminuição da %PRq para os métodos avaliados. Para o método CLAE e CP+CCD a redução foi de 1,07; 0,84%, respectivamente. Estes valores são baixos e não comprometeram a qualidade do radiofármaco.

Os resultados obtidos para os parâmetros de validação determinados pelo método CLAE mostraram-se confiável e pode ser utilizado na rotina de controle de qualidade de radiofármacos.

6 CONCLUSÕES

O método para quantificação de SAH e análise de pureza radioquímica de SAH-^{99m}Tc mostrou-se seletivo, linear na faixa de concentração de 0 a 20 mg mL⁻¹, preciso (DPR inferior a 4,79%) e exato (98,00- 106,50%). As condições experimentais utilizadas foram coluna Protein-Pack 300SW, modo isocrático, fase móvel constituída de cloreto de sódio (200 mmol L⁻¹) em tampão fosfato e azida de sódio (30 mmol L⁻¹) (pH 7,50), fluxo da fase móvel 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra de 100 µL, e temperatura do forno de 25 °C.

O método para a quantificação de EC e ECD e análise de pureza radioquímica de EC-^{99m}Tc e ECD-^{99m}Tc, mostrou-se seletivo, linear na faixa de concentração de 0 a 500 µg mL⁻¹, preciso (DPR inferior a 4,11%) e exato (95,38-103,65%). As condições experimentais utilizadas foram coluna Shim-pack 250 mm, modo gradiente linear de 100% fase aquosa (pH 2,50) a 100% de fase orgânica, fase móvel constituída de tampão fosfato: etanol, fluxo da fase móvel 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra de 20 µL e temperatura do forno de 25 °C.

O método proposto pela Farmacopéia Européia para quantificação de MIBI e análise de pureza radioquímica de Sestamibi-^{99m}Tc mostrou-se seletivo, linear na faixa de concentração de 0 a 500 µg mL⁻¹, preciso (DPR inferior a 1,16%) e exato (98,00- 102,78%)

Os limites de detecção e quantificação indicaram que a metodologia é eficiente para quantificar, no mínimo 19,23; 0,90; 0,94 e 3,22 µg mL⁻¹, os RL SAH, EC, ECD e MIBI, respectivamente.

A validação das metodologias de análises para os radiofármacos estudados foi executada cumprindo as recomendações da ANVISA, e encontram-se disponíveis para uso na rotina de controle de qualidade de radiofármacos produzidos na DIRF.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARQUES, F.L.N.; OKAMOTO, M.R.Y.; BUCHPIGUEL, C.A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de Tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol. Bras.**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.
2. RHODES, B.A.; COOPER, J.F.; SODD, V.J. **Radiopharmaceuticals**, Ed. Subramanian G: New York, 1975.
3. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 210, 2003. Disponível na Internet <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 24 set. 2008.
4. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 02 de junho de 2003. Disponível na internet < <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso: em 10 mar. 2008.
5. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
6. MCLEAN, J.R. Rapid assay for total unbound Tc-^{99m} in preparations of Tc-^{99m} macroaggregated albumin: concise communication. **J. Nucl. Med.**, v.19, p.1045-1048, 1978.
7. MANG'ERA, K.O.; VANBILLOEN, H.P.; BELLANDE, E.; PASQUALINI, R.; VERBRUGGEN, A.M. Influence of a ^{99m}TcN core on the biological and physicochemical behavior of ^{99m}Tc complexes of L,L-EC and L,L-ECD. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 987-993, 1996.
8. NORENBURG, J.P.; VAIDYA, M.P.; HLADIK, W.B.; PATHAK, D.R.; BORN, J. L.; ANDERSON, T.L.; CARROLL, T.R. The effect of selected preparation variables on the radiochemical purity of ^{99m}Tc-Sestamibi. **J. Nucl. Med. Technol.**, v. 33, p.34– 41, 2005.
9. HUNG, J.C.; WILSON, M.E.; BROWN, M.L.; GIBBONS, R.J. Rapid preparation and quality control method for technetium-99m-2-methoxy isobutyl isonitrile (technetium-99m-Sestamibi). **J. Nucl. Med.**, n. 32, p. 2162-2168, 1991.

