

Controle de Qualidade de EC-^{99m}Tc: determinação de pureza radioquímica e investigação da influência de impurezas na biodistribuição

Quality Control of ^{99m}Tc-EC: Determination of radiochemical purity and investigation of the influence of impurities in the biodistribution

Érika V. Almeida, Elisiane G. Monteiro, Edson V. Alves, Natanael G. da Silva, Neuza T. O. Fukumori, Marycel F. de Barboza, Jair Mengatti, Margareth M. N. Matsuda e Marina B. A. Vasconcellos

Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN-CNEN) – São Paulo (SP), Brasil

Resumo

Radiofármacos de tecnécio meta-estável (^{99m}Tc) são os mais utilizados para a obtenção de imagens em Medicina Nuclear. L,L-etilenodocisteína (EC) marcado com ^{99m}Tc (EC-^{99m}Tc) é usado para avaliar funções renais. O objetivo deste estudo foi determinar a pureza radioquímica (PRq) do EC-^{99m}Tc por cromatografia em papel (CP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), investigar a influência de impurezas na qualidade das imagens cintilográficas e na biodistribuição em ratos. A determinação da PRq do EC-^{99m}Tc por CP foi desenvolvida utilizando-se papel Whatman 1MM e 3MM. A fase móvel utilizada foi acetona e ácido acético 0,5 mol L⁻¹ para determinação de ^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂, respectivamente. As análises por CLAE foram executadas em equipamento Shimadzu (LC-20AT Prominence). A fase móvel foi constituída por tampão fosfato 12,5 mmol L⁻¹ e etanol. Utilizou-se fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e gradiente linear. Os ensaios biológicos foram desenvolvidos em ratos *Wistar* (250 g) obtidos do biotério do IPEN-CNEN/SP. Injetou-se intravenosamente 0,370 MBq mL⁻¹ de EC-^{99m}Tc. Os resultados das análises por CP Whatman 1MM e 3MM mostraram PRq do EC-^{99m}Tc de até (98,76 ± 0,29)% e (98,70 ± 0,31)%, respectivamente. Os tempos de retenção para ^{99m}TcO₄⁻ e EC-^{99m}Tc foram 3,04; 5,08 e 10,06 minutos, respectivamente, para as análises por CLAE e a eficiência máxima de marcação foi (98,99 ± 0,04)% aos 30 minutos. EC-^{99m}Tc se distribui rapidamente no compartimento plasmático e os estudos de biodistribuição mostraram distribuição normal de dose injetada nos órgãos especificados. Ambos os métodos, CP e CLAE, podem ser utilizados na rotina do controle de qualidade para determinação de PRq por serem precisos e rápidos. Os controles de qualidade biológicos mostraram a aplicação para exame diagnóstico da dinâmica da função renal.

Palavras-chave: Medicina nuclear, EC-^{99m}Tc, radiofármaco, pureza radioquímica, biodistribuição.

Abstract

Radiopharmaceuticals of meta-stable technetium (^{99m}Tc) are the most frequently used to obtain images in Nuclear Medicine. L, L-etilenodocisteína (EC) labeled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc-EC) is used to assess kidneys function. The aim of this study was to determine the radiochemical purity (RCP) of ^{99m}Tc-EC by paper chromatography (PC) and high performance liquid chromatography (HPLC), to investigate the influence of impurities on the quality of scintigraphy images and biodistribution in rats. The determination of the RCP of ^{99m}Tc-EC (^{99m}Tc-EC RCP) by PC was developed in Whatman 1MM and 3MM chromatographic paper. The mobile phase used was acetone and 0.5 mol L⁻¹ acetic acid for determination of ^{99m}TcO₄⁻ and ^{99m}TcO₂, respectively. The analyses by HPLC were carried out in Shimadzu equipment (Prominence LC-20AT). The mobile phase was composed of 12.5 mmol L⁻¹ phosphate buffer and ethanol. 1.0 mL min⁻¹ flow rate and linear gradient were used. The biological tests were performed by injection of 0.370 MBq mL⁻¹ ^{99m}Tc-EC intravenously in *Wistar* rats (250 g) provided by the Animal Facility of IPEN-CNEN/SP. The results of analyses by Whatman 1MM and 3MM PC showed RCP of ^{99m}Tc-EC up to (98.76 ± 0.29)% and (98.70 ± 0.31), respectively. Retention times of ^{99m}TcO₄⁻, ^{99m}TcO₂ and ^{99m}Tc-EC were 3.04, 5.08 and 10.06 minutes, respectively, in HPLC analyses and the maximum labeling efficiency of ^{99m}Tc-EC was (98.99 ± 0.04)% at 30 minutes. Tc99m-EC is rapidly reaches the plasma compartment and the biodistribution studies showed normal distribution of the injected dose in specified organs. Both PC and HPLC methods can be used in the routine quality control for determination of RCP as they showed to be accurate and fast. The biological quality controls showed application for diagnostic examination of the renal function dynamics.

