



EXPANDINDO A APLICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA NO CONTROLE DE QUALIDADE EM UMA INDÚSTRIA RADIOFARMACÊUTICA.

Ana Olívia G. Morais¹, Cassiano L.S. Costa¹, Marina B. Silveira¹

¹ Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR)
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627
anagoesmorais@outlook.com.br

Palavras-Chave: CLAE, Radiofarmácia, Controle de Qualidade.

RESUMO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica usada para separar, identificar e quantificar cada um dos componentes de uma mistura. Esta técnica, quando acoplada a um detector de radiação (Cintilador), pode ser utilizada rotineiramente na avaliação da identidade e da pureza radioquímica de radiofármacos. De acordo com a Farmacopeia Brasileira, a meia-vida física deve ser determinada usando um sistema adequado e calibrado. Nesse contexto, acredita-se que o sistema CLAE-Cintilador pode ser empregado na avaliação da identidade radionuclídica de radiofármacos. Assim, esse trabalho possui como objetivo verificar a existência de uma relação linear entre a área do cromatograma obtida pelo sistema CLAE-Cintilador e a atividade fornecida por um Calibrador de Dose (Curiômetro). Para a realização dos experimentos, foram utilizados dois radiofármacos: [¹⁸F]PSMA-1007 e [¹⁸F]fluoroestradiol, ambos produzidos pela Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Um total de 5 lotes foram utilizados, analisados no mínimo em quintuplicada. Para cada corrida cromatográfica registrou-se a área e o horário de eluição do pico do analito de interesse, nesse mesmo horário foi registrada a atividade obtida pelo Curiômetro. Os resultados obtidos foram tratados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, pelo qual foi possível constatar a existência de uma relação matemática polinomial entre a área do pico e sua correspondente atividade. O coeficiente de correlação variou na faixa de 0,9867 a 0,9998, indicando que as equações obtidas podem ser consideradas adequadas como modelo matemático. Sendo assim, é possível a determinação da atividade das amostras a partir da área do cromatograma, uma vez que as duas variáveis apresentam uma proporcionalidade, ou seja, à medida que a área do cromatograma diminui a atividade também diminuirá. Esse comportamento já era esperado; entretanto, não segue a curva de decaimento do radionuclídeo ¹⁸F. Esse desvio pode ser atribuído a diversos fatores como a idade dos sistemas de detecção. Cabe destacar ainda que a constatação da proporcionalidade obtida é benéfica a outras atividades desenvolvidas em uma radiofarmácia, como a avaliação da precisão em processos de validação analítica de metodologias de análise para o controle de qualidade de radiofármacos.

1. INTRODUÇÃO

Radiofármacos são definidos como preparações farmacêuticas empregadas em diagnósticos e terapias que contêm radionuclídeos, isótopos capazes de atingir a estabilidade através da emissão de radiação [1]. Esses compostos apresentam grande importância para a medicina já que seu uso permite uma avaliação não invasiva de diferentes órgãos, facilitando assim a investigação de enfermidades [2]. Com isso, a fim de assegurar a segurança de seu uso, torna-se importante também o Controle de Qualidade (CQ) do produto. De acordo com a farmacopeia Americana, os testes de características visuais, de pH, de pureza radioquímica, de identidade radionuclídica, de atividade específica, de solventes residuais e de pureza química devem ser realizados antes da liberação do medicamento para uso [3].

Uma das técnicas analíticas utilizadas no CQ de diferentes produtos farmacêuticos é a cromatografia, cujo princípio envolve a separação de compostos por meio de sua distribuição



entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. Essa separação ocorre por diferentes tipos de interação que o analito pode ter com as fases, o que acarreta diferentes tempos de retenção para cada um dos constituintes da mistura. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas cromatográficas amplamente empregada no CQ de radiofármacos, devido à sua capacidade de separação e identificação de compostos presentes em misturas. A CLAE utiliza bombas para realizar a eluição da fase móvel (FM) por uma coluna contendo a fase estacionária (FE), que possibilita uma separação mais eficiente devido à alta superfície de contato da FE, decorrente da presença de poros na faixa de μm . Os compostos separados por esse sistema podem ser identificados por um detector, cujo princípio de funcionamento pode se basear na medição de diferentes propriedades dos compostos, como a absorção de energia, o índice de refração, a condutividade, dentre outras [4].