10. TSOPELAS, C.; SMYTH, D. Characterization and quality control analysis of ^{99m}Tc -Bicisate. **J. Nucl. Med. Technol.**, v. 33, n. 2, p. 89– 93, 2005.
11. HAMBŮE, A.S.E.; VERBEKE, K.A.; VANDERMEIREN, R.P.; JOOSENS, E.J.; VERBRUGGEN, A.M.; DE ROO, M.J. Comparison of modified technetium-99m albumin and technetium-99m red blood cells for equilibrium ventriculography. **J. Nucl. Med.**, v.38, p.1521-1528, 1997.
12. OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. **The handbook of radiopharmaceuticals**. Ed. Chapman & Hallmedical: London, 1995.
13. WELCH, J.M.; REDVANDLY, C.S. **Handbook of Radiopharmaceuticals**, Ed. Wiley: London, 2005.
14. OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHU, P.; VEIGA, F. Radiopharmaceuticals and applications. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 2 , p.151-165, 2006.
15. CASTIGLIA, S.G.; SILVA, C.P.G.; PEREIRA, N.S.; ARAYA, G.; MENDOZA, M.; FREIRE, D.; VERDERA, S. Manual de protocolos de qualidade de radiofarmacos – produccón y control de radiofármacos, **ARCAL XV**, 1999.
16. GARCIA, E.J. Um espaço para a radiofarmácia. **Pharm. Bras.**, v. 31, p. 4-8, 2006.
17. HARPER, P.V.; LATHROP, K.A.; RICHARDS, P. ^{99m}Tc as a radiocolloid. **J. Nucl. Med.**, v. 5, p. 382-386, 1964.
18. SAHA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. Ed. Springer: New York, 1998.
19. QUINLAN, G.J.; MARTIN, G.S.; EVANS, T.W. Albumin biochemical properties and therapeutic potencial. **Hepatosol.**, v.41, p. 1211-1219, 2005.
20. CHUANG, V. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. **Pharm. Res.**, v.19, n. 5, p. 569-577, 2002.
21. [PDB] Protein Data Bank. Disponível na internet < <http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 10 de mar. 2008.
22. WANG, Y.; CHUANG, M.; CHIU, J.; CHAM, T.; CHUNG, M. On-site preparation of technetium-99m labeled human serum albumin for clinical application. **Tohoku. J. Exp. Med.**, v. 211, p. 379 – 385, 2007.
23. MÜLLER, T. Quality control of commercial ^{99m}Tc -human albumin kits. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.10, p. 551-553, 1985.

24. IO, M.; WAGNER, H. Studies of the reticuloendothelial system (res). I. measurement of the phagocytic capacity of res in man and dog. **J. Clin. Invest.**, v. 42, p. 417-426, 1963.
25. BLONDEAU, P.; BERSE, C.; GRAUL, D. Dimerisation of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine, 4-carboxylic acid. **Can. J. Chem.**, v. 45, p. 49-52, 1967.
26. VAN SCHEPDAEL, A.; VERBEKE, K.; VAN NEROM, C.; HOOGMARTE, J.; VERBRUGGEN, A. Capillary electrophoretic analysis of ethylene dicysteine, a precursor of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc ethylene dicysteine. **J. Chromatogr. B**, v. 697, p. 251-254, 1997.
27. KABASAKAL, L. Technetium-99m ethylene dicysteine: a new renal tubular function agent. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 7, p. 351-357, 2000.
28. MANG'ERA, K.O., BELLANDE, E., PASQUALINI, R., VERBRUGGEN, A. Comparison of reversed phase and reversed phase ion pair high performance liquid chromatography for analysis of TcO and TcN complexes of L,L- ethylene dicysteine di-ethylester and its acid analogues. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 1241-1244, 1996.
29. ARAÚJO, E.B. **Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólios para marcação com ^{99m}Tc . Estudo farmacocinético e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos.** 1995. Tese (Doutorado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
30. VERBRUGGEN, A.M.; NOSCO, D.D.; VAN NEROM, C.; BORMANS, G.M.; ADRIAENS, P.; DE ROO, M. Tc-99m L,L-ethylenedicysteine, a potential alternative to Tc-99m MAG3. **J. Nucl. Med.**, v. 31, p. 908-914, 1991.
31. WALOVITCH, R.C.; FRANCESCCHI, M.; CHEESMAN, E.H. Metabolism of Tc-99m-LL-ethyl cysteinyl dimer in healthy volunteers. **Neuropharmacol.**, v. 30, p. 283-292, 1991.
32. WALOVITCH, R.C.; CHEESMAN, E.H.; MAHEU, L.J.; HALL, K.M. Studies of the retention mechanism of the brain perfusion imaging agent Tc-99m-bicisate (Tc-99m-ECD). **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 14, p. S4-S11, 1994.
33. VAN NEROM, C.; BORMANS, G.M.; DE BEUKELAER, C.; DE ROO, M. VERBRUGGEN, A.M. Metabolism of Tc-99m-ECD in organ homogenates of baboon [abstract]. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.15, p. 423, 1989.
34. VERDUYCKT, T., KIEFFER, D., HUYGHE, D., CLEYNHENS, B., VERBEKE, K., VERBRUGGEN, A. E BORMANS, G. Identity confirmation of ^{99m}Tc -MAG3, ^{99m}Tc -Sestamibi and ^{99m}Tc -ECD using radio-LC-MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 669-678, 2003.