Keywords: Nuclear medicine, ^{99m}Tc-EC, radiopharmaceutical, radiochemical purity, biodistribution.

Introdução

Radiofármacos de tecnécio meta-estável (^{99m}Tc) são os mais utilizados para a obtenção de imagens em Medicina Nuclear. ^{99m}Tc é um radioisótopo emissor de radiação gama (γ) pura com fótons de 140 keV, meia-vida física de 6 horas e possibilidade de vários estados de oxidação. Em solução aquosa, o $^{99m}\text{Tc(VII)}$ e $^{99m}\text{Tc(IV)}$ são os mais estáveis^{1,2}.

O dímero L,L-etilenodicisteína (EC) marcado com ^{99m}Tc na forma pentavalente [$^{99m}\text{Tc(V)EC}$] pode ser obtido pela adição de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) comercialmente disponível em geradores de molibdênio/tecnécio ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$). A Figura 1 apresenta a estrutura do radiofármaco EC- ^{99m}Tc , usado para avaliar algumas funções renais como filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular³.

A reação de complexação do ^{99m}Tc com (EC) pode não ser eficiente, em consequência da qualidade do eluído, de componentes do reagente liofilizado (RL) ou de procedimentos inadequados utilizados na marcação. Nestes casos pode ocorrer a formação de impurezas radioquímicas dentre as quais se destacam pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) decorrente da não complexação e óxido de tecnécio ($^{99m}\text{TcO}_2$). A determinação de impurezas radioquímicas é essencial para comprovar a qualidade do produto⁴.

Algumas técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para determinar a PRq do EC- ^{99m}Tc . Almeida *et al.* desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de algumas impurezas do EC- ^{99m}Tc ⁵.

O objetivo deste estudo foi determinar a PRq do EC- ^{99m}Tc por cromatografia em papel (CP) e CLAE, investigar a influência de impurezas na qualidade das imagens cintilográficas e na biodistribuição em ratos.

Material e métodos

Reagentes

RL de EC e $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ foram obtidos do IPEN-CNEN/SP (Brasil). Acetona, ácido acético, etanol e outros reagentes utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha). A água foi purificada em sistema Milli-RX da Millipore (França).

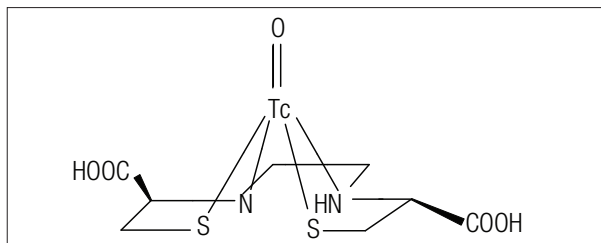


Figura 1. Estrutura de L,L-EC- ^{99m}Tc [3].

Cromatografia em papel

A determinação da pureza radioquímica do EC- ^{99m}Tc por CP foi desenvolvida utilizando-se papel Whatman (17,5 x 1,5 cm) 1MM e 3MM. A fase móvel aplicada foi acetona (P.A.) e ácido acético 0,5 mol L⁻¹ para determinação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$, respectivamente. A cromatografia foi desenvolvida 30, 60 e 240 minutos após a marcação. Após a secagem, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm, colocados em tubos e levados ao contador gama (Auto-Gamma Cobra II, 5002 Series, Perkin Elmer).

A porcentagem de impureza foi calculada considerando o R_f (fator de retardamento) do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (R_f 1,0) e do $^{99m}\text{TcO}_2$ (R_f 0,0), conforme Equações 1 e 2, respectivamente.

$$^{99m}\text{TcO}_4^- (\%) = \frac{\text{Radioatividade } R_f 1,0}{\text{Radioatividade total}} \quad (1)$$

$$^{99m}\text{TcO}_2 (\%) = \frac{\text{Radioatividade } R_f 0,0}{\text{Radioatividade total}} \quad (2)$$

A PRq foi obtida através da Equação 3.

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

Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise foi executada em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-20AT Prominence (Japão), composto por duas bombas, degaseificador modelo DGU-20A₅, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, coluna cromatográfica de fase reversa Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, 5 μm), detector UV-visível modelo SPD-M20A e detector de radioatividade Bioscan modelo B-FC-3300.