No contexto da radiofarmácia, a utilização da CLAE é ampliada quando também se tem acoplamento com um detector de radiação, tendo em vista que os compostos a serem identificados são radioativos. Nesse sentido, pode-se acoplar à CLAE um cintilador de iodeto de sódio, um cristal inorgânico capaz de converter a radiação ionizante em luz. Ele possui um alto rendimento quântico de conversão, ou seja, apresenta elevada eficiência na conversão da radiação ionizante em luz, além de apresentar uma boa resolução. Esse processo ocorre devido à estrutura eletrônica do cristal, uma vez que seus elétrons ao absorverem a energia emitida pela amostra passam da banda de valência para a banda de condução e o retorno desse elétron para sua banda de origem resulta na emissão de luz, que é posteriormente convertida em um sinal elétrico. Por fim, esse sinal é plotado em um gráfico, pelo qual se pode observar as diferentes intensidades do sinal ao longo do tempo, resultando em um cromatograma referente aos compostos radioativos na amostra [5].

Esse novo sistema torna-se essencial para o CQ em uma radiofarmácia, já que possibilita a realização dos testes de pureza radioquímica, de identidade radionuclídica e de atividade específica, preconizados pela Farmacopeia. O que torna necessário se ter equipamentos adequados e devidamente calibrados para a realização de testes de meia vida física. Atualmente, esse parâmetro é realizado em um calibrador de dose (Curiômetro), que consiste em câmara de ionização de poço preenchida com argônio, um gás inerte que é ionizado quando em contato com a radiação ionizante liberada pela amostra [6].

Sendo assim, esse trabalho propôs a verificação da existência de uma relação linear entre a área do cromatograma obtida por sistemas CLAE-Cintilador e a atividade indicada por um calibrador de dose (Curiômetro).

2. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no cromatógrafo Agilent HP 1200 acoplado ao detector Raytest-Gabi Star (fig.1 A), para apenas 1 lote de [^{18}F]PSMA-1007 (fig. 1 D), cuja FM consiste em uma solução de tampão fosfato de sódio com pH 2,5 e Acetonitrila, bombeada no modo gradiente e em uma coluna Zorbax C18 ($150 \times 4,6$) mm, resultando em uma corrida de 12 minutos. Já para o [^{18}F]fluoroestradiol (fig. 1 C), um total de 5 lotes foram utilizados, o cromatógrafo foi o Shimadzu LC-40 Nexera acoplado ao detector Flow-Ram (fig. 1B), utilizando uma FM constituída de Acetonitrila e Água (65:35) no modo isocrático, em uma coluna Luna C18 ($250 \times 4,6$) mm mantida à temperatura de $45\text{ }^\circ\text{C}$, o que resultou em uma corrida de 8 minutos. Para ambos os sistemas, um volume $20\mu\text{L}$ de radiofármaco foi empregado na análise. As atividades correspondentes foram obtidas pelo Curiômetro Capintec CRC®-25R (fig. 2), por meio da inserção de uma alíquota de $200\mu\text{L}$ do radiofármaco no equipamento.

