Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA PLANAR PARA
CONTROLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m.**

ELISIANE DE GODOY MONTEIRO

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

**Orientador (a):
Prof. Dr. Margareth Mie Nakamura
Matsuda**

SÃO PAULO

2012

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

**Estudo comparativo entre metodologias de cromatografia planar
para controle radioquímico de radiofármacos de Tecnécio-99m.**

Elisiane de Godoy Monteiro

**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

2012

DEDICAÇÃO

Primeiramente dedico este trabalho a Deus, que sempre esteve presente em minha vida e nos momentos de dificuldade me proporcionou sabedoria e força.

Ao meu esposo Eduardo, que sempre com muito amor, carinho e compreensão, incentivou os meus estudos, lutando comigo para alcançar esta vitória.

Aos meus pais, sendo exemplos de vida ensinaram-me a buscar os meus objetivos, mesmo que os caminhos se mostrassem cheios de obstáculos, acreditando fielmente em meus sonhos.

À família de meu esposo que sempre me apoiou, formando uma grande torcida em favor do meu sucesso.

A todos aqueles que nos momentos mais delicados e difíceis, tiveram paciência e compreensão, pois a notícia de não ser possível comparecer às reuniões familiares, festas e encontros com amigas (os), ter que ficar no computador, trabalhar, isolar-me em casa ou na casa de minha mãe, por muitas vezes desagradou às pessoas, contudo, sei que lá no fundo entenderam.

OBRIGADA meu Deus, por TUDO, por ter ouvido as minhas orações e por ter olhado para mim, tão pequenina, não faltando a Sua misericórdia em guiar os meus passos. Realmente não existem palavras para descrever a minha gratidão pelos Seus feitos em minha vida!!!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelo oferecimento do curso de pós-graduação e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela infraestrutura fornecida e oportunidade concedida para a execução de minha dissertação.

Ao MSc. Jair Mengatti pela colaboração no que foi necessário para a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Tereza Colturato pela gentileza e atenção sendo a facilitadora em meu primeiro contato no IPEN e à MSc. Neuza Taeko Okasaki Fukumori por incentivar o desenvolvimento deste trabalho na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) sempre contribuindo com sugestões valiosas.

À Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda pela orientação, compartilhando comigo seus conhecimentos, com insistência e perseverança em tudo o que faz.

Ao Dr. Haroldo Taurian Gasiglia e à Dra. Elaine Bortoletti Araújo, pela valiosa contribuição e sugestões de suma importância para a conclusão deste trabalho.

A todos os servidores, bolsistas e terceirizados da DIRF, em especial agradeço à equipe do controle de qualidade pela colaboração, amizade e convivência dia-a-dia no Instituto.

À MSc. Érika Vieira de Almeida, Edson Vieira Alves e MSc. Patrícia de Andrade Martins que sempre me ajudaram. Pessoas especiais que Deus preparou para iluminar o meu caminho. Obrigada mesmo, aprendi muito com vocês!

À Stella Benedetti pelo auxílio e companhia todos os dias, sendo praticamente a minha sombra.

À MSc. Adriana Vidal Fernandes Massicano pela força e ajuda nestes momentos finais da minha dissertação.

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

"Bem aventurado o homem que acha sabedoria e adquire conhecimento,
aumento de dias há na sua mão direita e na sua esquerda riquezas e honra.
Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio
entendimento, pois o Senhor com sabedoria fundou a terra e preparou os céus
com inteligência."
(Provérbios 03)

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA PLANAR PARA CONTROLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m.

Elisiane de Godoy Monteiro

RESUMO

Os radiofármacos são substâncias que possuem radioisótopos em sua composição. Cerca de 95% dos procedimentos realizados em medicina nuclear faz o uso de radiofármacos com finalidade diagnóstica, sendo os reagentes liofilizados (RL) marcados com Tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc), obtido a partir de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, os mais utilizados. O controle de qualidade representa o conjunto de ensaios a serem realizados para certificar que o produto é adequado ao propósito. Um aspecto importante a ser avaliado nos radiofármacos de ^{99m}Tc é a pureza radioquímica (% PRq) para quantificação de pertecnetato livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e tecnécio coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$), principalmente por cromatografia em papel (CP), em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O objetivo deste trabalho foi realizar a comparação das metodologias de controle radioquímico de RL marcados com ^{99m}Tc descritas nas farmacopéias americana (FA) e europeia (FE) com aquelas utilizadas no IPEN. O eluído de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e os RL: DISIDA, DMSA, DTPA, EC, ECD, GHA, MIBI, MDP, PIRO, SAH e Sn Coloidal foram provenientes do IPEN-CNEN/SP. Foram utilizados os suportes cromatográficos TLC-celulose, TLC-SG, TLC-SG fase reversa, HPTLC-celulose e HPTLC-SG da Merck e ITLC-SG da Pall Corporation, W1MM, W3MM, W17M e W31ET da Whatman. A contagem da radioatividade foi feita em contador gama Perkin Elmer modelo Cobra D-5002. A marcação dos RL foi feita de modo a obter concentração radioativa de $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$ ($1,5 \text{ mCi mL}^{-1}$). Foram determinadas as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq até 4 horas de marcação. Dos 11 RL, apenas EC e GHA não possuem método de controle radioquímico na FA e FE. Na FA e/ou na FE, os métodos para DTPA, MDP, PIRO, SAH e Sn Coloidal utilizam ITLC-SG; no IPEN, este suporte

cromatográfico é utilizado em DISIDA, EC, ECD, GHA, PIRO, MIBI e SAH. Devido à descontinuidade na fabricação de ITLC-SG (recomendado em 40, 70 e 41% das metodologias da FA, FE e IPEN, respectivamente), foi necessário buscar alternativas para sua substituição no controle radioquímico, avaliando-se suportes do tipo HPTLC (celulose e sílica gel) e Whatman (com diferenças de espessura e fluxo de corrida). Os resultados de % PRq determinada pelos métodos descritos na FA, FE, IPEN e os demais sistemas avaliados que apresentaram coeficiente de variação menor que 5% não foi considerada diferença significativa entre os métodos. Os sistemas cromatográficos avaliados neste trabalho podem ser utilizados em substituição ao suporte ITLC-SG. O HPTLC-celulose foi o suporte que apresentou tempo de análise, perfil cromatográfico e custo semelhante ao ITLC-SG, tornando-o um dos suportes mais indicados a ser utilizado como alternativa ao ITLC-SG nos 11 RL avaliados.

COMPARISON STUDY AMONG METHODOLOGIES OF PLANAR CHROMATOGRAPHY FOR RADIOCHEMICAL CONTROL OF TECNÉCIO-99m RADIOPHARMACEUTICALS.

Elisiane de Godoy Monteiro

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are substances that have radioisotopes in their composition. About 95% of the procedures performed in nuclear medicine use radiopharmaceuticals with diagnostic purposes, and the Lyophilized Reagents (LR) labeled with Technetium-99m (^{99m}Tc), obtained from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator, are the most one used. Quality Control represents the set of assays to be performed to assure that the product is adequate to its purpose. An important feature to be evaluated in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals is the radiochemical purity (% RqP) to quantify free pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) and technetium colloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$) mainly by paper chromatography (PC), thin layer (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The objective of this work was to perform the comparison among the radiochemical control methodologies of LR labeled with ^{99m}Tc , described in the United States Pharmacopoeia (USP) and European Pharmacopoeia (EP) and those used by IPEN. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluate and DISIDA, DMSA, DTPA, EC, ECD, GHA, MIBI, MDP, PIRO, SAH and Sn Coloidal LR were provided by IPEN-CNEN/SP. TLC-celulose, TLC-SG, TLC-SG reverse phase, HPTLC-celulose, HPTLC-SG (Merck) and ITLC-SG (Pall Corporation), W1MM, W3MM, W17M e W31ET (Whatman) chromatographic plates were used. The measurement of the radioactivity was done in a Perkin Elmer Cobra D-5002 gamma counter. LR were labeled to obtain $55,0 \text{ MBq mL}^{-1}$ ($1,5 \text{ mCi mL}^{-1}$) of final radioactive concentration. The % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ and % RqP were determined up to 4 hour labeling. From 11 LR, only EC and GHA have no radiochemical control methods in USP and EP. In USP and/or EP, DTPA, MDP, PIRO, SAH and Sn Coloidal methods use ITLC-SG; IPEN uses this chromatography plate in DISIDA, EC, ECD, GHA, PIRO, MIBI and SAH. As ITLC-SG had been out of

production (recommended in 40, 70 and 41% of the USP, EP and IPEN methodologies, respectively), it was necessary to search alternatives to replace ITLC-SG plate in the radiochemical control, comparing with HPTLC (cellulose and silica gel) and Whatman plates (with thickness and flow rate differences). The % RqP results determined by the methods described in USP, EP, IPEN and the methods evaluated in this work presented coefficient of variation less than 5%, and it was not considered a significant value among the methods. Some chromatographic systems evaluated in this work can be used as replacement to the ITLC-SG plate. HPTLC-cellulose was the plate that presented time of analysis chromatography profile and cost similar to ITLC-SG, making it one of the most indicated to replace ITLC-SG, in 11 LR evaluated.

SUMÁRIO

	Página
1.0 INTRODUÇÃO	17
2.0 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Radiofármacos	20
3.2 Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	21
3.3 Radiofármacos de Tecnécio-99m	22
3.4 Controle de qualidade de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	25
3.4.1 Controle de qualidade biológico.....	26
3.4.2 Controle de qualidade físico, físico-químico e químico	27
3.4.3 Controle de qualidade radioquímico para radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	28
3.4.3.1 Cromatografia em papel (CP) e Cromatografia em camada delgada (CCD).....	29
3.4.3.3 Métodos cromatográficos disponíveis na literatura para controle radioquímico de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	35
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Materiais.....	40
4.2 Métodos.....	41
4.2.1 Métodos cromatográficos utilizados para a determinação de pureza radioquímica em radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$	42
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DISIDA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.	48
5.2 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DMSA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$...	52
5.3 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$...	56
5.4 Comparação das metodologias para controle radioquímico de EC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	59
5.5 Comparação das metodologias para controle radioquímico de ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	62

5.6	Comparação das metodologias para controle radioquímico de GHA- ^{99m} Tc.....	69
5.7	Comparação das metodologias para controle radioquímico de MIBI- ^{99m} Tc.....	71
5.8	Comparação das metodologias para controle radioquímico de MDP- ^{99m} Tc	75
5.9	Comparação das metodologias para controle radioquímico de PIRO- ^{99m} Tc.....	78
5.10	Comparação das metodologias para controle radioquímico de SAH- ^{99m} Tc.....	81
5.11	Comparação das metodologias para controle radioquímico de Sn COLOIDAL- ^{99m} Tc	83
5.12	Avaliação do custo de análise de % PRq considerando-se os diferentes suportes cromatográficos.....	86
6.0	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 01- Radiofármacos marcados com ^{99m}Tc e suas aplicações	24
TABELA 02- Especificação estabelecida pelas farmacopéias FA e FE quanto à qualidade do eluato do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	26
TABELA 03- Principais tipos de papéis Whatman e suas propriedades	31
TABELA 04- Especificações do suporte HPTLC comparadas com TLC	33
TABELA 05- Propriedades de alguns dos solventes utilizados em cromatografia planar	34
TABELA 06- Sistemas cromatográficos descritos na literatura para determinação de pureza radioquímica dos radiofármacos marcados com ^{99m}Tc	36
TABELA 07- Tipos e dimensões dos suportes cromatográficos.....	42
TABELA 08- Sistemas para determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos RL.	44
TABELA 09- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em diferentes sistemas cromatográficos.....	47
TABELA 10- Sistemas cromatográficos (FA e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DISIDA- ^{99m}Tc	50
TABELA 11- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e DISIDA- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos	51
TABELA 12- % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DISIDA- ^{99m}Tc	52
TABELA 13- % PRq de DISIDA- ^{99m}Tc até 240 minutos após a marcação.	53
TABELA 14- Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DMSA- ^{99m}Tc	54
TABELA 15- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e DMSA- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.....	55
TABELA 16- % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DMSA- ^{99m}Tc	56
TABELA 17- % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de DMSA- ^{99m}Tc	57
TABELA 18- Sistemas cromatográficos (FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de DTPA- ^{99m}Tc	58
TABELA 19- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e DTPA- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.	59
TABELA 20- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em DTPA- ^{99m}Tc	59
TABELA 21- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de DTPA- ^{99m}Tc	60
TABELA 22- Sistemas cromatográficos (IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em EC- ^{99m}Tc	60
TABELA 23- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e EC- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.....	61
TABELA 24- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em EC- ^{99m}Tc	62
TABELA 25- % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de EC- ^{99m}Tc	62

TABELA 26- Sistemas cromatográficos (FA e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em ECD- ^{99m}Tc	63
TABELA 27- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FA – Parte 2.....	65
TABELA 28- % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FA - Parte 2	65
TABELA 29- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ECD- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.	66
TABELA 30- % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FA (Parte 1).	68
TABELA 31- % $^{99m}\text{TcO}_2$ + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em diferentes suportes cromatográficos.	68
TABELA 32- % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc	69
TABELA 33- Sistemas cromatográficos (IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em GHA- ^{99m}Tc	70
TABELA 34- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e GHA- ^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.....	70
TABELA 35- % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de GHA- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.....	71
TABELA 36- % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de GHA- ^{99m}Tc	72
TABELA 37- Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de MIBI- ^{99m}Tc	72
TABELA 38- Influência do comprimento do suporte na % PRq (método FA e FE) de MIBI- ^{99m}Tc em 240 minutos de marcação	73
TABELA 39- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e MIBI- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.....	74
TABELA 40- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em MIBI- ^{99m}Tc	75
TABELA 41- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MIBI- ^{99m}Tc	75
TABELA 42- Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de MDP- ^{99m}Tc	76
TABELA 43- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e MDP- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.....	77
TABELA 44- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em MDP- ^{99m}Tc	78
TABELA 45- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MDP- ^{99m}Tc	78
TABELA 46- Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em PIRO- ^{99m}Tc	79
TABELA 47- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e PIRO- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.....	80
TABELA 48- % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em PIRO- ^{99m}Tc	81
TABELA 49- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de PIRO- ^{99m}Tc	81

TABELA 50- Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em SAH- ^{99m}Tc .	82
TABELA 51- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e SAH- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.	83
TABELA 52- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em SAH- ^{99m}Tc .	83
TABELA 53- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de SAH- ^{99m}Tc .	84
TABELA 54- Sistemas cromatográficos (FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .	85
TABELA 55- R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e SnCOLOIDAL- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.	85
TABELA 56- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .	86
TABELA 57- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de SnCOLOIDAL- ^{99m}Tc .	87
TABELA 58- Apresentação (Embalagem) dos suportes cromatográficos.	88
TABELA 59- Custo unitário do suporte cromatográfico.	88