A fase móvel foi constituída por tampão fosfato 12,5 mmol L⁻¹ (fase aquosa) (pH 2,50) e etanol (P.A.) (fase orgânica). Utilizou-se fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e gradiente linear (100% fase aquosa a 100% fase orgânica) durante 15 minutos. 20 μL de amostra foram injetados. Todas as amostras foram previamente filtradas em unidades filtrantes de tamanho de poro de 0,22 μm . (Millipore). As análises foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicatas.

A porcentagem de PRq foi calculada utilizando-se o programa LCSolutions da Shimadzu.

Imagens cintilográficas e biodistribuição

Os ensaios biológicos foram desenvolvidos em ratos *Wistar* (250 g) obtidos do biotério do IPEN-CNEN/SP. Injetou-se intravenosamente 0,370 MBq mL⁻¹ de EC- ^{99m}Tc . Os animais foram mantidos anestesiados e as imagens cintilográficas foram obtidas em gama câmara (Gamma

Câmara Nucline TH 22 Mediso) após 30 minutos. Os animais foram sacrificados depois de 1 hora e a atividade dos órgãos medidos em contador gama Capintec. Os resultados foram expressos como % de dose injetada (%DI) nos diferentes órgãos.

Resultados

Os valores de PRq e das impurezas ^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂ obtidos na análise por CP em papel Whatman 1MM e 3MM, 30, 60 e 240 minutos após a marcação estão apresentados na Tabela 1.

O cromatograma do EC-^{99m}Tc após 30 minutos de marcação na concentração radioativa de 55 MBq mL⁻¹ está apresentado na Figura 2.

A Figura 3 apresenta a imagem cintilográfica para EC-^{99m}Tc em rato *Wistar*.

A biodistribuição de EC-^{99m}Tc em diferentes órgãos (%DI) está apresentada na Figura 4.

Discussão e conclusões

A fase estacionária comumente usada para análise de pureza radioquímica (PRq) do EC-^{99m}Tc é a ITLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography- Silica Gel). Entretanto o fornecedor (Pall Corporation) não produzirá mais este material, sendo assim necessário o desenvolvimento de um método alternativo para o controle de qualidade.

Os resultados das análises por CP 1MM e 3MM (Tabela 1) mostraram PRq do EC-^{99m}Tc de até (98,76 ± 0,29)% e (98,70 ± 0,31)%, respectivamente. Ambas as fases estacionárias têm-se mostrado eficientes no processo de separação do produto/impureza e não foi observada diferença significativa entre 1MM e 3MM.

A análise por CLAE (Figura 2) apresentou espécies com tempos de retenção em 3,04; 5,08 e 10,06 minutos, correspondentes ao ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e EC-^{99m}Tc, respectivamente. A espécie em 11,68 minutos não foi identificada. Os resultados revelaram que EC-^{99m}Tc apresentou eficiência máxima de marcação de (98,99 ± 0,04)% aos 30 minutos enquanto que a eficiência diminuiu para (98,56 ± 0,05)% após 240 minutos da marcação.

Tabela 1. Comparação da média e do desvio-padrão da %PRq de EC-^{99m}Tc, %^{99m}TcO₄⁻ e %^{99m}TcO₂ obtida por CP.

Papel	Tempo (min)	% PRq	% ^{99m} TcO ₄ ⁻	% ^{99m} TcO ₂
1MM	30	98,36 ± 0,43	0,48 ± 0,22	1,17 ± 0,24
	60	98,76 ± 0,29	0,28 ± 0,26	0,96 ± 0,04
	240	98,34 ± 0,35	0,44 ± 0,11	1,22 ± 0,31
3MM	30	98,56 ± 0,29	0,13 ± 0,03	1,32 ± 0,29
	60	98,70 ± 0,31	0,22 ± 0,06	1,09 ± 0,32
	240	98,25 ± 0,33	0,23 ± 0,15	1,52 ± 0,22

n=3

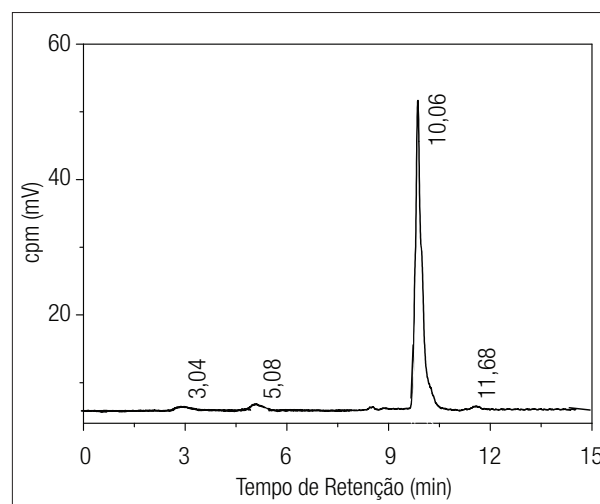


Figura 2. Cromatograma de EC-^{99m}Tc. Coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel: Na₂HPO₄ (0,0125 mol L⁻¹); C₂H₅OH, gradiente linear: 100% fase aquosa a 100% fase orgânica. Fluxo da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 μL.