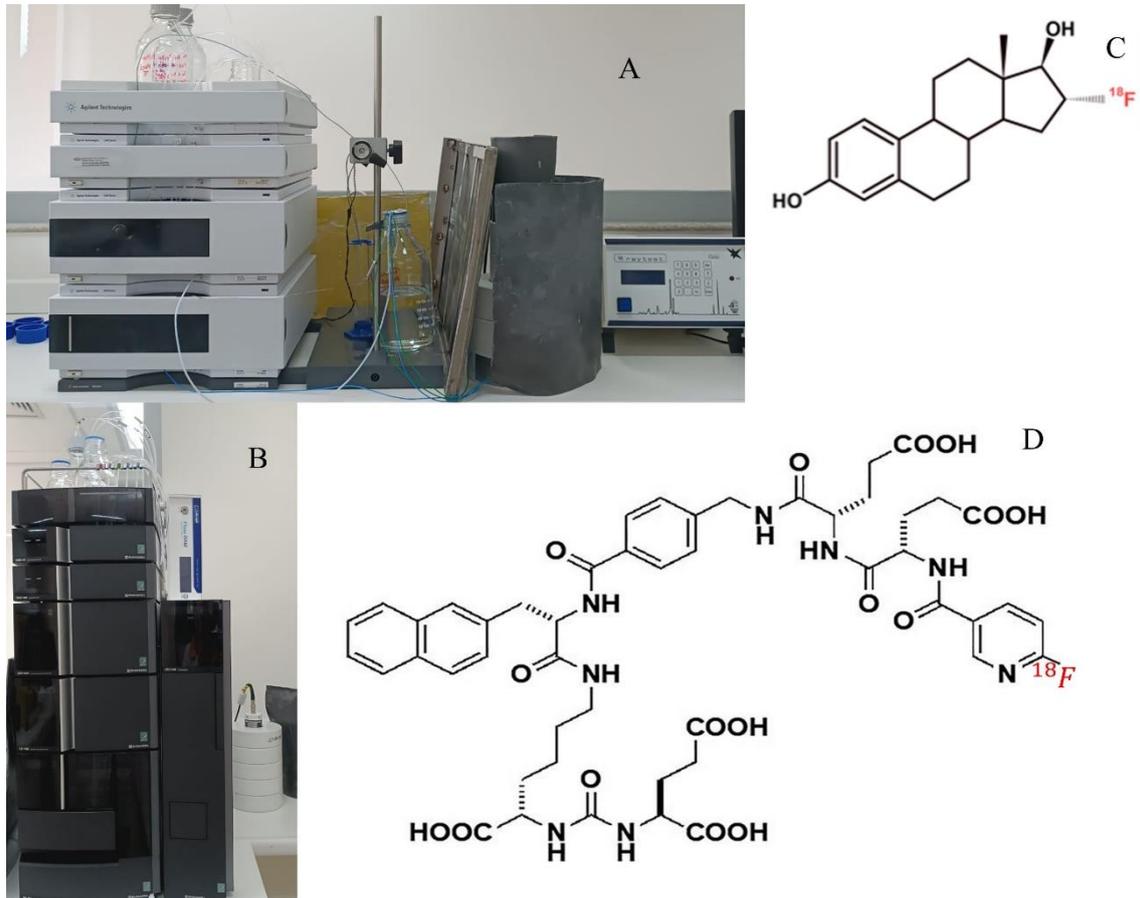


Fig. 1- Cromatógrafos (A) Agilent 1200, (B) Shimadzu Nexera, (C) Estrutura Molecular [18F]fluoroestradiol, (D) [18F]PSMA-1007



Fig. 2 - Calibrador de dose (Curiômetro) Capintec CRC®-25R.

O mínimo de 5 corridas cromatográficas foram realizadas. Para cada uma delas, foram coletados dados referentes à área e o tempo de retenção do pico do radiofármaco, bem como a sua correspondente atividade indicada no Capintec. Posteriormente, os dados obtidos foram tratados pelo método dos mínimos quadrados ordinários.



3. RESULTADOS

A tab. 1 compila os resultados obtidos para o experimento com [¹⁸F]PSMA-1007.

Tab.1 - Resultados do experimento utilizando o lote PSMA290524.