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1- Esquema simplificado de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	21
FIGURA 2- Esquema geral das reações para obtenção de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	22
FIGURA 3- Diagrama dos ensaios de controle de qualidade dos radiofármacos.	26
FIGURA 4- Comparação dos tamanhos de partículas das fases estacionárias de TLC, cromatografia preparativa (PLC) e HPTLC.	31
FIGURA 5- Fluxograma das fases de marcação dos RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$	42
FIGURA 6- Perfil cromatográfico ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em TLC-fase reversa/acetona:acetato de amônio na proporção 60:40.....	63
FIGURA 7- Perfil cromatográfico ECD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em TLC-fase reversa com acetona : acetato de amônio na proporção 80:20.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

^{99m}Tc	Tecnécio meta estável
$^{99m}\text{TcO}_2$	Tecnécio coloidal
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Pertecnetato livre
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Bq	Bequerel
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Cel	Celulose
CLAE	Comatografia Líquida de Alta Eficiência
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CP	Cromatografia em Papel
DIRF	Diretoria de Radiofarmácia
DISIDA	Ácido 2,6 diisopropiliminodiacético
DMSA	Ácido 2,3-dimercaptosuccínico
DTPA	Ácido dietilenotriamino pentacético
EC	Etilenodicisteína
ECD	Etilenodicisteinato de dietila
FA	Farmacopeia Americana
FE	Farmacopeia Europeia
GHA	Glucoheptonato de cálcio
GMCP-SA	Glass Microfibre Chromatography Paper (silicic acid)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
LAL	Lisado de Amébócitos de Limulus
mCi	miliCurie
MDP	Metileno 1,1-acido bifosfônico
MIBI	hexaquis-2-metoxi-isobutil-isonitrila
PIRO	Pirofosfato de sódio

PRq	Pureza Radioquímica
R _f	Fator de retardamento
RL	Reagente Liofilizado
SAH	Soro Albumina Humano
SG	Sílica Gel
TLC	Thin Layer Chromatography
W17M	Whatman 17M
W1MM	Whatman 1MM
W31ET	Whatman 31ET
W3MM	Whatman 3MM

1.0 INTRODUÇÃO

Os radiofármacos são substâncias que possuem radioisótopos em sua composição e possuem especificidade por um determinado órgão ou função fisiológica, permitindo a aplicação da radioatividade em favor da saúde na prática da medicina nuclear (1-3).

Cerca de 95% dos procedimentos realizados na rotina clínica de um serviço de medicina nuclear faz o uso de radiofármacos com finalidade diagnóstica, sendo 80% dos radiofármacos marcados com Tecnécio meta estável (^{99m}Tc) (1-4).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por regulamentar a fabricação, controle de qualidade e registro dos radiofármacos, através da exigência do cumprimento de um conjunto de normas, a saber: Boas Práticas de Fabricação (BPF) (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, que dispõe sobre as BPF de medicamentos, RDC nº 63 – que dispõe sobre as BPF de radiofármacos e RDC nº 64 – que dispõe sobre o registro de radiofármacos). Estas normas são designadas a controlar de forma íntegra o processo de fabricação dos radiofármacos, através da realização de atividades que minimizem os riscos e garantam a qualidade, eficácia e segurança dos produtos, visando manter todas as características desejadas no produto final a ser administrado ao paciente (1,4-8).

As Farmacopeias Americana (FA) e Europeia (FE) são compêndios de referência que apresentam as especificações de fármacos e radiofármacos, assim como as técnicas analíticas que devem ser utilizadas no controle de qualidade. O Controle de Qualidade é um conjunto de ensaios específicos (Químico, Físico-químico e Biológico) a ser realizado no produto final para certificar de que está adequado ao uso proposto. Um aspecto importante a ser avaliado na qualidade dos radiofármacos é o da pureza radioquímica (% PRq), em que se determina a porcentagem de impurezas que podem comprometer a qualidade da imagem a ser obtida (5-8). De maneira geral, segundo as FA e FE, a % PRq deve ser superior a 90%, sendo mais restritiva para alguns radiofármacos (2 - 4, 9,10).

Diversas publicações descrevem métodos cromatográficos para a determinação de % PRq, a saber:

- Cromatografia em papel (CP) (11-16);
- Cromatografia em camada delgada (CCD), mais conhecida pela sigla em inglês TLC (*thin layer chromatography*) (11-16);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), denominação da sigla em inglês HPLC (*high performance liquid chromatography*) (16-19).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra complexa pela diferença de afinidade que cada um possui pela fase estacionária e fase móvel (20,21).

A CLAE, apesar de ser uma das técnicas cromatográficas mais importantes e atualmente indispensável em um laboratório para o controle de qualidade e pesquisa de novos fármacos, na radiofarmácia, a ferramenta mais presente para determinação da % PRq é a cromatografia planar (22).

Na cromatografia planar, uma pequena quantidade do produto é aplicada sobre um suporte (fase estacionária) e os componentes são arrastados e separados pela interação com o solvente (fase móvel) (20). Um dos suportes empregados nesta técnica é o ITLC (*instant thin layer chromatography*), utilizado no controle radioquímico de alguns radiofármacos de ^{99m}Tc , recomendado em aproximadamente 40, 70 e 41% das metodologias descritas na FA (4 em 10), FE (9 em 13) e IPEN (7 em 17), respectivamente (9,10,23).

O ITLC-SG obteve aceitação mundial no controle radioquímico de radiofármacos devido à maior velocidade de migração da fase móvel, quando comparado aos demais materiais disponíveis. Entretanto, devido à descontinuidade de produção dos suportes ITLC-SG em 2008 (24,25), houve a necessidade de buscar sistemas cromatográficos alternativos para aqueles descritos nos métodos IPEN, que faziam o uso do ITLC-SG. Estudos com o suporte HPTLC (*high performance thin layer chromatography*) tem demonstrado vantagens na separação dos componentes de uma amostra em tempo de análise reduzido, por possuir tamanho de partícula menor (20). Por esta razão, o suporte (HPTLC) possui potencial para aplicação, principalmente como alternativa ao ITLC-SG no controle radioquímico de Reagentes Liofilizados (RL) para radiodiagnósticos marcados com ^{99m}Tc .

2.0 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar a comparação entre as metodologias de cromatografia planar descritas nas Farmacopeias Americana e Europeia (FA e FE) e as utilizadas no IPEN, para controle radioquímico dos radiofármacos de ^{99m}Tc , a saber: DISIDA- ^{99m}Tc , DTPA- ^{99m}Tc , DMSA- ^{99m}Tc , EC- ^{99m}Tc , ECD- ^{99m}Tc , GHA- ^{99m}Tc , MIBI- ^{99m}Tc , MDP- ^{99m}Tc , PIRO- ^{99m}Tc , SAH- ^{99m}Tc e Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .

2.1 Objetivos específicos

- Buscar suportes cromatográficos alternativos ao ITLC-SG para controle radioquímico de alguns radiofármacos de ^{99m}Tc ;
- Avaliar os suportes cromatográficos HPTLC-SG e HPTLC-celulose;
- Comparar a % PRq de alguns radiofármacos pela utilização de diferentes sistemas cromatográficos.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radiofármacos

A evolução da medicina nuclear e da radiofarmácia foi marcada pela primeira administração de uma preparação radioativa em um ser humano, em 1927, com o objetivo de verificar os efeitos e a trajetória metabólica. Com o passar dos anos, houve diversas mudanças no processo de obtenção dos radioisótopos, o que permitiu reduzir a quantidade de impurezas e melhorar o rendimento de produção, tornando possível o uso dos radiofármacos com maior segurança e especificidade (26,27). A maior parte dos radiofármacos é administrada via parenteral, mas alguns também podem ser administrados oralmente (28).

Os radiofármacos que se destinam ao diagnóstico clínico apresentam em sua composição um radioisótopo emissor γ e/ou pósitron com energia suficiente para penetrar nos tecidos; nos radiofármacos para terapia, o radionuclídeo emissor de partículas ionizantes (α , β^- , ou elétron Auger) possui energia de alcance relativamente curto e promove a destruição de células (28,29).

Existem duas classes de radiofármacos utilizados para diagnóstico, denominadas de Primeira e Segunda Geração, em que se incluem entre os de Primeira Geração, os radiofármacos de perfusão e de Segunda Geração, os radiofármacos específicos.

Os radiofármacos de Primeira Geração são transportados até o órgão alvo através do fluxo sanguíneo, porém não tem locais específicos de ligação, sendo distribuídos de acordo com a carga e tamanho do composto. Já os radiofármacos de Segunda Geração necessitam de biomoléculas capazes de reconhecer os receptores do órgão/tecido alvo ou serem transportados para o interior das células, dependendo da molécula biologicamente ativa utilizada (28,30).

Os diferentes radiofármacos produzidos a partir da simples reconstituição de conjuntos de Reagentes Liofilizados (RL) com Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) tornaram-se, nos últimos 41 anos, os mais utilizados nos procedimentos destinados ao diagnóstico, na prática da medicina nuclear devido às propriedades físicas e químicas ideais do radioisótopo, a saber: meia-vida física de 6,01 horas; decaimento por emissão de radiação gama (fótons de 140 keV) e praticidade da obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (30,31).

Os RL são substâncias que funcionam como carreadoras do radioisótopo desejado, neste caso, o ^{99m}Tc , até atingir o órgão alvo. Devido a todas estas propriedades e características, os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc possibilitam a aquisição de imagens cintilográficas com boa resolução e evitam a exposição desnecessária de órgãos não alvos à radiação (1,4).

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

O sistema gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ consiste em uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumínio (Al_2O_3) ou alumina, onde é depositado o ^{99}Mo , que possui meia-vida física de 66 horas, e decai para ^{99m}Tc . A **FIG. 1** ilustra o processo de eluição neste gerador (27,30,32-34).

FIGURA 1- Esquema simplificado de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (34).

Na **FIG. 1** é possível visualizar o processo de eluição em um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, onde deve-se acoplar um frasco com solução salina (NaCl 0,9%) e

um frasco em vácuo. O vácuo faz com que a solução salina saia do frasco original e atravesse a coluna interna carregando o radionuclídeo pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), que é o elemento radioativo obtido do decaimento do molibdato (^{99}Mo), e é recolhido no frasco em vácuo. Este eluato de pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) é utilizado para a marcação de RL com atividade radioativa desejada. No frasco de RL tem-se a substância a ser complexada (denominada de Fármaco na **FIG. 2**) e um agente redutor (normalmente cloreto estanoso – SnCl_2) para reduzir o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para um estado de oxidação menor (**FIG. 2**) (3,27,32 - 33).

FIGURA 2- Esquema geral das reações para obtenção de radiofármacos de ^{99m}Tc (28).

3.3 Radiofármacos de Tecnécio-99m

Existem alguns fatores importantes a serem considerados na preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc , a saber (30,33):

- Ligação química entre o ^{99m}Tc e o Fármaco (substância a ser complexada);
- Condições físico-químicas da marcação;
- Atividade radioativa a ser utilizada;
- Complexação (marcação), com rendimento elevado (acima de 90%);
- Condições de armazenamento (luz e a temperatura podem gerar produtos de degradação);
- Prazo de estabilidade após a marcação (variação de cerca de 10 minutos a 4 horas).

Desde a marcação até o momento da administração deste radiofármaco, deve-se assegurar que as condições acima citadas sejam adequadamente atendidas. Cada preparação radiofarmacêutica deve ser realizada de forma criteriosa, segundo as condições descritas pelo fabricante de

cada RL, pois cada um possui concentração distinta de agente redutor, exigência de tempo de reação diferente para que a ligação seja efetiva, além de algumas condições especiais de pH e temperatura que podem afetar as propriedades do composto (30,33,35). Na **TAB. 01** estão relacionados alguns radiofármacos de ^{99m}Tc produzidos no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

TABELA 01- Radiofármacos marcados com ^{99m}Tc , suas aplicações e estruturas químicas (6,9,36,33,37).

Radiofármacos	Aplicações	Estrutura Química
DISIDA- ^{99m}Tc Ácido 2,6 diisopropiliminodiacético- ^{99m}Tc	Cintilografia de fígado e vias biliares
DMSA- ^{99m}Tc (Ácido 2,3-dimercaptosuccínico- ^{99m}Tc)	Cintilografia de córtex renal
DTPA- ^{99m}Tc (Ácido dietilenotriamino pentacético- ^{99m}Tc)	Cintilografia renal, ventilação pulmonar e cintilografia cerebral
EC- ^{99m}Tc (L,L Etilenodicisteína- ^{99m}Tc)	Cintilografia renal
ECD- ^{99m}Tc (L,L Etilenodicisteinato de dietila- ^{99m}Tc)	Estudo de perfusão cerebral

TABELA 01- Continuação.

Radiofármacos	Aplicações	Estrutura Química
GHA- ^{99m}Tc (Glucoheptonato- ^{99m}Tc)	Cintilografia renal e cerebral
MDP- ^{99m}Tc (Metileno 1,1-ácido bifosfônico- ^{99m}Tc)	Cintilografia óssea
MIBI-^{99m}Tc (Hexaquis 2-metoxi-isobutil-isonitrila- ^{99m}Tc)	Cintilografia de perfusão miocárdica
PIRO- ^{99m}Tc (Pirofosfato de sódio- ^{99m}Tc)	Infarto agudo do miocárdio e cintilografia óssea
SAH- ^{99m}Tc (Soro Albumina Humana- ^{99m}Tc)	Cintilografia de placenta e estudos cardíacos
Sn Coloidal-^{99m}Tc (Estanho Coloidal- ^{99m}Tc)	Cintilografia Renal	—

(estrutura não ligada ao ^{99m}Tc)

Existem limites estabelecidos pela Farmacopeia Americana (FA) e Farmacopeia Europeia (FE) quanto à qualidade do eluato de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (**TAB. 02**) para a preparação de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (30).

TABELA 02- Especificações estabelecidas pelas FA e FE quanto à qualidade do eluato do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (9,10,23,30).

Parâmetro	FA e IPEN	FE
Eficiência de eluição	90 a 110%	90 a 110%
Pureza radionuclídica	$\leq 0,15 \mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{Tc}$	$\leq 0,10 \mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{Tc}$
Pureza radioquímica	$\geq 95\%$	$\geq 95\%$
Pureza química (Al^{3+})	$\leq 10 \mu\text{g/mL}$	$\leq 5 \mu\text{g/mL}$
pH	4,5 a 7,5	4,0 a 8,0

3.4 Controle de qualidade de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Eficácia, qualidade e segurança são considerados os requisitos mais importantes a serem obtidos na indústria farmacêutica e radiofarmacêutica. O controle de qualidade representa o conjunto de ensaios específicos a serem realizados em um produto para certificar de que está adequado ao uso proposto (11).