35. VANBILLOEN, H.P.; CLEYNHENS, B.J.; VERBRUGGEN, A.M. Importance of the Two Ester Functions for the Brain Retention of ^{99m}Tc -Labelled Ethylene Dicysteine Diethyl Ester (^{99m}Tc -ECD). **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 569–575, 1998.
36. **EUROPEAN PHARMACOPEIA**, 5 Ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, 2004.
37. **[ABX]** Advanced Biochemical Compounds. Disponível na internet < <http://www.abx.de>>. Acesso em: 10 mar. 2008.
38. MACHADO, L.S.; PEDRAS, D.S. V.; ANTONUCCI, J.B.; CORBO, R. Technetium-99m-MIBI in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 50, n. 3, p. 203-210, 2004.
39. SILVA, K.S.S. **Síntese do composto tetrafluoroborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi-isobutil-isonitrila) [$\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4$]: substrato utilizado na produção do radiofármaco Sestamibi- ^{99m}Tc** . 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
40. AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; KIR, M.; Clinical experience with ^{99m}Tc -MIBI imaging in patients with malignant tumours. Preliminary results and comparison with ^{201}Tl . **Clin. Nucl. Med.**, v.17, p.171-176, 1992.
41. ERBIL, Y.; KAPRAN, Y.; İŞSEVER, H.; BARBAROS, U.; ADALET, I.; DIZDAROĞLU, F.; BOZBORA, A.; ÖZARMAĞAN, S.; TEZELMAN, S. The positive effect of adenoma weight and oxyphil cell content on preoperative localization with ^{99m}Tc -sestamibi scanning for primary hyperparathyroidism. **The Am. J. Surg.**, v.195, p.34–39, 2008.
42. CASARA, D.; RUBELLO, D.; SALADINI, G.; MAZZAROTTO, R.; SOTTI, G.; TOMASELLA, G. Clinical approach in patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma and negative ^{131}I -whole body scintigraphy: importance of ^{99m}Tc -MIBI scan combined with high resolution neck ultrasonography. **Tumori.**, v. 85, p. 122-127, 1995.
43. COSTA M.G.F.; COSTA FILHO C.F.F.; MOURA JÚNIOR, L.A. Literature review of the use of scintimammography with technetium- 99m methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI) for the differential diagnosis of breast carcinoma. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 47, p. 33-42, 2001.
44. ALAM M.S; KASAGI, K.; MISAKI, T.; MIYAMOTO, S.; IWATA, M.; LIDA, Y. Diagnostic value of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile (^{99m}Tc -MIBI) scintigraphy in detecting thyroid cancer metastases: a critical evaluation. **Thyroid.** v.8, p.1091-100, 1998.
45. SASAKIMA, T.; SHIMADA, N.; NAITOH, Y.; TAKAHASHI, M.; HU, Y.; SATOH, T.; MIZOI, K. ^{99m}Tc -Sestamibi imaging for prediction of therapeutic effects of second-

generation MDR1 inhibitors in malignant brain tumors. **Int. J. Cancer**, v.121, p. 2637–2645, 2007.