Área (C/S*s)	Atividade (mCi) 200 µL	Atividade (MBq) 200 µL	Atividade (mCi) 20 µL	Atividade (MBq) 20 µL	Hora
82592,54	6,37±0,10	235,69±3,77	0,637±0,010	23,569±0,377	09:53
74341,66	5,67±0,09	209,79±3,36	0,567±0,009	20,979±0,355	10:12
67035,39	5,15±0,08	190,55±3,05	0,515±0,008	19,055±0,304	10:28
58482,37	4,70±0,07	173,90±2,78	0,470±0,007	17,390±0,278	10:41
48866,73	4,26±0,07	157,62±2,52	0,426±0,007	15,762±0,252	10:58

A fig. 3 abaixo mostra o gráfico obtido pela Área (C/S*s) x Atividade (mCi) 20 µL, referentes aos dados mostrados na tab. 1.

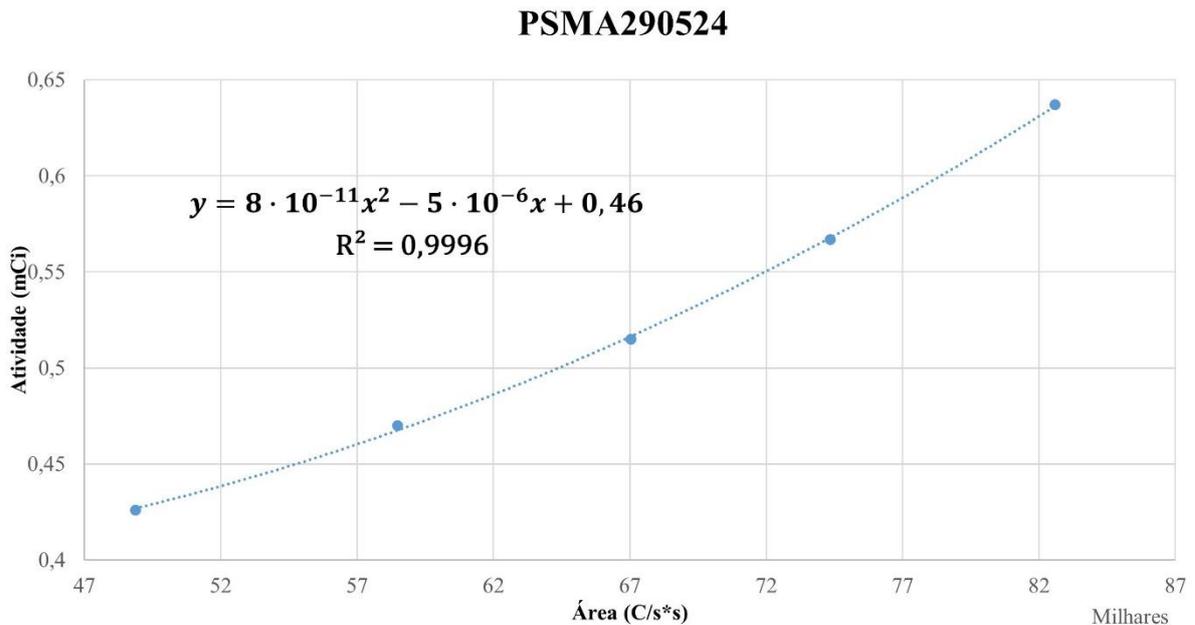


Fig. 3- Gráfico Atividade x Área 20 µL para o lote PSMA290524.

A tab. 2 mostra os resultados obtidos para os experimentos com [¹⁸F]Fluoroestradiol e a fig. 4 abaixo mostra os gráficos obtidos pela Área (mV x min) x Atividade (mCi) 20 µL obtidos para o [¹⁸F]Fluoroestradiol.



Tab. 2- Resultados dos experimentos obtidos para o [¹⁸F]Fluoroestradiol.