As FA e FE relacionam os requisitos de qualidade que os radiofármacos devem atender, a saber: esterilidade, apirogenicidade, toxicidade, isotonicidade, possuir pH adequado e estar isento de impurezas (**FIG. 3**). Somente através do atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF) é possível atingir o padrão exigido na produção e no controle de qualidade (1,6,9,10).

FIGURA 3 - Diagrama dos ensaios de controle de qualidade dos radiofármacos (9-11)

3.4.1 Controle de qualidade biológico

Os controles de qualidade biológicos são realizados para garantir ausência de microorganismos viáveis e patogênicos. Em geral, os ensaios realizados são: esterilidade, endotoxina, toxicidade e distribuição biológica (29,28,33).

- Esterilidade: São ensaios que têm como objetivo detectar a presença de microorganismos viáveis. Nestes ensaios, o produto a ser avaliado é colocado em meios de cultura que funcionam como nutrientes (TSB – *Tryptcase Soy Broth* e FTM – *Fluid Thioglycollate Medium*). Estes meios de cultura com a amostra são colocados em estufas em temperaturas favoráveis ao crescimento de microorganismos, como bactérias aeróbias, anaeróbias ou fungos (29).

- Endotoxina: Ensaios para detectar a presença de endotoxinas (lipopolissacarídeo). A introdução de uma substância pirogênica no organismo humano pode provocar desde o aumento da temperatura corporal (febre) até a morte. Este teste pode ser realizado “in vivo”, com a administração do produto a ser avaliado em coelhos, verificando se o animal desenvolve resposta febril, ou “in vitro” utilizando-se teste LAL, em que proteínas provenientes da lise dos

amebócitos de um caranguejo chamado *Limulus*, reagem com a endotoxina formando um gel, turbidez ou composto cromogênico (38).

- Toxicidade: Ensaios que visam estabelecer uma dose máxima específica na qual o produto pode apresentar toxicidade (7,8).

- Distribuição Biológica: Este ensaio é realizado “in vivo”, ou seja, o produto é administrado em um animal, normalmente ratos ou camundongos, a fim de avaliar a biodistribuição deste no organismo. Este ensaio pode ser realizado por dois métodos, a saber (29,32): **Método não invasivo**: a localização do radiofármaco no organismo do animal é realizada pela aquisição de imagens obtidas por equipamentos capazes de detectar a radiação emitida (29,32), ou pelo **Método invasivo**: neste método é necessário realizar o sacrifício do animal para medir a radioatividade nos órgãos de interesse (29,32).

3.4.2 Controle de qualidade físico, físico-químico e químico

Nos controles de qualidade físico e físico-químico, avaliam-se as características físicas, pH, presença ou ausência de partículas e no controle de qualidade químico, a pureza química (28,29).

- pH: As preparações devem, preferencialmente, possuir pH próximo ao fisiológico (aproximadamente de 7,4) (29).

- Inspeção física: O tamanho das partículas deve ser controlado uma vez que a maioria dos radiofármacos é injetável, tornando-se um fator determinante para uma boa biodistribuição. A cor e a turbidez também são avaliadas, com o intuito de verificar a existência de qualquer alteração no produto (33).

- Pureza química: é um ensaio de grande importância, pois é através dele que se consegue identificar a presença de impurezas que podem interferir na qualidade da imagem a ser obtida (11). Como exemplo, pode-se citar o ensaio para avaliar a presença de íons de Alumínio (Al^{3+}) provenientes da coluna do gerador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$ (11,35).

3.4.3 Controle de qualidade radioquímico para radiofármacos de ^{99m}Tc

A pureza radioquímica (% PRq) é definida como a fração da radioatividade total do radionuclídeo na forma química desejada (29).

As impurezas radioquímicas são originárias da decomposição do radiofármaco, por ação da luz, temperatura, pH, ação de solventes, presença de agentes oxidantes ou redutores e radiólise (33,39). Nos radiofármacos de ^{99m}Tc as impurezas radioquímicas mais comuns são (11):

- Pertecnetato livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$): Impureza produzida quando o pertecnetato de sódio adicionado não se complexa com o fármaco, ficando livre em solução (35,39).
- Tecnécio coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$): Impureza produzida quando durante a reação de complexação/marcação com o fármaco, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se estabiliza em um estado de oxidação menor, formando um colóide (35,39).

Baixa % PRq pode produzir problemas na biodistribuição, prejudicando a qualidade da imagem, consequentemente um diagnóstico impreciso, e em alguns casos, aumentando a exposição de alguns órgãos à radiação (15,39).

A técnica mais simples e mais utilizada na determinação de impurezas radioquímicas é a cromatografia planar, porém também podem ser utilizados outros métodos analíticos, a saber: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese, coluna de troca iônica ou extração com solventes (4,15, 20,35).

A cromatografia é um método de separação dos componentes de uma mistura provocado pelas diferenças de afinidades (coeficientes de distribuição) entre a fase estacionária (suporte) e a fase móvel (solvente). Os componentes mais fortemente retidos à fase estacionária movem-se mais lentamente, enquanto os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente (15).

Na cromatografia cada componente da amostra é caracterizado por um valor de R_f (fator de retardamento), definido pela relação da distância percorrida por cada componente da amostra e a distância percorrida pelo solvente (**Equação 1**). A % PRq é determinada pelo cálculo da % Impureza (**Equação 2**) e pela equação de balanço de massa (**Equação 3**) (6,29,36).

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad (1)$$

$$\% \text{ Impureza} = \frac{\text{Contagem de Radioatividade no } R_f \text{ da impureza}}{\text{Contagem da Radioatividade Total}} \times 100 \quad (2)$$

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

Em geral, os sistemas cromatográficos para avaliar a % PRq em RL marcados com ${}^{99m}\text{Tc}$ não são capazes de quantificar simultaneamente ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$, sendo necessário utilizar suportes e solventes diferentes para separar as impurezas radioquímicas por diferenças no R_f (15,40).

3.4.3.1 Cromatografia em papel (CP) e Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia planar é sub-dividida em cromatografia em papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD), ambas consideradas técnicas simples, de rápida execução e eficientes na separação de compostos. A principal diferença entre CP e CCD é o tipo de mecanismo de separação envolvido (41).

O mecanismo de separação na CP é por partição líquido-líquido, onde a amostra (líquido) é retida no suporte (sólido) e o solvente (líquido) é responsável por promover a diferença de solubilidade entre as fases (21).

Na CCD, conhecida mundialmente pela sigla em inglês TLC (*thin layer chromatography*), o mecanismo envolvido é baseado na adsorção líquido-sólido, onde a fase estacionária sólida (suporte) possui moléculas adsorventes e a separação ocorre pela diferença de afinidade dos componentes da amostra com o suporte. Além disso, existe a cromatografia de modo reverso, em que a fase estacionária é menos polar que a fase móvel (20,21).

Ambas, CP e CCD são de fácil desenvolvimento e de baixo custo quando comparada à CLAE, mas apresentam resolução (capacidade de separação entre os componentes da amostra) menor. A literatura aponta que, em

alguns casos, os métodos por CCD podem apresentar resolução comparável à CLAE quando fazem o uso do suporte HPTLC (*high performance thin layer chromatography*) (42).

A velocidade de separação dos analitos por CP e CCD pode variar de minutos até dias, dependendo dos compostos a serem separados, do grau de pureza desejado, bem como das propriedades do solvente e do adsorvente e das condições operacionais do sistema (15).

Para aumentar a velocidade de migração da fase móvel, alguns materiais foram desenvolvidos e ganharam aceitação mundial, como foi o caso dos suportes de *instant thin layer chromatography* (ITLC). Esta fase estacionária é composta de fibra de vidro que quando impregnada com sílica-gel é conhecida pela sigla ITLC-SG ou quando impregnada com ácido silícico, pela sigla ITLC-SA (12). O suporte HPTLC, tem sido utilizado por possuir tamanho de partícula menor e favorecer melhor separação em menor tempo de análise (4, 43).

Os suportes cromatográficos empregados, tanto na CP quanto na CCD geralmente são cortados em tiras retangulares e a amostra é aplicada com micropipeta ou capilar de vidro a cerca de 1-2,5 cm da origem. A seleção do suporte cromatográfico é uma variável muito importante na separação dos componentes da amostra (39).

Na **TAB. 03** estão relacionadas algumas propriedades de diferentes papéis cromatográficos fabricados pela Whatman, sendo Whatman 1MM (W1MM) e Whatman 3MM (W3MM) os mais utilizados na prática da CP (20,35).

TABELA 03- Principais tipos de papéis Whatman e suas características (20).

Tipos de papel Whatman	Espessura (mm)	Fluxo (mm/30min)
W1MM	0,18	130
W3MM	0,34	130
3 Chr	0,36	130
4 Chr	0,21	180
W31ET	0,50	225
W17M	0,92	225

O papel W3MM apresenta espessura maior quando comparado ao W1MM, maior resistência mecânica quando é usado um solvente aquoso e evita que a tira do suporte rasgue facilmente, além de permitir a absorção de uma quantidade de amostra com menor espalhamento (22). O papel 3 Chr é espesso com superfície rugosa e mais utilizado para separação de compostos inorgânicos, enquanto os papéis W31ET e W17M são espessos e conferem velocidade de fluxo maior do que W1MM, W3MM, 3 Chr e 4 Chr (**TAB. 03**) (20, 43).

Em relação à CCD, o mercado dispõe de uma grande variedade de adsorventes, entre os quais os principais são: sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3) e celulose, sendo as duas primeiras as mais utilizadas (20). Na CCD, uma camada delgada de adsorvente seco (fase estacionária) é aplicada em uma base de alumínio, polímero ou vidro (15,41). HPTLC é um tipo especial de CCD, utilizada para amostras com pouco volume, que por possuírem tamanho de partículas e espessura do adsorvente menores, proporcionam melhor separação (41). Desta forma, as bandas de difusão das amostras são reduzidas e há aumento de sensibilidade e redução no tempo de análise (43). As principais propriedades das placas de HPTLC comparadas às placas de TLC convencionais estão relacionadas na **TAB. 04** e **FIG. 4** (43,44).

FIGURA 4 - Comparação dos tamanhos de partículas das fases estacionárias de TLC, cromatografia preparativa (PLC) e HPTLC (43).

TABELA 04 - Especificações do suporte HPTLC comparadas ao TLC (20).

Especificação	HPTLC	TLC
Tamanho da partícula	5 – 6 μm	10 – 12 μm
Distribuição da partícula	4 – 8 μm	5 – 20 μm
Espessura da camada	200 μm	250 μm
Altura da placa	12 μm	30 μm
Distância de migração	3 – 6 μm	10 – 15 μm
Tempo de separação	3 – 20 min	20 – 200 min
Número de amostras por placa	< 36 (72)	< 10
Volume da amostra	0,1 – 0,5 pg	1 – 5 ng
Limite de detecção (absorção)	100 – 500 pg	1 – 5 ng
Limite de detecção (fluorescente)	5 – 10 pg	50 – 100 pg

Outros aspectos que devem ser considerados na cromatografia planar são: tamanho da gota, condições do suporte cromatográfico e pureza do solvente (6, 42, 45). O solvente é outro parâmetro de grande importância, uma vez que é ele o responsável por promover a separação dos componentes da amostra ao longo do suporte. É indispensável verificar a solubilidade e a polaridade dos componentes da amostra no solvente, assim como a afinidade das espécies químicas da amostra no tipo de suporte a ser utilizado para obter uma boa separação na cromatografia planar (**TAB. 05**) (20,46).

A **TAB. 05** mostra as propriedades de alguns solventes utilizados em cromatografia planar.

TABELA 05 - Propriedades de alguns dos solventes utilizados em cromatografia planar (20, 47).

Solvente	Fórmula/Estrutura	Peso Mol.	Índice polar	Limite UV (nm)	Índice de Refração (25°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Viscosidade em CP a 25°C	Densidade g/mL a 25°C
Acetato de Etila		88,11	4,3	255	1,370	77	0,43	0,902
Acetona		58,08	5,4	330	1,359	56	0,30	0,791
Acetonitrila		41,05	6,2	190	1,344	82	0,34	0,786
Ácido Acético		60,05	-	235 (1%)	1,370	118	1,10	1,049
Água		18,02	9,0	180	1,330	100	1,00	0,997
Etanol		46,07	5,2	205	1,361	78	1,20	0,785
Metanol		32,04	6,6	205	1,326	65	0,54	0,791
Metiletilcetona (MEC)		72,11	4,5	330	1,376	80	0,38	0,805
n-Butanol		74,12	3,9	215	1,399	118	2,98	0,810
Tetrahidrofurano		72,11	4,2	215	1,407	66	0,40	0,880

A afinidade dos componentes da amostra com a fase móvel em cromatografia está diretamente relacionada à polaridade do solvente. Quanto mais hidrófilos (maior afinidade pela água) os componentes da amostra, maior deve ser o valor da polaridade do solvente para ser possível carregá-los até o final do suporte (frente do solvente, $R_f = 1$), ficando no ponto de partida ($R_f = 0$) as substâncias hidrófobas (menor afinidade pela água). Entretanto, existe a interação da amostra com o suporte e esta força de interação se opõe à força de arraste da fase móvel, retardando o avanço dos componentes da amostra. É portanto, fundamental estudar as propriedades da fase móvel e estacionária para melhor separação dos analitos (20, 48). A polaridade é resultante das forças de atração entre as moléculas e os grupos de ligação que formam as estruturas moleculares. A polaridade dos solventes aumenta quanto mais próximo este valor estiver ao da água. É possível observar na **TAB. 05** que alguns dos solventes mais polares são metanol e etanol.

Em relação ao peso molecular, segue a regra de que quanto maior o peso molecular, mais apolar será este solvente. A viscosidade e a densidade estão relacionadas à velocidade de migração do solvente pelo suporte, portanto quanto mais denso e viscoso, mais difícil será a migração, conseqüentemente, maior o tempo de análise. Na cromatografia planar, o solvente a ser utilizado também pode ser escolhido de acordo com o ponto de ebulição, sendo mais recomendados aqueles que possuem baixo ponto de ebulição, pois formam vapores com maior facilidade, saturando a cuba rapidamente e favorecendo o desenvolvimento cromatográfico com maior homogeneidade (20,21).

Existem outras técnicas aperfeiçoadas em cromatografia planar que evitam a tendência do solvente evaporar, a saber: Desenvolvimento forçado em cromatografia em camada delgada (*forced flow thin layer chromatography, FFTLC*) e Desenvolvimento pressurizado em cromatografia em camada delgada (*over pressure thin layer chromatography, OPTLC*), em que o solvente é bombeado em um determinado fluxo para que ocorra o desenvolvimento cromatográfico (41).