46. **[ANVISA]** Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Resolução-RDC nº 46 de 18 de maio de 2000. **Diário Oficial da União**. 19 de maio de 2000. Disponível na internet < <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2008.

47. EARLY, P.J.; SODEE B.D. **Principles and practice of nuclear medicine**. Ed. Mosby Year Book: London, 1995.

48. Brito, L.C. Controle de Qualidade de Radiofármacos. UERJ, **Anais da 56ª Reunião Anual da SBPC** - Cuiabá, MT - Julho/2004.

49. **[USP]** United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeia Convention, v.1, 2007.

50. JANKOWSKY, R.; NOLL, B.; JOHANNSEN, B. Capillary electrophoresis of technetium radiopharmaceuticals. **J. Chromatogr. B**, n. 724, p. 365–371, 1999.

51. JANKOWSKY, R.; FRIEBE, M.; NOLL, B.; JOHANNSEN, B. Determination of dissociation constants of technetium radiopharmaceuticals by capillary electrophoresis **J. Chromatogr. A**, v. 833, p. 83–96, 1999.

52. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos, estratégias e validação**. Ed. UFSCar: São Carlos, 2001.

53. HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. Ed. W.H. Freeman: New York, 1995.

54. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp: São Paulo, 1990.

55. 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. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 1209-1213, 1996.

56. GILBERT, M.T. **High Performance Liquid Chromatography**. Ed. Wright: Briston, p. 125-225, 1987.

57. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. Ed. John Wiley and Sons: New York, p. 233-239, 1997.

58. BIDLINGMEYER, B.A.; DEMING, S.N.; PRICE, W.P.; SACHOK, B.; PETRUSEK, M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. **J. Chromatogr**, v.189, p. 419-434, 1979.
59. CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC**. Ed. Edgard Bülcher: São Paulo, 1998.
60. DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia, um breve ensaio. **Quim. Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
61. BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POSELE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. Meio Amb.**, v. 13, p. 126-146, 2003.
62. **[ICH]** International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: Definitions and terminology. Q2A (CPM/ICH/381/95), 1995.
63. THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. [IUPAC] International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.
64. GREEN, J.M. A Practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.
65. European Commission. **Official Journal of the European Communities**, L22, p. 1-36, 2002.
66. **[INMETRO]** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003.
67. PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIRROLD, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008
68. **[FDA]** United States Food and Drug Administration (US-FDA), Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services; *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May, 2001.
69. LEITE, F. **Validação em análise química**. Ed. Átomo: Campinas, 2002.
70. VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: Genaro, A.R. Remington's: **The science and practice of pharmacy**. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, p. 986- 994, 2000.

71. CONTOINS, J.H.; HARTIGAN, L.V.; SNYDER, L.M.; THOMPSON, M.J. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. **Clin. Chim.**, v. 367, p. 150-155, 2006.
72. GIRARD, M.; CYR, T.; MOUSSEAU, N.; ETHIER, J.C. Separation of human serum albumin components by RP-HPLC and CZE and their characterization by ESI-MS. **Chromatogr. Suppl. I**, v. 49, S-21-27, 1999.
73. STRYER, L. **Biochemistry**. Ed. W.H. FREEMAN: New York, 2007.
74. TANAKA, K.; SAWATANI, E.; SHIGUEOKA, E.M.; DIAS, G.A.; ARASHIRO, F. Quality evaluation of albumin 20% and Immunoglobulin G 5% by means of liquid chromatography method: data from five years period-study. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 104-110, 2004.
75. SVIRIDOV, D.; MEILINGER, B.; DRAKE, S.K.; HOEHN, J.T.; HORTIN, G.L.. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 3, p. 389-397, 2006.
76. 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.**, v. 30, p. 599- 604, 1989.
77. KNOX, J.H.; JURAND, J. Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance ion-pair systems. **J. Chromatogr.**, v. 149, p. 297-312, 1978.
78. MANG'ERA, K.O.; TASSAERY, S.; CLEYNHENS, B.; VERBRUGGEN, A.; VERBEKE, K. Comparative evaluation of ^{99m}Tc-ethylene bis-1-cysteine and ^{99m}Tc-ethylene bis-1-b-homocysteine during reversed phase HPLC analysis and electrophoresis at various pH conditions. **J. Labelled Cpd. Radiopharm.**, v. 44, p. 257-264, 2001.
79. MARZILLI, L.G.; BANASZCZYK, L.H.; KUKLENYIK, R.C.; TAYLOR, A. Linking deprotonation and denticity of chelate ligands. Rhenium (V) oxo analogues of technetium-99m radiopharmaceuticals containing N₂S₂ chelate ligands. **Inorg. Chem.**, v. 33, p. 4850-4860, 1994.
80. VAN SCHEPDAEL, A.; VERBEKE, K.; VAN NEROM, C.; HOOGMARTENS, J.; VERBRUGGEN, A. Capillary electrophoretic analysis of ethylene dicycysteine, a precursor of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc ethylene dicycysteine. **J. Chromatogr. B**, v. 697, p. 251-254, 1997.
81. VANDERGHINSTE, D.; VAN EECKHOUDT, M.; TERWINGHE, MORTELMANS, L.; BORMANS, G.M; VERBRUGGEN, A.M.; VANBILLOEN, H.P. An efficient HPLC method for the analysis of isomeric purity of technetium-99m-exametazime and