Lote	Área (mV x min)	Atividade (mCi) 200 µL	Atividade (MBq) 200 µL	Atividade (mCi) 20 µL	Atividade (MBq) 20 µL	Hora
FES060424	2729605	2,22±0,04	82,14±1,31	0,222±0,004	8,214±0,131	11:11
	2541489	2,11±0,03	78,07±1,25	0,211±0,003	7,807±0,125	11:20
	2476209	2,00±0,03	74,00±1,18	0,200±0,003	7,400±0,118	11:28
	2345225	1,89±0,03	69,93±1,12	0,189±0,003	6,993±0,112	11:36
	2241943	1,80±0,03	66,60±1,07	0,180±0,003	6,660±0,107	11:45
FES130624	7279691	10,13±0,16	374,81±6,00	1,013±0,016	37,481±0,600	09:36
	7153450	9,58±0,15	354,46±5,67	0,958±0,015	35,446±0,567	09:45
	7033654	9,10±0,15	336,70±5,39	0,910±0,015	33,670±0,539	09:53
	6899766	8,63±0,14	319,31±5,11	0,863±0,014	31,931±0,511	10:02
	6771420	8,19±0,13	303,03±4,85	0,819±0,013	30,303±0,485	10:10
	6588224	7,76±0,12	287,12±4,59	0,776±0,012	28,712±0,459	10:18
FES200624	7277459	9,66±0,15	357,42±5,72	0,966±0,015	36,742±0,572	10:41
	7126738	8,69±0,14	321,53±5,14	0,869±0,014	32,153±0,514	10:55
	6965958	8,18±0,13	302,66±4,84	0,818±0,013	30,266±0,484	11:08
	6804844	7,60±0,12	281,20±4,50	0,760±0,012	28,120±0,450	11:19
	6731550	6,88±0,11	254,56±4,07	0,688±0,011	25,456±0,407	11:35
FES200824	6054111	10,63±0,17	393,31±6,29	1,063±0,017	39,331±0,629	09:58
	5863089	10,03±0,16	371,11±5,94	1,003±0,016	37,111±0,594	10:07
	5653809	9,04±0,14	334,48±5,35	0,904±0,014	33,448±0,535	10:22
	5490079	8,58±0,14	317,46±5,08	0,858±0,014	31,746±0,508	10:32
	5338031	8,12±0,13	300,44±4,81	0,812±0,013	30,044±0,481	10:41

A partir dos resultados obtidos, observou-se a existência de uma relação polinomial de segunda ordem entre a área e a atividade. Isso é comprovado pela faixa encontrada para o coeficiente de correlação (r): 0,9867 a 0,9998, com uma incerteza de ±1,6%. Portanto, a área e a atividade estão intimamente correlacionadas já que o r se aproxima de 1. Além disso, observou-se ainda que não foi possível concluir uma única relação para o ¹⁸F bem como as relações obtidas não seguem sua curva de decaimento, estes desvios podem ser associados a diversos fatores, como diferentes condições experimentais avaliadas, erros sistemáticos e aleatórios, idade e precisão dos detectores utilizados e ao pequeno conjunto amostral avaliado.