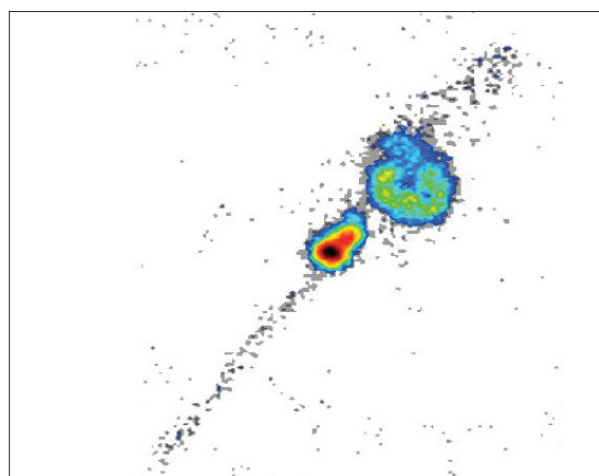


Figura 3. Imagem cintilográfica para EC-^{99m}Tc em rato *Wistar*.

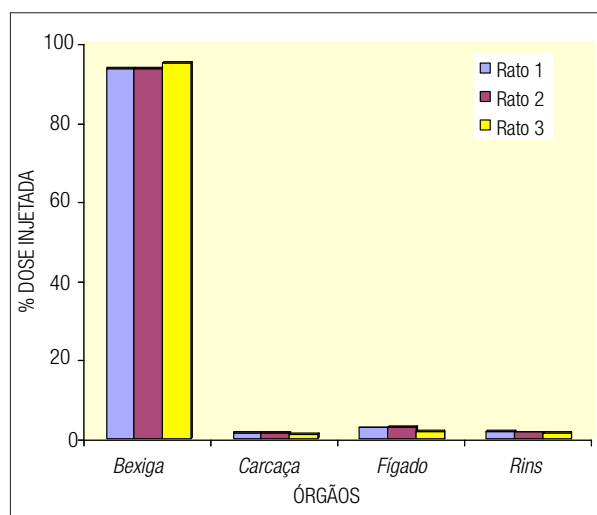


Figura 4. Biodistribuição de EC-^{99m}Tc em ratos *Wistar*.

EC-^{99m}Tc se distribuiu rapidamente no compartimento plasmático e a imagem cintilográfica (Figura 3) mostrou captação renal e eliminação via rins-ureteres-bexiga. A porcentagem média de dose injetada (Figura 4) foi superior a 96% nos rins e bexiga, muito superior ao limite especificado pelo IPEN-CNEN/SP (rins + bexiga \geq 80%). A captação no fígado foi 2,55% da dose injetada também abaixo do limite especificado (\leq 5%). Não foi observada captação nas glândulas salivares e glândula tireóide o que poderia ocorrer na presença de quantidade significativa de pertecnetato livre. Os estudos de biodistribuição (Figura 4) mostraram distribuição normal de dose injetada nos órgãos especificados.

Neste trabalho foram feitos o controle de qualidade radioquímico utilizando as técnicas CP e CLAE e o controle biológico (imagem cintilográfica e biodistribuição) do EC-^{99m}Tc produzido pelo IPEN-CNEN/SP.

Ambos os métodos, CP e CLAE, podem ser utilizados na rotina do controle de qualidade para determinação de PRq por serem precisos e rápidos. Os controles de qualidade biológicos mostraram a aplicação para exame diagnóstico da dinâmica da função renal.

Agradecimentos

Ao IPEN e à DIRF pela infraestrutura, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido a Érika V. Almeida.

Referências

1. Owunwanne A, Patel M, Sadek S. The handbook of radiopharmaceuticals. New York: Chapman & Hallmedical; 1995.
2. Oliveira R, Santos D, Ferreira D, Coelho PMB, Veiga F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Braz J Pharm Scien* 2006; 42:151-65.
3. Mang'era KO, 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* 1996; 14: 1241-4.
4. Marques FLN, Okamoto MRY, Buchpiguel CA. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidades. *Rev Bras Cienc Farm* 2001; 34(4):233-9.
5. Almeida EV, Fukumori NTO, Mengatti J, Silva CPG, Matsuda MMN. Development and validation of ^{99m}Tc ethylene dicysteine and EC determination method by HPLC. *J Nucl Med Mol Imag* 2008; 52:68-9.