3.4.3.3 Métodos cromatográficos disponíveis na literatura para controle radioquímico de radiofármacos de ^{99m}Tc

A determinação de % PRq é um dos aspectos mais importantes no controle de qualidade de radiofármacos. Embora existam monografias na FA e FE para avaliar a % PRq dos radiofármacos de ^{99m}Tc , ainda não estão definidos até o momento as especificações destes radiofármacos na farmacopéia brasileira (FB) (3,49).

Existem diversas publicações para a determinação da % PRq por cromatografia planar (CP e CCD) com sistemas distintos dos descritos nas FA e FE para radiofármacos de ^{99m}Tc (TAB. 06).

TABELA 06 - Sistemas cromatográficos descritos na literatura para determinação de %PRq dos radiofármacos marcados com ^{99m}Tc .

Radiofármacos de ^{99m}Tc	Sistemas Cromatográficos		Ref.
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	
DISIDA	TLC-SG e metanol	Papel cromatográfico pré-tratado com tampão carbonato:bicarbonato $0,3\text{mol L}^{-1}$ e MEC	9
	ITLC-SG e metanol 85%	W3MM e NaCl 30%	23
	ITLC-SG e acetonitrila 50%	W3MM pré-tratado com NaHCO_3 e 2-butanona	19
	ITLC-SG ou W1MM e NaCl 0,9%	—	50
	ITLC-SG ou W1MM e Acetona	—	
	W1MM e NaCl 0,9%	W1MM e MEC	51
	ITLC-SG e metanol	ITLC-SA e NaCl 20%	52
	ITLC-SG e acetonitrila/água	ITLC-SG e MEC	
	ITLC-SG e água	ITLC-SA pré-tratada com NaCl 10%	
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SA e NaCl 10-30%	

TABELA 06 - Continuação.

Radiofármacos de ^{99m}Tc	Sistemas Cromatográficos		Ref.
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	
DMSA	TLC-SA e n-butanol saturado com HCl 0,3 mol L ⁻¹	—	9
	—	ITLC-SG e MEC	10/24/54/ 53
	—	ITLC-SA e acetona	40/53
	TLC-SG e NaCl 0,9%	W3MM e acetona	23
	—	W3MM ou W1MM e acetona	53
	—	ITLC-SG e 2-butanona	19
	—	GMCP-SA e MEC	54
	—	ITLC-SA e MEC	24
DTPA	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e MEC	10
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W1MM e acetona	23
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetona	14/50
	—	ITLC-SG e acetato de butila	14
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e 2-butanona	19
	W1MM e NaCl 0,9%	W1MM e acetona	50
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e MEC	24/54/55
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W31ET e acetona	40
	W1MM e NaCl 0,9%	W1MM e MEC	51
	—	ITLC-SA e água:metanol:clorofórmio (3:40:60) v/v	56
	—	W31ET ac. acético 5% em acetona	
	—	TLC e MEC	57
	—	ITLC-SG e acetona	53
	—	ITLC-SG e MEC	
	—	W3MM ou W1MM e acetona	
	—	W1MM e MEC	
	GMCP-SA e NaCl 0,9%	GMCP-SA e MEC	54
	W3MM e NaCl 0,9%	W3MM e MEC	29/58
	W1MM e NaCl 0,9%	W1MM e propanona	59

TABELA 06 - Continuação.

Radiofármacos de ^{99m} Tc	Sistemas Cromatográficos		Ref.
	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	
EC	ITLC-SG e ac. acético 0,5 mol L ⁻¹	ITLC-SG e acetona	23
	ITLC-SG e ac. acético 0,5 mol L ⁻¹	W3MM e acetona	19
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetona	60
	ITLC-SG e ac. acético 0,5 mol L ⁻¹	W4Chr e acetona	61
	ITLC-SG e ac. acético 0,5 mol L ⁻¹	W1MM e MEC	62
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetonitrila:água (1:1) v/v	63
ECD	ITLC-SG e acetona	TLC-SG e NaCl 20%	23
	ITLC-SG e MEC	ITLC-SG e NaCl 0,9%	24
	ITLC-SA e MEC	ITLC-SA e NaCl 0,9%	
	—	ITLC-SG e acetona	64
	* TLC-SG e acetato de etila		10/19/65
	* TLC-SG fase reversa e acetona:acetato de amônio 0,5 mol L ⁻¹ (60:40) v/v		9/66
	* W1MM e metanol:água (85:15) v/v		59
	* W3MM e acetato de etila		64
	* W17M e acetato de etila		
* ITLC-SG e solução de amônia concentrada:etanol:água (1:2:5)			
* ITLC-SG e salina			
FITATO	—	ITLC-SG, W1MM ou W3MM e acetona	53
	—	ITLC-SG e MEC	
MAA	—	Whatman e metanol 85%	9/67
	—	W31ET e acetona	40
	—	W1MM e acetona	50/68
	—	W1MM e NaCl 0,9%	
	—	W3MM e acetona	53/67
	—	W3MM e NaCl 0,9%	
	—	ITLC-SA e NaCl 0,9%	67
	—	ITLC-SA e acetona	
	—	ITLC-SA ou ITLC-SG e MEC	24
	—	ITLC-SG e NaCl 0,9%	50/67

* Utilização de apenas um sistema cromatográfico para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

TABELA 06 - Continuação.

Radiofármacos de ^{99m}Tc	Sistemas Cromatográficos		Ref.
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	
MAA	—	ITLC-SG e NaCl 20%	53
	—	ITLC-SG e metanol 85%	66
	—	ITLC-SG e metanol	53
	—	ITLC-SG e acetona	50/67
	W3MM e NaCl 0,9%	W3MM e metanol 85%	9/29/58
MDP	ITLC-SG e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	ITLC-SG e MEC	10/54
	1 Chr, 4Chr, 54 SFC e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	1 Chr, 4Chr, 54 SFC e MEC	25
	W3MM e NaCl 0,9%	W3MM e Acetona	23
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W31ET e acetona	40
	—	ITLC-SA e água:metanol:clorofórmio (3:40:60) v/v	56
	—	W31ET e ac. acético 5% em acetona	56
	—	TLC e MEC	57
	TLC-SG e NaCl 0,9%	TLC-SG e metanol:acetona (1:1) v/v	69
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetona	50/70
	Whatman ou ITLC-SG e acetona	Whatman ou ITLC-SG e NaCl 0,9%	71
	ITLC-SG ou ITLC-SA e NaCl 0,9%	ITLC-SG ou ITLC-SA e MEC	24
MIBI	ITLC-SG acetona	ITLC-SG e NaCl 0,9%	72
	* TLC-SG fase reversa e THF : acetato de amônio 0,05 mol L ⁻¹ : metanol : acetonitrila (10:20:30:40)		9/10/33
	* ITLC-SG e acetato de etila:metanol (8:2)		23
	* Whatman ou ITLC-SG e clorofórmio:metanol (9:1)		71
	* TLC e etanol		19/71/73/74 /75/76
	* TLC e clorofórmio:THF (1:1)		77/78
	* W31ET e acetato de etila		74

* Utilização de apenas um sistema cromatográfico para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

TABELA 06 - Continuação.

Radiofármacos de ^{99m}Tc	Sistemas Cromatográficos		Ref.
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	
PIRO	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W3MM e acetona	9/23
	ITLC-SG e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	ITLC-SG e acetona	10
	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W31ET e acetona	40
	W1MM e NaCl 0,9%	W1MM e acetona	50
	ITLC-SG NaCl 0,9%	ITLC-SG e MEC	55
	—	ITLC-SG ou W3MM e acetona	53
	— —	W1MM e metanol ITLC-SG e MEC	
SAH	—	ITLC-SG e MEC	10
	—	ITLC-SG e acetona	14/9/50
	—	ITLC-SG e metanol	23
	—	ITLC-SG e metanol 85%	14/53
	—	ITLC-SG e acetato de butila	14
	—	ITLC-SG e NaCl 0,9%	14/19/50
	—	ITLC-SG e NaCl 20%	53
	—	W1MM e NaCl 0,9%	14/53/68
	—	W1MM e acetona	50/53/68
	—	W1MM e metanol	53
	—	W3MM e acetona	
Sn COLOIDAL	—	ITLC-SG e NaCl 0,9%	10/19/54
	—	Whatman e acetona	29/58
	—	Whatman e NaCl 0,9%	
	—	GMCP-SA e NaCl 0,9%	54

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes liofilizados (RL) e o eluído de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, obtido do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, foram provenientes do IPEN-CNEN/SP. No gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, o ^{99}Mo nas colunas cromatográficas de Al_2O_3 foram provenientes de dois países diferentes (Argentina e África do Sul). Foram realizados ensaios de controle da concentração de Alumínio no eluato utilizado na marcação do RL.

Os Reagentes Liofilizados analisados foram:

- DISIDA • DTPA • ECD • MDP • PIRO • SnColoidal
- DMSA • EC • GHA • MIBI • SAH

Os solventes e reagentes utilizados no preparo da fase móvel foram de grau PA e provenientes da Merck. Os reagentes foram pesados em balança analítica Shimadzu modelo AW-220. As soluções foram preparadas com água purificada obtida de purificador Elix-10 da Millipore com reservatório de 30 litros.

Solventes:

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetonitrila
- Ácido acético
- Etanol
- Metanol
- Metiletilcetona (MEC)
- Tetraidrofurano (THF)

Soluções:

- Acetato de sódio $1,66 \text{ mol L}^{-1}$
- Acetato de amônio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
- Ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
- Solução Tampão de carbonato:bicarbonato $0,3 \text{ mol L}^{-1}$
- Metanol 85%
- NaCl 0,9%, 20% e 30%
- Solução de cloreto estano 2mg mL^{-1}

Os suportes cromatográficos de diferentes tipos e dimensões estão relacionados na **TAB. 07**.

TABELA 07- Tipos e dimensões dos suportes cromatográficos.

Tipos de suporte	Dimensões (cm) / (Corrida (cm))		Fornecedor
	(comprimento x largura)		
TLC-celulose		17,5 x 1,5 / (15)	Merck
TLC-SG		12,5 x 1,5 / (10)	
		17,5 x 1,5 / (15)	
TLC-SG fase reversa		7,5 x 2,5 / (5)	Merck
		9,5 x 2,5 / (7)	Merck e Nagel
		12,5 x 2,5 / (10)	
HPTLC-celulose		9,5 x 1,5 / (7)	Merck
HPTLC-SG		9,5 x 1,5 / (15)	
ITLC-SG		17,5 x 1,5 / (15)	Pall Corporation
		12,5 x 1,5 / (10)	
W1MM		17,5 x 1,5 / (15)	Whatman
		12,5 x 1,5 / (10)	
W3MM		17,5 x 1,5 / (15)	
		12,5 x 1,5 / (10)	
W17M		17,5 x 1,5 / (15)	
		12,5 x 1,5 / (10)	
W31ET		17,5 x 1,5 / (15)	

Os suportes foram cortados em segmentos de 1 cm para contagem da radioatividade (cpm) em contador gama Perckin Elmer modelo Cobra D-5002. O perfil cromatográfico do ECD foi obtido previamente, em radiocromatógrafo BioScan modelo AR 2000. Também foram avaliadas diferentes bases nos suportes, a saber: **TLC-SG**: alumínio e plástico; **TLC-celulose**: alumínio e plástico e **TLC-SG fase reversa**: alumínio e vidro.

4.2 Métodos

A marcação dos RL com ^{99m}Tc foi feita de acordo com as metodologias descritas em procedimentos na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do

IPEN-CNEN/SP de modo a obter concentração radioativa de cerca de $55,5 \text{ MBq mL}^{-1}$ ($1,5 \text{ mCi mL}^{-1}$). A % PRq foi determinada pelo cálculo da % Impureza (item 3.4.3 - Equação 2) e pela equação de balanço de massa (item 3.4.3 - Equação 3). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão considerando-se análises em duplicata de dois frascos para cada um dos tempos de marcação. A determinação da % PRq foi acompanhada em até 4 horas após a marcação do RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O número de repetições mínimo (quantidade de vezes que a análise foi realizada em mesmas condições) foi de três vezes. A análise dos dados foi realizada, utilizando-se o coeficiente de variação (CV) e as diferenças foram consideradas significativas quando excederam 5%. A **FIG. 5** representa o fluxograma de metodologias de marcação dos RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em temperatura ambiente, conforme procedimentos da DIRF.

FIGURA 5 - Fluxograma das metodologias de marcação dos RL com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (33).

4.2.1 Métodos cromatográficos utilizados para a determinação de % PRq em radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Os diferentes sistemas cromatográficos para cada RL na determinação das impurezas (% $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$, % $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) estão descritos na **TAB. 08**.

TABELA 08 - Sistemas cromatográficos para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em cada RL.

RL	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
DISIDA	Metanol (TLC-SG ^{FA}) Metanol 85% (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, HPTLC-SG, W17M, W31ET, W3MM)	MEC (HPTLC-SG, W1MM ^{FA}) NaCl 30% (W3MM ^{IPEN})
DMSA	NaCl 0,9% (TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W3MM ^{IPEN})	Acetona (TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W1MM, W3MM ^{IPEN}) MEC (ITLC-SG ^{FE} , TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W1MM, W3MM)
DTPA	NaCl 0,9% (W3MM ^{IPEN} , ITLC-SG ^{FE})	Acetona (W3MM ^{IPEN}) MEC (W3MM, ITLC-SG ^{FE})
EC	Ác. Acético 0,5 mol L ⁻¹ (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, HPTLC-Cel, W3MM, W1MM) Acetona (ITLC-SG ^{IPEN} , W1MM, W3MM)	Acetona (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, HPTLC-Cel, W3MM, W1MM) NaCl 20% (TLC-SG ^{IPEN})
ECD	* Acetato de etila (ITLC-SG, TLC-SG ^{FA e FE} , HPTLC-SG, HPTLC-Cel, W17M, W31ET, W3MM) * Acetona:acetato de amônio 0,5 mol L ⁻¹ 60:40 (TLC-fase reversa ^{FA}) * Acetona:acetato de amônio 0,5 mol L ⁻¹ 80:20 (TLC-fase reversa) * Acetato de etila: etanol 30: 70 (HPTLC-SG, HPTLC-Cel, W17M, W31ET, W3MM) * Etanol (HPTLC-SG, HPTLC-Cel, W17M, W31ET, W3MM)	
GHA	NaCl 0,9% (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-Cel)	Acetona (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-Cel)
MDP	Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹ (ITLC-SG ^{FE}) NaCl 0,9% (W3MM ^{IPEN e FA})	Acetona (W3MM ^{IPEN}) Metanol 85% (W3MM ^{FA}) MEC (ITLC-SG ^{FE} , W3MM)
MIBI	* Acetato de etila:metanol (8:2) (ITLC-SG ^{IPEN} , W3MM, W1MM) * Acetonitrila:metanol:ac. amônio 3,85%:THF (4:3:2:1) (TLC-fase reversa ^{FE e FA})	
PIRO	Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹ (TLC-Cel, ITLC-SG ^{FE} , HPTLC-Cel) NaCl 0,9% (TLC-Cel, ITLC-SG ^{IPEN e FA} , HPTLC-Cel, W31ET)	NaCl 0,9% (TLC-SG) Acetona (ITLC-SG ^{FA e W3MM^{IPEN}})
SAH	Metanol 85% (ITLC-SG ^{IPEN} , TLC-SG, W1MM, W3MM), Acetona (ITLC-SG ^{FA} , W3MM) e MEC (ITLC-SG ^{FE})	
Sn Coloidal	–	Acetona (ITLC-SG ^{FE} , TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W1MM e W3MM) NaCl 0,9% (TLC-SG, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W1MM, W3MM ^{IPEN})

* Utilização de mesmo sistema para a determinação de ambas impurezas ($^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Legenda: ^{FA}(Farmacopeia americana), ^{FE}(Farmacopeia europeia), ^{IPEN}(Metodologia IPEN-CNEN/SP)

Foi feita a comparação das metodologias de cromatografia planar descritas na FA, FE e IPEN para controle radioquímico de RL para radiodiagnóstico marcados com ^{99m}Tc . Além disso, devido à descontinuidade na fabricação do suporte ITLC-SG pela Pall Corporation, material bastante recomendado principalmente nas monografias da FE, foi necessário buscar sistemas alternativos ao ITLC-SG. Neste trabalho foram avaliados os suportes de TLC-SG, TLC-celulose, HPTLC-SG, HPTLC-celulose, W1MM, W3MM, W17M e W31ET.