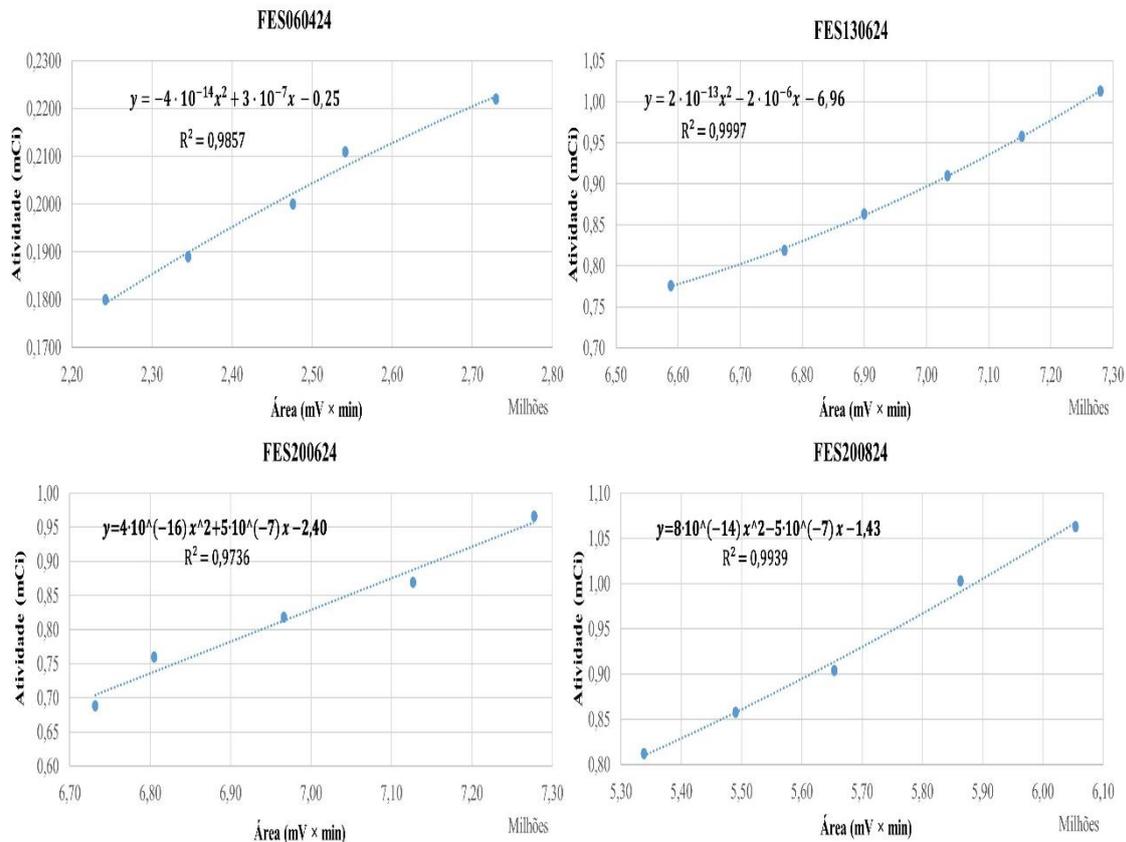


Fig. 4 - Gráficos Área (mV x min) x Atividade (mCi) 20 µL [¹⁸F]Fluoroestradiol.

4. CONCLUSÃO

Foi possível observar a existência de uma relação linear entre a área obtida em um cromatograma e a sua atividade correspondente. Entretanto, não foi possível encontrar uma única função matemática que descreva essa relação. Apesar disso, é importante ressaltar que os resultados encontrados abrem precedentes para a utilização do sistema de medição (CLAE-Cintilador) na rotina, permitindo a realização dos testes preconizados pelas Farmacopeias, simultaneamente, por meio de uma única corrida cromatográfica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR) e ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), pela concessão das amostras, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo fomento fornecido.



Semana Nacional de Engenharia Nuclear e da Energia e Ciências das Radiações – VII SENCIR
Belo Horizonte, 12 a 14 de novembro de 2024

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RDC Nº 451, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2020, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2020. Acesso Julho de 2024.
- [2] R. Oliveira *et al.*, Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações, Vol. 42, pp. 151-165 Coimbra, abril (2006).
- [3] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36). United States Pharmacopeial Convention; 2016. Acesso Julho de 2024.
- [4] C. H. Collins e G. L. Braga e P. S. Bonato - Introdução a Métodos Cromatográficos, 7ª ed., Campinas, Ed. UNICAMP (1997).
- [5] N. Q. Batista e R. A. D. Pereira e M. C. C. Pereira, Crescimento e Caracterização do Cristal Cintilador CsI:Br para Uso como Detector de Radiação, *International Nuclear Atomic Conference – INAC*, 2015.
- [6] G. O. Valgas, Controle de Qualidade do Medidor de Atividade Ativímetro em Serviço de Medicina Nuclear, *Revista Brasileira de Engenharia Física Aplicada*, pp. 37 – 44 (2017).