identity confirmation using LC- MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 679-685, 2003.

82. KOSLOWSKY, I.L.; STEPHANIE, E.B.; BITNER, S.J. Evaluation of the stability of ^{99m}Tc -ECD and stabilized ^{99m}Tc -HMPAO stored in syringes. **J. Nucl. Med. Technol.**, n. 29, p. 197–200, 2003.

83. VERBRUGGEN, A.M.; NOSCO, D.L.; VAN NEROM, C. G.; BORMANS, G.M.; ADNAENS, P.J.; DC ROO, M.J. Technetium-99m-L,L-Ethylenedicysteine: A renal imaging agent. I. Labeling and Evaluation in Animals **J. Nucl. Med.**, v. 33, p. 551-557, 1992.

84. PASQUALLI, M.; FERRETT, V.; DUATTI, A. Synthesis, characterization and X-ray crystal structure of the trigonal-planar copper (I) complex $[\text{Cu}(\text{MIBI})_3]^+$ (MIBI = 2-methoxyisobutylisocyanide). **Polyhedron**, v. 27, p. 2667-2671, 2008.

85. DEICAS, B.; GAMBINO, D.; KREMER, A.C.; KREMER, E.; MOMBRÚ, A.; SUESCUN, L.; MARIEZCURRENA, R.; LEÓN, A. Synthesis, characterization and spectroscopic properties of $[\text{Cu}(\text{alkylisocyanide})_4]\text{BF}_4$ complexes. X-ray crystal structures of $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$ and $[\text{Cu}(\text{CPI})_4]\text{BF}_4$. **Polyhedron**, v. 16, n. 14, p. 2397-2403, 1997.

86. UNAK, P.; ENGINARA, H.; BIBER, F.Z.; LAMBRECHTA, F.Y.; ASLANIA, M.A.A.; OZKILIC, H. A correlative study between ^{99m}Tc -ESTCPTA and ^{99m}Tc -MIBI in rats. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 57, p. 733-737, 2002.

87. LIMA, M.J.C.; MARQUES, F.L.N.; OKAMOTO, M.R.Y.; GARCEZ, A.T.; SAPIENZA, M.T.; BUCHPIGUEL, C.A. Preparation and evaluation of modified composition for lyophilized kits of $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$ for ^{99m}Tc technetium labeling. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, p. 1-8, 2005.

88. LUEBKE, A.L.; WILARY, D.M.; MAHONEY, D.W.; HUNG, J.C. Evaluation of an Alternative Radiochemical Purity Testing Method for Technetium-99m-Sestamibi. **J. Nucl. Med. Technol.**; v. 28, p. 259–263, 2000.

89. PROULX, A.; BALLINGER, J.R.; GULENCHYN, K.Y. Routine Determination of Radiochemical Purity of ^{99m}Tc -MIBI. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 40, n. 1, p. 95-97, 1989.

90. HUNG, J. C.; WILSON, M. E.; BROWN, M. L.; GIBBONS, R. J. Rapid preparation and quality control method for Technetium-99m-2-Methoxy Isobutyl Isonitrile (Technetium-99m-Sestamibi). **J. Nucl. Med.**, v. 32, p. 2162- 2165, 1991.