Nos suportes HPTLC, a quantidade de amostra aplicada e o comprimento do suporte foram menores que os utilizados em TLC, conforme foi recomendado pelo fabricante (43).

Foram aplicadas alíquotas de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para determinação dos seus respectivos R_f em cada um dos sistemas cromatográficos (fase estacionária - suporte e fase móvel - solvente).

O $^{99m}\text{TcO}_2$ foi preparado segundo o método descrito por TSOPELAS, C. e colaboradores e ALMEIDA, E.V. (33, 64), detalhado a seguir:

Preparação do $^{99m}\text{TcO}_2$:

Para a obtenção de $^{99m}\text{TcO}_2$, foi preparada uma solução de cloreto estano na concentração de 2mg mL^{-1} . Nesta solução foi adicionada, aos poucos, uma solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (obtida de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) com atividade radioativa de cerca de 40 MBq mL^{-1} ($1,0\text{ mCi}$), até se observar turbidez. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e realizado o ajuste até pH 8,0 com NaOH 1 mol L^{-1} . Para confirmação da formação de $^{99m}\text{TcO}_2$, foram realizadas análises em sistema cromatográfico com R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ definido.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises realizadas nos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ para determinação da concentração de alumínio (Al^{3+}) estão descritos a seguir:

- **Procedência Argentina:** concentração de Al^{3+} no eluato do gerador entre 0,6 a 9,9 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- **Procedência África do Sul:** concentração de Al^{3+} no eluato do gerador entre 0,2 a 8,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na **TAB. 09** estão relacionados os R_f de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ obtidos experimentalmente em cada um dos sistemas cromatográficos.

TABELA 09 - R_f de ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ em diferentes sistemas cromatográficos.

Solvente		Impureza	Suporte Cromatográfico								
			ITLC-SG	TLC-SG	TLC cel	HPTLC SG	HPTLC cel	W1MM	W3MM	W17M	W31ET
Acetato de etila	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0 - 0,1	0	0	0 - 0,1	0	0	0	0	0
Acetato de etila:etanol (30:70)	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,5-0,7	--	0,8-0,9	0,1-0,3	0-0,3	0-0,5	0,8-0,9	0,7-0,9	0,7-0,9
Acetato de etila:etanol (70:30)	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,5-0,7	--	0,7-0,8	0,1-0,3	0-0,3	0-0,4	0,6-0,8	0,6-0,9	0,6-0,9
Ac. etila: metanol (80:20)	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	0,8 - 1	0,5-0,7	0-0,2	0,7 - 0,8	0 - 0,1	0-0,3	0-0,4	0-0,6	0-0,6	0-0,6
Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0-0,1	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,9-1	0,6-0,7	0,8-0,9	0,8-0,9	--	--	0,7-0,9	0,8-0,9	0,8-0,9
Acetona	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0-0,1	0
	^{9m} TcO ₄ ⁻	1	0,8 - 1	1	1	0,8 - 1	0,7 - 0,9	0,7 - 0,9	0,9-1	0,9-1	0,9-1
Ac. Acético 0,5 mol L ⁻¹	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	1	1	0,6 - 0,8	0,8 - 1	0,8 - 1	0,7 - 0,8	0,7 - 0,9	0,8-1	0,8-0,9	0,8-0,9
MEC	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,9-1	1	1	1	0,8-0,9	0,9-1	0,8-1	0,8-1	0,8-1
Metanol 85%	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,7 - 0,9	0,6 - 0,7	0,9 - 1	0,8 - 0,9	0,4 - 0,6	0,4 - 0,7	0,7-0,9	0,7-0,8	0,7-0,8
NaCl 0,9%	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	--	0,9 - 1	0,6 - 0,8	0,9 - 1	0,9 - 1	0,7 - 0,8	0,7 - 0,9	0,8-1	0,8-1	0,8-1

Os suportes de TLC-SG com base de vidro e plástico não foram aplicáveis ao controle radioquímico de RL, pois apresentaram dificuldades no manuseio, a saber:

- **Plástico:** apresentou-se como um material resistente ao corte em segmentos de 1 cm causando dificuldade em acondicioná-los nos tubos para contagem da radioatividade em contador gama.

- **Vidro:** houve a necessidade de realizar a raspagem do material adsorvente (no caso sílica gel de fase reversa) com espátula para acondicionar no tubo do contador gama, o que tornou a análise trabalhosa, consequentemente demandando maior tempo de análise, risco de contaminação e perda de material.

O tempo médio de análise com a utilização de suporte com base de plástico ou vidro foi superior a 2 horas. No suporte com base de vidro, o tempo de corrida do solvente foi cerca de 20 minutos e foi acrescido de tempo de secagem, raspagem da fase estacionária do suporte e acondicionamento em tubos, totalizando cerca de 2 horas.

Houve maior dificuldade no manuseio quando a fase estacionária foi de celulose, quando comparada com a de sílica gel, tanto em base de plástico quanto em alumínio.

O R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ foi igual a zero na maioria dos sistemas cromatográficos, enquanto o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi variável, o que permitiu selecionar o sistema mais adequado para obter a melhor separação entre as espécies, conforme as características dos RL. Não foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em acetato de etila, acetato de etila:etanol (proporções 30:70 e 70:30), acetato de sódio $1,66 \text{ mol L}^{-1}$, MEC, metanol 85% e NaCl 0,9% em suporte ITLC-SG fabricado pela Pall Corporation devido à falta deste suporte no momento do ensaio (**TAB. 09**).

Apenas em acetato de etila, as duas impurezas ($^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$) permaneceram na origem, independentemente do suporte.

Com o uso de acetato de etila:etanol (proporções 30:70 ou 70:30) e os suportes HPTLC-cel, W1MM ou W3MM, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ficou retido nos primeiros segmentos, apresentando arraste (variação de R_f entre 0 a 0,5). Nos demais suportes, a mistura dos solventes deslocou $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para a região entre o meio e final do suporte (variação de R_f entre 0,5 a 0,9). Nos suportes W17M e W31ET e

solvente acetato de etila:etanol, nas proporções 30:70 e 70:30, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ apresentou arraste ao longo do suporte, sendo registrado na **TAB. 09** apenas os segmentos de maior contagem de radioatividade (R_f entre 0,6 a 0,9).

Em acetato de etila:metanol (80:20) e ITLC-SG o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi $R_f = 0,8 - 1$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ permaneceu na origem. Nos suportes TLC-SG e HPTLC-SG com a mesma mistura de solventes, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram iguais a 0,5 – 0,7 e 0,7 – 0,8, respectivamente. Nos suportes TLC-cel, HPTLC-cel, W1MM e W3MM, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram próximos à zero. Em W17M e W31ET, ocorreu arraste de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ da base até o meio do suporte ($R_f = 0 - 0,6$).

Em acetato de sódio $1,66 \text{ mol L}^{-1}$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ apresentou comportamento semelhante nos suportes TLC-cel, HPTLC-SG, HPTLC-cel, W17M e W31ET (variação do R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ entre 0,6 – 0,9) e para o suporte TLC-SG o R_f ficou entre 0,9 a 1.

Em acetona, na maioria dos suportes $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi carregado até a porção final ($R_f = 1$), exceto com a utilização de W1MM ou W3MM, em que os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ apresentaram variação entre 0,7 a 0,9.

Em ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e ITLC-SG ou TLC-SG, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ correu com a frente do solvente até $R_f = 1$. Com o uso de HPTLC-SG, HPTLC-cel ou W17M, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram de 0,8 – 1, e em W31ET foi igual a 0,8 – 0,9. Nos demais suportes, ocorreu arraste de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ indicado com R_f entre 0,6 – 0,9.

Os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em MEC foram semelhantes aos encontrados com o uso de acetona.

Com W1MM e W3MM em metanol 85%, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram iguais a 0,4 – 0,6 e 0,4 – 0,7, respectivamente. Nestes suportes, o metanol 85% não conseguiu carregar a impureza até o final, entretanto em todos os suportes observou-se arraste ao utilizar este solvente. Metanol 85% e o NaCl 0,9% foram os solventes cujos tempos de análises foram os maiores (cerca de 3 horas para metanol 85% e 2 horas para NaCl 0,9%).

5.1 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DISIDA- ^{99m}Tc

As metodologias por cromatografia planar descritas na FA e no IPEN para o controle radioquímico da DISIDA- ^{99m}Tc estão relacionadas na **TAB. 10**.

TABELA 10 - Sistemas cromatográficos (FA e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DISIDA- ^{99m}Tc .

Impureza	Sistemas Cromatográficos	
	FA	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	TLC-SG e metanol	ITLC-SG e metanol 85%
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Papel cromatográfico* e MEC	W3MM e NaCl 30%

* ensaio realizado também com os suportes embebidos em solução tampão carbonato:bicarbonato.

Na FA e IPEN estão descritos sistemas para a determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ separadamente, e a FE não descreve metodologia de controle radioquímico para a DISIDA- ^{99m}Tc (**TAB. 10**).

No sistema para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ descrito na FA é necessário realizar o pré-tratamento do papel cromatográfico com solução tampão carbonato:bicarbonato $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0 (9). Neste estudo, os papéis cromatográficos W1MM e W3MM foram avaliados por serem alguns dos mais utilizados em cromatografia planar. Além dos sistemas relacionados na **TAB. 10**, foram estudados outros suportes cromatográficos a fim de buscar alternativas ao ITLC-SG utilizado pelo IPEN.

Em cada um dos sistemas foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e DISIDA- ^{99m}Tc (**TAB. 11**).

TABELA 11 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$ nos sistemas cromatográficos.

R_f nos suportes cromatográficos

Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM	W17MM	W31ET
MEC	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	** 0	** 0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,9-1	1	1	** 0,8-0,9 ^{FA}	** 0,9-1 ^{FA}	0,8-1	0,8-1
	$\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$	--	--	0-0,3	0-0,1	** 0-0,1	** 0-0,1	--	--
NaCl 30%	$^{99m}\text{TcO}_2$	--	--	--	--	--	** 0	--	--
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	--	--	--	--	** 1 ^{IPEN}	--	--
	$\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$	--	--	--	--	--	** 0	--	--
Metanol 85%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{IPEN}	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,7-0,9	0,9-1	0,8-0,9	0,4-0,6	0,4-0,7	0,7-0,9	0,7-0,8
	$\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	0,8-1	0,8-0,9	0,9-1	0,9-1	--	0,8-1	0,8-1
Metanol PA	$^{99m}\text{TcO}_2$	--	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,7-0,9 ^{FA}	0,9-1	0,8-0,9	0,4-0,6	0,4-0,7	0,7-0,9	0,7-0,8
	$\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$	--	0,8-1	0,8-0,9	0,9-1	--	--	--	--

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

** ensaio realizado também com os suportes embebidos em solução tampão carbonato:bicarbonato.

Em MEC e NaCl 30%, os R_f da $\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$ foram próximos a zero, enquanto que em metanol 85% e metanol PA o valor do R_f variou de 0,8 a 1. Não houve diferença no R_f da $\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$ quando se utilizou metanol 85% ou metanol PA (**TAB. 11**).

O $^{99m}\text{TcO}_2$ pode ser determinado em sistema com metanol 85% ou metanol PA, considerando-se que o $\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ apresentaram o mesmo R_f . Entretanto, o uso dos suportes W3MM ou W1MM para determinação de $^{99m}\text{TcO}_2$ não é recomendável, devido ao tempo de corrida de cerca de 2 horas e arraste do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ao longo do suporte (R_f entre 0,4-0,7) (**TAB. 9 e 11**).

O $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser determinado em sistema com MEC ou NaCl 30%.

Foram realizados ensaios com a finalidade de verificar possível alteração nos valores dos R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DISIDA-}^{99m}\text{Tc}$ com ou sem o

pré-tratamento do papel cromatográfico com solução tampão (recomendado pela FA). Os resultados de R_f foram semelhantes e por isso não foram relacionados separadamente na **TAB. 11**.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos diferentes sistemas estão apresentados na **TAB. 12**.

TABELA 12 - % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DISIDA- ^{99m}Tc .

		% Impureza nos Suportes cromatográficos					
Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_2$	Metanol P.A.	--	3,64±0,19 ^{FA}	3,20±0,22	2,44±0,33	--	--
	Metanol 85%	0,22±0,07 ^{IPEN}	2,01±0,17	4,20±0,69	0,65±0,14	1,44±0,15	0,73±0,03
	MEC	--	--	--	--	** 0,66±0,04 ^{FA}	** 0,67±0,06 ^{FA}
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	NaCl 30%	--	--	--	--	--	** 0,95±0,10 ^{IPEN}

** ensaio realizado também com os suportes embebidos em solução tampão carbonato:bicarbonato.

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ obtida com o sistema do IPEN (0,22%) foi inferior ao da FA, 3,64% (metanol PA e TLC-SG). Com metanol PA os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ variaram de 2,44 a 3,64% e com metanol 85% variaram de 0,22 a 4,20%, dependendo do suporte utilizado. O resultado mais próximo ao obtido com ITLC-SG foi aquele em que se utilizou HPTLC-celulose em metanol 85% (**TAB. 11**). O tempo de corrida com metanol 85% e HPTLC-celulose foi de cerca de 20 minutos.

Na determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, os resultados obtidos com o sistema MEC com papel cromatográfico W1MM ou W3MM embebido em tampão de carbonato:bicarbonato (FA) foram comparáveis aos obtidos com NaCl 30% e W3MM (IPEN) (**TAB. 11**).

Nos suportes com base de celulose (ITLC-SG, HPTLC-cel, W1MM e W3MM) e metanol 85%, as % $^{99m}\text{TcO}_2$ foram 0,22; 0,65; 1,44 e 0,73%,

respectivamente e em TLC-SG e HPTLC-SG, foram iguais a 2,01 e 4,20%, respectivamente. Por possível interação de DISIDA- ^{99m}Tc com os suportes TLC-SG ou HPTLC-SG, as % $^{99m}\text{TcO}_2$ foram maiores do que as obtidas com os suportes a base de celulose.

As % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtidas pelo sistema W3MM e NaCl 30% com ou sem a utilização do pré-tratamento com solução tampão conforme recomendado pela FA estão apresentados na **TAB. 13**. Na **TAB. 13** também estão relacionados os resultados de % PRq de DISIDA- ^{99m}Tc até 240 minutos após a marcação.

TABELA 13 - % PRq de DISIDA- ^{99m}Tc até 240 minutos após a marcação.

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistema	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	%PRq
30	0,22± 0,07	ITLC-SG	0,95± 0,10	W3MM	98,83 ± 0,08
240	0,34± 0,08	(metanol 85%) ^{IPEN}	1,13± 0,09	(NaCl 30%) ^{IPEN}	98,53 ± 0,08
30	3,64± 0,19	TLC-SG	0,67± 0,06	W3MM (MEC) ^{FA}	95,69 ± 0,12
240	3,76± 0,15	(metanol PA) ^{FA}	0,69± 0,05		95,55 ± 0,10
			0,66± 0,04	W1MM (MEC) ^{FA}	95,70 ± 0,11
			0,75± 0,06		95,49 ± 0,10
30	0,65±0,14	HPTLC-celulose	0,92± 0,14	W3MM (NaCl 30%) **	98,43 ± 0,14
240	0,81± 0,16	(metanol 85%)	1,08± 0,14		98,11 ± 0,15

** ensaio realizado com os suportes embebidos em solução tampão carbonato:bicarbonato.

As % PRq determinadas pelos sistemas descritos na FA, IPEN e com o sistema HPTLC-cel com metanol 85% ($^{99m}\text{TcO}_2$) e W3MM com NaCl 30% ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) apresentaram-se acima de 95% e a variação entre os métodos foi de 3,22% após 240 minutos de marcação (**TAB. 13**).

5.2 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DMSA- ^{99m}Tc

As metodologias por cromatografia planar descritas nas FA, FE e IPEN para o controle radioquímico de DMSA- ^{99m}Tc estão relacionadas na **TAB. 14**.

TABELA 14 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$.

Sistemas Cromatográficos			
Impureza	FA	FE	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	TLC-SA e n-butanol saturado com HCl 0,3 mol L ⁻¹	—	TLC-SG e NaCl 0,9%
$^{99m}\text{TcO}_4^-$		ITLC-SG e MEC	W3MM e acetona

A FA recomenda o suporte TLC-SA e n-butanol saturado com HCl 0,3 mol L⁻¹ para determinar % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$, em R_f iguais a 0; 1 e 0,45 - 0,70, respectivamente. A FE descreve metodologia somente para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ recomendando o uso de ITLC-SG e MEC. O IPEN descreve metodologia para determinação % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em sistemas diferentes, sendo TLC-SG com NaCl 0,9% para determinar % $^{99m}\text{TcO}_2$ e W3MM com acetona, para determinar % $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Não foi possível avaliar o método descrito pela FA por não haver disponibilidade do suporte TLC-SA para a realização destas análises, sendo possível somente a comparação entre os métodos da FE e IPEN (**TAB. 14**). Além dos sistemas relacionados na **TAB. 14** foram avaliados outros suportes cromatográficos a fim de buscar alternativas ao ITLC-SG recomendado pela FE. Em cada um dos sistemas avaliados foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ (**TAB. 15**).

TABELA 15 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ nos sistemas cromatográficos.

		R_f nos suportes cromatográficos					
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	0,8-1	1	0,8-1	0,7-0,9	0,7-0,9 IPEN
	$\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$	0	0	0	0	0	0
MEC	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	* FE	0,9-1	1	1	0,8-0,9	0,9-1
	$\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$	0	0	0	0	0	0
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0 IPEN	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,9-1	0,9-1	0,9-1	0,7-0,8	0,7-0,9
	$\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$	0-0,4	0,8-1	0,8-1	0	0,4-1	0,4-1

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Em acetona e MEC, o R_f de $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual a zero em todos os suportes, enquanto que em NaCl 0,9% ocorreu uma variação de acordo com o suporte utilizado (**TAB. 15**).

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser determinado em sistema com acetona ou MEC, considerando-se que $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ apresentou o mesmo R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$.

A determinação de $^{99m}\text{TcO}_2$ pode ser realizada somente nos sistemas em que se utilizou NaCl 0,9%, pois o R_f do produto marcado ($\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$) e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram distintos do R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, com exceção dos suportes ITLC-SG e HPTLC-cel. Nos suportes ITLC-SG e HPTLC-cel desenvolvidos com NaCl 0,9%, $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ ficou retido nos primeiros segmentos ($R_f = 0-0,4$ e 0 respectivamente), enquanto que nos suportes TLC-SG e HPTLC-SG o $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ migrou com a frente do solvente ($R_f = 0,8$ a 1) (**TAB. 15**). Nos suportes W1MM e W3MM ocorreu maior arraste do produto ao longo do suporte resultando em R_f de $\text{DMSA-}^{99m}\text{Tc}$ entre 0,4 e 1 (**TAB 15**). Os suportes ITLC-SG ou HPTLC-cel não são adequados para a determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos sistemas avaliados estão apresentados na **TAB. 16**.

TABELA 16 - % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em DMSA- ^{99m}Tc .

% Impureza nos Suportes cromatográficos							
Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_2$	NaCl 0,9%	--	4,53±0,54	4,53±0,14	--	--	5,67±0,55 ^{IPEN}
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	MEC	0,20±0,05 ^{FE}	0,09±0,01	0,22±0,04	0,16±0,04	0,10±0,02	0,04±0,01
	Acetona	--	0,06±0,01	0,10±0,01	0,37±0,09	0,81±0,12	0,58±0,08

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ com TLC-SG ou HPTLC-SG e NaCl 0,9% foram iguais (4,53%) (**TAB. 16**). O desenvolvimento cromatográfico com o sistema W3MM e NaCl 0,9% apresentou arraste do produto ao longo do suporte, observado pela contagem ao longo do suporte e pode ter causado o aumento da % $^{99m}\text{TcO}_2$ (5,67%).

A % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variou de 0,04% a 0,22%, quando utilizou-se MEC (**TAB. 16**). Ao utilizar acetona como fase móvel, as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtidas com os suportes HPTLC-cel (0,37%), W1MM (0,81%) ou W3MM (0,58%) foram maiores do que as encontradas com os suportes TLC-SG (0,06%) e HPTLC-SG (0,10%), indicando que $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi carregado pela acetona mais facilmente para $R_f = 1$ em suportes com base de celulose.

Na **TAB. 17** estão relacionados os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de DMSA- ^{99m}Tc .

TABELA 17- % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de DMSA- ^{99m}Tc .

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistema	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	%PRq
30	—	—	0,20±0,05	ITLC-SG (MEC) ^{FE}	--
240	—	—	0,24±0,07		--
30	5,67±0,55	W3MM	0,58±0,08	W3MM	93,75 ± 0,31
240	5,91±0,87	(NaCl 0,9%)	0,70±0,06	(Acetona) ^{IPEN}	93,39 ± 0,46
30	4,53±0,14	HPTLC-SG	0,22±0,04	HPTLC-SG	95,25 ± 0,12
240	5,02±0,10	(NaCl 0,9%)	0,23± 0,01	(MEC)	94,77 ± 0,05
			0,10±0,01	HPTLC-SG	95,37 ± 0,07
			0,17± 0,06	(Acetona)	94,81 ± 0,08
30	4,53±0,54	TLC-SG	0,09±0,01	TLC-SG	95,38 ± 0,27
240	4,65±0,43	(NaCl 0,9%) ^{IPEN}	0,13±0,02	(MEC)	95,22 ± 0,22
			0,06±0,01	TLC-SG	95,41 ± 0,27
			0,09± 0,05	(Acetona)	95,26 ± 0,24

Não foi calculado o valor de % PRq pelo método descrito na FE, por não apresentar método descrito para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ (**TAB. 17**). Comparando a % PRq utilizando-se os suportes W3MM, HPTLC-SG e TLC-SG (IPEN), os resultados variaram entre 93,39 a 95,41%, com coeficiente de variação de 2,57% em 240 minutos. Nos casos em que foram determinados % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ utilizando-se acetona e MEC, a maior variação foi 0,17% na % PRq em 240 minutos de marcação.

5.3 Comparação entre metodologias para controle radioquímico de DTPA- ^{99m}Tc

As metodologias para controle radioquímico de DTPA- ^{99m}Tc descrita na FE e IPEN estão apresentadas na **TAB. 18**. A FA não apresenta método para controle radioquímico deste RL por cromatografia planar, mas apenas por eletroforese.

TABELA 18 - Sistemas cromatográficos (FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$.

Impureza	Sistemas Cromatográficos	
	FE	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W3MM e NaCl 0,9%
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	ITLC-SG e MEC	W3MM e acetona

Devido ao fato da FA não possuir metodologia por cromatografia planar para a determinação da % PRq de $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$, a análise comparativa foi realizada apenas entre os métodos da FE e IPEN. Em cada sistema foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$ (**TAB. 19**).

TABELA 19 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$ nos sistemas cromatográficos.

Solvente		R_f nos suportes cromatográficos	
		ITLC-SG	W3MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	0,7-0,9 ^{IPEN}
	$\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$	0	0
MEC	$^{99m}\text{TcO}_2$	--	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	* FE	0,9-1
	$\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$	0	0
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{FE}	0 ^{IPEN}
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,7-0,9
	$\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	1

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Em acetona ou NaCl 0,9% com W3MM, o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi igual a 0,7-0,9, e o R_f de $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual a 0 e 1, respectivamente.

A determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi possível nos sistemas em que se utilizou acetona ou MEC como fase móvel, porque tanto $^{99m}\text{TcO}_2$ quanto $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$ possuem R_f iguais a zero em ITLC-SG ou W3MM.

Os suportes utilizados com NaCl 0,9% podem ser aplicados na determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ em R_f igual a zero, pois os R_f de $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram próximos de 1.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos sistemas descritos na FE e IPEN estão apresentados na **TAB. 20**.

TABELA 20 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$.

Impureza	Solvente	% Impureza nos Suportes cromatográficos	
		ITLC-SG	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_2$	NaCl 0,9%	0,17±0,05 ^{FE}	0,24±0,01 ^{IPEN}
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	MEC	0,07±0,03 ^{FE}	0,38±0,09
	Acetona	--	0,31±0,05 ^{IPEN}

O valor de % $^{99m}\text{TcO}_2$ obtido pelo sistema da FE (ITLC-SG e NaCl 0,9%) foi de 0,17% e o obtido pelo sistema IPEN (W3MM e NaCl 0,9%) foi de 0,24%.

O resultado da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtido com o uso de MEC foi igual a 0,07% com ITLC-SG e igual a 0,38% com W3MM.

Para verificar a influência do solvente na determinação de % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, foram realizadas análises comparativas em um mesmo suporte cromatográfico (W3MM) com os solventes MEC (recomendado pela FE) e Acetona (recomendado pelo IPEN) e os resultados foram de 0,38 e 0,31%, respectivamente (**TAB. 20**).

Na **TAB. 21** estão apresentados os valores de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$.

TABELA 21- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de DTPA- ^{99m}Tc .

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistema	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	%PRq
30	0,17±0,05	ITLC-SG	0,07±0,03	ITLC-SG (MEC) ^{FE}	99,76 ± 0,04
240	0,29± 0,04	(NaCl 0,9%) ^{FE}	0,09± 0,05		99,62 ± 0,04
30	0,24±0,01	W3MM	0,31± 0,05	W3MM	99,45 ± 0,03
240	0,64± 0,03	(NaCl 0,9%) ^{IPEN}	0,40± 0,02	(Acetona) ^{IPEN}	98,96 ± 0,02

As % PRq obtidas nos sistemas descritos na FE e IPEN foram acima de 98% com variação de 0,72% entre os métodos para 240 minutos de marcação de DTPA- ^{99m}Tc .

5.4 Comparação das metodologias para controle radioquímico de EC- ^{99m}Tc .

Os compêndios oficiais utilizados neste estudo, FA e FE, não descrevem método para controle radioquímico para EC- ^{99m}Tc . O método utilizado no IPEN faz uso do suporte ITLC-SG para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (TAB. 22).

TABELA 22 - Sistemas cromatográficos (IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em EC- ^{99m}Tc .

Impureza	Sistemas Cromatográficos
	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	ITLC-SG e ac. acético 0,5 mol L ⁻¹
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	ITLC-SG e acetona

Devido à falta do ITLC-SG, foi realizado um estudo comparativo entre diferentes suportes cromatográficos com o mesmo solvente indicado na

metodologia IPEN para determinação da % PRq. Em cada um dos sistemas foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$, que estão apresentados na **TAB. 23**.

TABELA 23: R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ nos sistemas cromatográficos.

		R _f nos suportes cromatográficos					
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1 ^{IPEN}	0,8-1	1	0,8-1	0,7-0,9	0,7-0,9
	$\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$	0	0	0	0	0	0
Ac. acético 0,5 mol L ⁻¹	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{IPEN}	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	1	0,8-1	0,8-1	0,7-0,8	0,7-0,9
	$\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$	1	0,9-1	0,9-1	0,9-1	0,7-0,9	0,7-0,9

Em acetona e ácido acético 0,5 mol L⁻¹, o R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ foi igual a zero em todos os suportes utilizados.

O R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em acetona utilizando-se como suporte o ITLC-SG ou HPTLC-SG foi igual a 1; com TLC-SG ou HPTLC-cel ficou entre 0,8-1 e com W1MM ou W3MM ficou entre 0,7-0,9.

Em acetona, o R_f de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual a zero em todos os suportes avaliados. Em ácido acético 0,5 mol L⁻¹, o R_f de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ com os suportes ITLC-SG, TLC-SG, HPTLC-SG e HPTLC-cel foi próximo de 1, já com os suportes W1MM e W3MM o R_f de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ ficou entre 0,7-0,9. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ possui o mesmo comportamento que o $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ em ácido acético 0,5 mol L⁻¹, apresentando R_f semelhantes (**TAB. 23**).

Os sistemas que utilizaram acetona permitiram a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, pois $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ estão localizados em mesmo R_f , e nos sistemas em que foi utilizado ácido acético 0,5 mol L⁻¹ como fase móvel, os R_f de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram iguais, sendo possível determinar $^{99m}\text{TcO}_2$.

Os resultados de $\% ^{99m}\text{TcO}_2$ e $\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos sistemas avaliados estão apresentados na **TAB. 24**.

TABELA 24 - $\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\% ^{99m}\text{TcO}_2$ em $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$.

% Impureza nos Suportes cromatográficos							
Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_2$	Ac. Acético 0,5 mol L ⁻¹	1,30±0,17 IPEN	1,38±0,16	3,02±0,48	1,54±0,18	1,17± 0,24	1,32±0,29
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Acetona	0,41±0,02 IPEN	0,30±0,08	0,28±0,03	0,25±0,04	0,48±0,22	0,37±0,03

O tempo de análise, utilizando-se ácido acético 0,5 mol L⁻¹ com TLC-SG (40 min) foi aproximadamente o dobro do obtido com HPTLC-cel e HPTLC-SG (18 min). Os resultados da $\% ^{99m}\text{TcO}_2$ apresentaram variação de 1,17 a 3,02 %. Os valores de $\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram de 0,25 a 0,48% nos suportes avaliados.

Os melhores sistemas para a determinação da % PRq, considerando a melhor separação entre $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_2$, foi obtida com TLC-SG e HPTLC-Celulose, pois com o uso de W1MM e W3MM, ocorreu arraste de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ ao longo do suporte e tempo de análise superior ao TLC-SG.

Na **TAB. 25** estão apresentados os resultados de $\% ^{99m}\text{TcO}_2$, $\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$.

TABELA 25 - $\% ^{99m}\text{TcO}_2$, $\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$.

Tempo (min)	$\% ^{99m}\text{TcO}_2$	Sistema	$\% ^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	%PRq
30	1,30± 0,17	ITLC-SG	0,41± 0,02	ITLC-SG	98,57 ± 0,19
240	1,36± 0,17	(Acetona) IPEN	0,36± 0,05	(ac. acético 0,5 mol L ⁻¹) IPEN	98,53± 0,22
30	1,38±0,16	TLC-SG (Acetona)	0,30± 0,08	TLC-SG	98,32± 0,12
240	1,59± 0,02		0,65± 0,14	(ac. acético 0,5 mol L ⁻¹)	97,76± 0,08
30	1,54± 0,18	HPTLC-cel	0,25± 0,04	HPTLC-cel	98,21± 0,22
240	1,59± 0,16	(Acetona)	0,35± 0,06	(ac. acético 0,5 mol L ⁻¹)	98,05± 0,22

Os resultados de % PRq utilizando-se os suportes TLC-SG, HPTLC-cel e ITLC-SG, apresentaram coeficiente de variação de 1,07% em 240 minutos de marcação.

5.5 Comparação das metodologias para controle radioquímico de ECD-^{99m}Tc

As metodologias por cromatografia planar descritas na FA, FE e IPEN para o controle radioquímico de ECD-^{99m}Tc estão relacionados na **TAB. 26**.

TABELA 26 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em ECD-^{99m}Tc.

Impureza	Sistemas Cromatográficos		
	FA		FE
	Parte 1	Parte 2	IPEN
^{99m} TcO ₂	TLC-SG	TLC-SG fase reversa e	TLC-SG e
	e acetato	acetona:acetato de amônio	acetato de
	de etila	0,5 mol L ⁻¹ (60:40)	etila
^{99m} TcO ₄ ⁻			ITLC-SG e
			Acetona
			TLC-SG e
			NaCl 20%

A FE descreve a mesma metodologia de controle radioquímico para ECD-^{99m}Tc que um dos sistemas recomendados na FA (Parte 1). Na parte 1 do método da FA, o sistema indicado é TLC-SG/acetato de etila, sendo os R_f das impurezas ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ iguais a zero e o R_f do produto igual a 1. Na parte 2, é preconizado o uso de suporte cromatográfico de fase reversa (TLC-SG fase reversa) com acetona:acetato de amônio 0,5 mol L⁻¹ na proporção de 60:40 para determinar % ECD-^{99m}Tc, % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em R_f iguais a 0,15-0,44; 0 e 0,7-0,84, respectivamente, além de ECD(IV)-^{99m}Tc (R_f = 0,3 – 0,4) e EDTA-^{99m}Tc (R_f = 0,95 – 1).

Para ECD-^{99m}Tc foi também utilizado o radiocromatógrafo para avaliar o perfil da radioatividade ao longo do suporte antes da contagem radioativa dos segmentos em contador gama.

Na metodologia descrita na FA (Parte 2), utilizando-se apenas o suporte cromatográfico TLC-fase reversa com acetona:acetato de amônio 0,5 mol L⁻¹ na proporção 60:40, ^{99m}TcO₂ e ^{99m}TcO₄⁻ poderiam ser determinados separadamente. Entretanto, a análise de ECD-^{99m}Tc no solvente acetona:acetato de amônio 0,5 mol L⁻¹ na proporção 60:40 apresentou perfil cromatográfico (obtido por análise em radiocromatógrafo Bioscan) representado na **FIG. 6**.

FIGURA 6: Perfil cromatográfico ECD-^{99m}Tc em TLC-fase reversa/acetona:acetato de amônio na proporção 60:40.

Na **FIG. 6**, observou-se que ^{99m}TcO₄⁻ foi separado no final do suporte e o produto e ^{99m}TcO₂ permaneceram juntos na origem do suporte.

Para promover a separação de ^{99m}TcO₂, foi utilizado o solvente acetona:acetato de amônio 0,5 mol L⁻¹ na proporção 80:20 cujo perfil cromatográfico (obtido por análise em radiocromatógrafo Bioscan) está representado na **FIG. 7**.

FIGURA 7: Perfil cromatográfico ECD-^{99m}Tc em TLC-fase reversa com acetona : acetato de amônio na proporção 80:20.

Na **FIG 7**, observou-se que o produto foi carregado para o final do suporte, próximo ao R_f do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, e $^{99m}\text{TcO}_2$ foi separado em $R_f = 0$.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc em proporção de acetona:acetato de amônio 60:40 e 80:20 estão apresentados na **TAB. 27**.

TABELA 27: % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FA – Parte 2.

Sistema cromatográfico	Impurezas		% PRq
	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	% $^{99m}\text{TcO}_2$	
Acetona:acetato de amônio 60:40 e TLC-SG Fase reversa	1,56±0,49	9,51±0,24	88,93±0,37
Acetona:acetato de amônio 80:20 e TLC-SG Fase reversa	4,44±0,22	1,44±0,16	94,12±0,19

Em ambos casos, a % PRq ficou comprometida pela separação inadequada entre uma das impurezas e o produto (**FIG. 6 e 7**). Em acetona:acetato de amônio 60:40, a % PRq foi menor que 90% e a % $^{99m}\text{TcO}_2$ foi acima de 9%, enquanto que em acetona:acetato de amônio 80:20 ocorreu aumento da % PRq e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Considerando-se que houve separação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ em TLC-SG fase reversa/acetona:acetato de amônio na proporção 80:20 e separação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na proporção 60:40, pode-se avaliar a % PRq de ECD- ^{99m}Tc utilizando-se ambos os sistemas, conforme **TAB. 28**.

TABELA 28: % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FA - Parte 2.

Sistema cromatográfico	Impurezas		% PRq
	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	% $^{99m}\text{TcO}_2$	
Acetona:acetato de amônio 60:40 e TLC-SG Fase reversa	1,56±0,49	—	97,0 ± 0,32
Acetona:acetato de amônio 80:20 e TLC-SG Fase reversa	—	1,44±0,16	

Na FA (parte 1) e FE, recomenda-se o uso de TLC-SG (2,5 cm de largura x 7,5 cm de comprimento) e acetato de etila (**TAB. 26**), com a aplicação da amostra a 2 cm da base e desenvolvimento cromatográfico por 5 cm. As análises também foram realizadas em suporte com dimensão de 2,5 cm de largura x 12,5 cm de comprimento, aplicando-se a amostra a 1,5 cm da base, com a finalidade de verificar possível melhora na separação dos componentes da amostra e/ou diferença nos resultados de % PRq. Entretanto, ao avaliar os resultados de % PRq obtidos não houve diferença significativa (coeficiente de variação menor que 5%), mas foi possível observar melhor a contagem radioativa nos diferentes segmentos do suporte em dimensão maior. Foram avaliados outros suportes e solventes cromatográficos a fim de buscar alternativas ao ITLC-SG utilizado pelo método IPEN. Em cada um destes sistemas foram determinados os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ (**TAB. 29**).

TABELA 29 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ nos sistemas cromatográficos.

		R _f nos suportes cromatográficos							
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM	W17M	W31ET
Acetato de etila	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0 <small>FA e FE</small>	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0-0,1 <small>FA e FE</small>	0	0-0,1	0	0	0	0
	$\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	0,8-1	0,7-0,8	0,9-1	--	0,9-1	0,9-1	0,9-1
Ac. etila : etanol (30:70)	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,5-0,7	0,8-0,9	0,1-0,3	0-0,3	0-0,5	0,8-0,9	0,7-0,9
	$\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$	--	--	0,8-0,9	0,9-1	--	--	0,8-1	--
Etanol	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	--	--	0-0,1	--	0-0,3	0-0,4	0-0,4
	$\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$	--	--	--	0,9-1	--	0,7-0,8	0,9-1	0,9-1
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 <small>IPEN</small>	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	0,8-1	1	0,8-1	0,7-0,9	0,7-0,9	0,9-1	0,9-1
	$\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	0,7-1	--	--	0,9-1	0,8-1	--	--
NaCl 20%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	--	0,9-1 <small>IPEN</small>	--	--	--	--	--	--
	$\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$	0	0	0	0	0	0	0	0

O R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ foi igual a zero em todos os solventes e suportes.

Em acetato de etila, independente do suporte cromatográfico utilizado, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram próximos a zero e os R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ apresentaram-se nos últimos segmentos dos suportes.

Nos suportes cromatográficos de celulose (HPTLC-cel, W1MM, W3MM) com acetato de etila:etanol (30:70), os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram entre 0-0,5. Em W17M e W31ET ocorreu retenção nos primeiros segmentos e arraste ao longo do suporte, sendo registrados na **TAB 09 e 29** apenas os segmentos de maior contagem (R_f a partir de 0,7). O comportamento de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variou quando a base do suporte foi de sílica-gel (TLC-SG e HPTLC-SG) em acetato de etila:etanol (30:70), sendo que os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram entre 0,5 - 0,7 e 0,8 - 0,9, respectivamente.

Ao utilizar etanol como fase móvel, os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram semelhantes ao encontrado em acetato de etila:etanol (30:70) com HPTLC-cel e W3MM.

Em acetona, o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ficou entre 0,7-0,9 em W1MM e W3MM, e nos demais suportes, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ localizou-se nos últimos segmentos ($R_f = 0,8-1$).

O R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ em acetato de etila:etanol (30:70) foi avaliado somente nos suportes HPTLC-SG, HPTLC-cel e W17M, ficando entre 0,8 a 1. O R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ com o uso de etanol apresentou-se próximo a 1, exceto quando utilizou-se W3MM em que o R_f ficou entre 0,7-0,8. Em acetona, os R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ nos suportes ITLC-SG, TLC-SG, W1MM e W3MM com acetona, variaram entre 0,7-1. Somente em NaCl 20%, o R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual a zero em todos os suportes.

A determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$ pode ser realizada através dos sistemas HPTLC-SG/acetato de etila: etanol (30:70) e aqueles em que se utilizou acetona, pois o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram próximos ao R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$.

A % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser determinada apenas através do sistema TLC-SG/NaCl 20%, pois o R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ foi o mesmo que $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$. Nos demais sistemas, ambas as impurezas ($^{99m}\text{TcO}_2 + ^{99m}\text{TcO}_4^-$) podem ser determinadas juntas, considerando-se que os destes R_f foram próximos, porém distintos do R_f de $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc no sistema descrito na FE e FA - Parte 1 (TLC-SG com acetato de etila), alterando-se o comprimento do suporte de 2,5 x 7,5 cm para 2,5 x 12,5 cm estão apresentados na **TAB. 30**.

TABELA 30 - % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc pelo sistema da FE e FA - Parte 1.

Sistema Cromatográfico	Impurezas (% $^{99m}\text{TcO}_4^-$ + % $^{99m}\text{TcO}_2$)	% PRq
Acetato de etila e TLC-SG (2,5x7,5 cm)	24,93±1,15	75,07±1,15
Acetato de etila e TLC-SG (2,5x12,5 cm)	25,04±1,12	74,96±1,12

Mesmo alterando o comprimento da fita de 7,5 cm para 12,5 cm, não ocorreu separação entre ECD- ^{99m}Tc e as impurezas, resultando em % PRq de 75%. Outros suportes cromatográficos foram investigados (**TAB. 31**).

TABELA 31- % $^{99m}\text{TcO}_2$ + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em diferentes suportes cromatográficos.

Solvente	Suportes cromatográficos			
	ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel
Acetato de etila	10,19±0,58	24,93±1,15 ^{FA e FE}	34,80±0,35	19,37±0,07
	W1MM	W3MM	W17MM	W31ET
	12,90±0,34	15,68±0,01	14,24±1,63	12,78±0,07

Os suportes cromatográficos não permitiram melhor separação entre ECD- ^{99m}Tc e as impurezas, resultando em % $^{99m}\text{TcO}_2$ + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ maior que 10%. Os resultados (% $^{99m}\text{TcO}_2$ + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$) foram menores nos suportes a base de celulose (variação entre 10,19% e 19,37%) quando comparados àqueles obtidos com os suportes com base de sílica gel (variação entre 24,93% e 34,80%), sugerindo que o acetato de etila possui maior força de arraste do produto marcado nos suportes a base de celulose. Estes resultados foram discordantes daqueles obtidos utilizando-se o sistema descrito na FA - Parte 2, cujos resultados foram apresentados na **TAB. 28**.

Na metodologia IPEN, $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ são determinados separadamente utilizando-se 2 sistemas cromatográficos, ITLC-SG com acetona e TLC-SG com NaCl 0,9%, respectivamente (**TAB. 8 e 26**). Entretanto, devido à interrupção da produção das fitas ITLC-SG, foi necessário buscar alternativas para se determinar % $^{99m}\text{TcO}_2$ (**TAB. 32**). Misturas de acetato de etila com butanol, etanol, isopropanol e metanol com HPTLC-SG, W17M, W31ET e W3MM não puderam ser utilizados para a determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ devido problemas de arraste de produto marcado, causando separação inadequada. Apenas com o sistema HPTLC-cel em acetato de etila:etanol 30:70, foi obtida a separação entre $^{99m}\text{TcO}_2$ em $R_f = 0$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ECD- ^{99m}Tc em $R_f = 0,8 - 0,9$. Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ estão apresentados na **TAB. 32**.

As % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, determinadas em 30 e 240 minutos após marcação em sistema de TLC-SG e NaCl 20% foram $0,04 \pm 0,02\%$ e $0,03 \pm 0,01\%$, respectivamente e foram utilizadas no cálculo de % PRq de ECD- ^{99m}Tc (**TAB. 32**).

TABELA 32 - % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de ECD- ^{99m}Tc .

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistemas	% PRq*
30	$2,49 \pm 0,58$	ITLC-SG (acetona) ^{IPEN}	$97,47 \pm 0,33$
240	$3,29 \pm 0,69$		$96,68 \pm 0,35$
30	$4,78 \pm 1,65$	W1MM (acetona)	$95,18 \pm 0,84$
240	$4,73 \pm 0,95$		$95,24 \pm 0,48$
30	$3,17 \pm 0,17$	W3MM (acetona)	$96,70 \pm 0,10$
240	$3,76 \pm 0,43$		$96,21 \pm 0,22$
30	$1,51 \pm 0,12$	HPTLC-celulose (acetato de etila:etanol 30:70)	$98,85 \pm 0,07$
240	$1,60 \pm 0,04$		$98,40 \pm 0,03$

* Considerando-se que % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (30min) = 0,04 e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (240min) = 0,03

O sistema HPTLC-celulose/acetato de etila: etanol (30:70) apresentou menor tempo de análise (diferença de 10 minutos). As % PRq resultantes da utilização do sistema IPEN (ITLC-SG/acetona) e sistemas alternativos para a determinação de $^{99m}\text{TcO}_2$ foram acima de 95%. O coeficiente de variação entre os métodos foi de 4,58% em 30 minutos de marcação (**TAB. 32**).

5.6 Comparação das metodologias para controle radioquímico de GHA-^{99m}Tc

Os sistemas cromatográficos do IPEN para a determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em GHA-^{99m}Tc estão apresentados na **TAB. 33**. As FE e FA não possuem método de controle radioquímico para este RL (**TAB. 8 e 33**).

TABELA 33 - Sistemas cromatográficos (IPEN) para determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em GHA-^{99m}Tc.

Sistemas Cromatográficos	
Impureza	IPEN
^{99m} TcO ₂	ITLC-SG e NaCl 0,9%
^{99m} TcO ₄ ⁻	ITLC-SG e acetona

No método IPEN, as determinações de % ^{99m}TcO₄⁻ e % ^{99m}TcO₂ são realizadas utilizando-se ITLC-SG em acetona e NaCl 0,9%, respectivamente. Foram avaliados alguns suportes visando buscar alternativas ao uso de ITLC-SG, e em todos estes sistemas foram determinados os R_f de ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e GHA-^{99m}Tc (**TAB. 34**).

TABELA 34- R_f de ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e GHA-^{99m}Tc nos sistemas cromatográficos.

		R _f nos suportes cromatográficos				
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W3MM
Acetona	^{99m} TcO ₂	0	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	1 IPEN	0,8-1	1	0,8-1	0,7-0,9
	GHA- ^{99m} Tc	0	0	0	0	0
NaCl 0,9%	^{99m} TcO ₂	0 IPEN	0	0	0	0
	^{99m} TcO ₄ ⁻	*	0,9-1	0,9-1	0,9-1	0,7-0,9
	GHA- ^{99m} Tc	0,9-1	0,7-1	0,9-1	1	1

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

O $^{99m}\text{TcO}_2$ permaneceu na origem ($R_f = 0$) em todos os suportes e solventes.

Em acetona, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sofreu arraste na porção final do suporte em W3MM ($R_f = 0,7 - 0,9$), nos demais suportes o R_f ficou entre 0,8-1. Em NaCl 0,9%, o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ficou próximo de 1, entretanto quando se utilizou W3MM, houve arraste a partir de R_f 0,7 (**TAB. 34**).

O R_f de $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual a zero em todos os suportes quando utilizou-se acetona. Em NaCl, os R_f de $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ ficaram entre 0,9-1 em todos os suportes, exceto em TLC-SG, sendo o valor de R_f de $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ variável entre 0,7 a 1.

O tempo de corrida com TLC-SG (17,5 cm de comprimento) em NaCl 0,9% foi de 55 minutos e com HPTLC-celulose (9,5 cm de comprimento) foi de 10 minutos.

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ pode ser determinada através dos sistemas em que se utilizou NaCl 0,9% como fase móvel, considerando-se que o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ foram próximos, enquanto a % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi determinada nos sistemas em que se utilizou acetona, pois o R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ foram iguais a zero.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos sistemas cromatográficos estão apresentados na **TAB. 35**.

TABELA 35 - % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de $\text{GHA-}^{99m}\text{Tc}$ em diferentes suportes cromatográficos.

		% Impureza nos suportes cromatográficos				
% Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-celulose	W1MM
$^{99m}\text{TcO}_2$	NaCl 0,9%	0,03±0,01 ^{IPEN}	0,31±0,05	0,39±0,04	0,59±0,05	2,80±0,32
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Acetona	0,05±0,01 ^{IPEN}	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01

Os suportes cromatográficos não influenciaram na determinação de % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com acetona.

O menor resultado de % $^{99m}\text{TcO}_2$ foi obtido com o uso de ITLC-SG (0,03%), e o maior valor com a utilização de W1MM (2,80%). Em TLC-SG, HPTLC-SG e HPTLC-cel, as % $^{99m}\text{TcO}_2$ apresentaram resultados entre 0,31 e 0,59%.

Na **TAB. 36** estão relacionados os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de GHA- ^{99m}Tc em até 240 minutos.

TABELA 36 - % $^{99m}\text{TcO}_2$, % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de GHA- ^{99m}Tc .

Suportes	Tempo	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	% $^{99m}\text{TcO}_2$	% PRq
ITLC-SG ^{IPEN}	30	0,03±0,01	0,05±0,01	99,92 ± 0,01
	240	0,10±0,01	0,16±0,01	99,74 ± 0,01
HPTLC-SG	30	0,03±0,01	0,39±0,04	99,58 ± 0,03
	240	0,06± 0,02	1,98± 0,50	97,96 ± 0,26
HPTLC-cel	30	0,04±0,01	0,59±0,05	99,37 ± 0,03
	240	0,04± 0,01	0,70± 0,06	99,25 ± 0,04

Os resultados de % PRq foram acima de 97%, com coeficiente de variação de 2,05%, com 240 minutos de marcação.

5.7 Comparação das metodologias para controle radioquímico de MIBI- ^{99m}Tc

Os métodos para controle radioquímico, por cromatografia planar do MIBI- ^{99m}Tc descritos na FA, FE e IPEN estão relacionados na **TAB. 37**.

TABELA 37 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em MIBI- ^{99m}Tc .

Sistemas Cromatográficos			
Impureza	FA	FE	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	TLC-SG fase reversa e acetonitrila: metanol:	TLC-SG fase reversa e acetonitrila: metanol: ac.	ITLC-SG e acetato de etila:metanol (80:20)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	ac. amônio 0,5 mol L ⁻¹ : THF (4:3:2:1)	amônio 0,5 mol L ⁻¹ : THF (4:3:2:1)	—

FA e FE recomendam o sistema TLC-SG fase reversa com fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila: metanol: acetato de amônio: THF (4:3:2:1) para a determinação da % PRq de MIBI- ^{99m}Tc ($R_f = 0,3-0,6$), % $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0-0,1$) e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 0,8-1$). A dimensão recomendada para o suporte TLC-SG fase reversa recomendada é de 2,5 cm x 7,75 cm, e a amostra deve ser aplicada a 1 cm da base do suporte e corrida por 6 cm. Foram realizados estudos a fim de verificar a influência do comprimento do suporte na % PRq (**TAB. 38**). Além do sistema apresentado na **TAB. 37**, ambas as farmacopeias recomendam método por CLAE, entretanto neste estudo foram abordados somente métodos por cromatografia planar.

A metodologia do IPEN utiliza ITLC-SG e acetato de etila:metanol (80:20) para determinação da % $^{99m}\text{TcO}_2$.

Os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MIBI- ^{99m}Tc pelos métodos das FA e FE estão relacionados na **TAB. 38**. Também estão apresentados na **TAB. 38** os resultados obtidos alterando-se o comprimento do suporte de 7,75 cm para 12,5 cm.

TABELA 38 - Influência do comprimento do suporte na % PRq (método FA e FE) de MIBI- ^{99m}Tc em 240 minutos de marcação.

Sistema Cromatográfico	% $^{99m}\text{TcO}_2$	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	% PRq
Acetonitrila: metanol: ac. amônio: THF (4:3:2:1) e TLC-fase reversa (2,5x7,75 cm) FA e FE	0,65±0,07	1,66±0,01	97,69±0,04
Acetonitrila: metanol: ac. amônio: THF (4:3:2:1) e TLC-fase reversa (2,5x12,5 cm)	0,53±0,06	1,49±0,07	97,98±0,07

Verificou-se que o comprimento do suporte não influenciou na separação das impurezas e do produto na determinação de % PRq no sistema recomendado pelas FA e FE, e o coeficiente de variação foi menor que 0,5 %. (**TAB. 38**).

Na **TAB. 39** estão relacionados os resultados de R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e MIBI- ^{99m}Tc nos diferentes sistemas cromatográficos.

TABELA 39 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$ em diferentes suportes cromatográficos.

		R _f nos suportes cromatográficos			
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	W1MM	W3MM
Acetato de etila:metanol (80:20)	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 IPEN	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,8-1	0,5-0,7	0-0,3	0-0,4
	$\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	-	0,8-1	0,9-1
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,9-1	0,9-1	0,7-0,9
	$\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$	*	0	-	-

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Em acetato de etila:metanol (80:20), o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi dependente do suporte cromatográfico. Em papel, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ permaneceu na origem; em TLC-SG moveu-se para o meio do suporte e em ITLC-SG deslocou-se com o solvente ($R_f = 0,9 - 1$).

Em acetato de etila:metanol (80:20) e ITLC-SG (método IPEN – **TAB. 37**) foi possível determinar % $^{99m}\text{TcO}_2$, pois $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$ possuem o mesmo R_f . Em W1MM ou W3MM foi possível determinar a % total de impurezas (% $^{99m}\text{TcO}_2$ + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$), uma vez que as impurezas ficaram retidas nos primeiros segmentos do suporte e o $\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$ apresentou R_f de 0,8 a 1. Observou-se que 20% de metanol em acetato de etila não foi suficiente para carregar $^{99m}\text{TcO}_4^-$ até o final dos suportes TLC-SG, W1MM e W3MM, o que também foi observado estudos com $\text{ECD-}^{99m}\text{Tc}$ mesmo aumentando a porcentagem de álcool para a mistura acetato de etila:etanol (30:70) (**TAB. 29**).

A % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser determinada em $R_f = 1$ pelo sistema TLC-SG/NaCl 0,9% considerando-se que os R_f de $\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ foram iguais a zero (**TAB. 39**). Na **TAB. 40** estão apresentadas as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em $\text{MIBI-}^{99m}\text{Tc}$.

TABELA 40 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em MIBI- ^{99m}Tc .

Solvente	Impureza(s)	% Impurezas nos Suportes cromatográficos			
		ITLC-SG	TLC-SG	W1MM	W3MM
Acetato de etila:metanol (8:2)	$^{99m}\text{TcO}_2 + ^{99m}\text{TcO}_4^-$	-	-	1,13± 0,06	1,01±0,12
Acetato de etila:metanol (8:2)	$^{99m}\text{TcO}_2$	1,31±0,10 IPEN	-	-	-
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	-	0,43±0,02	-	-

$^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ podem ser determinados separadamente pelos métodos de FA, FE e IPEN. Entretanto, na falta do suporte ITLC-SG, o suporte pode ser substituído pelo uso dos papéis cromatográficos W1MM ou W3MM com acetato de etila na determinação de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, e o sistema TLC-SG com NaCl 0,9% para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Desta forma $^{99m}\text{TcO}_2$ foi obtido por cálculo de diferença (**TAB. 40 e 41**).

Na **TAB. 41** estão relacionados os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MIBI- ^{99m}Tc .

TABELA 41- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MIBI- ^{99m}Tc .

Tempo (min)	$\%^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	$\%^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	$\%^{99m}\text{TcO}_2$	%PRq
	+ $\%^{99m}\text{TcO}_2$		(por cálculo de diferença)			
30	1,01±0,12	W3MM e acetato de etila:metanol (8:2)	0,43±0,02	TLC-SG e NaCl 0,9%	0,58± 0,07	98,99 ± 0,12
240	1,32±0,09		0,55±0,06		0,77± 0,07	98,68 ± 0,09

A % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtida no sistema FA ou FE (1,66%) (**TAB. 38**) foi superior à obtida no sistema TLC-SG/NaCl 0,9% (0,55%) (**TAB. 41**). A % $^{99m}\text{TcO}_2$ pelo método FA ou FE foi igual a 0,65% (**TAB. 38**) e a obtida através de cálculo por diferença utilizando-se dois sistemas, a saber: W3MM/acetato de etila:metanol (80:20) e TLC-SG/NaCl 0,9%, foi igual a 0,77% (**TAB. 41**). As % PRq obtidas através do método de FA ou FE (**TAB. 38**) e a apresentada na **TAB. 41** foram

acima de 97% e o coeficiente de variação igual a 1,12% em 240 minutos de marcação.

5.8 Comparação das metodologias para controle radioquímico de MDP-^{99m}Tc

Os métodos para controle radioquímico, por cromatografia planar do MDP-^{99m}Tc descritos na FA, FE e IPEN estão relacionados na **TAB. 42**.

TABELA 42 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em MDP-^{99m}Tc.

Impureza	Sistemas Cromatográficos		
	FA	FE	IPEN
^{99m} TcO ₂	Papel cromatográfico e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	W3MM e NaCl 0,9%
^{99m} TcO ₄ ⁻	Papel cromatográfico e Metanol 85%	ITLC-SG e MEC	W3MM e acetona

A metodologia para controle radioquímico de MDP-^{99m}Tc descrita na FE recomenda o uso do suporte de ITLC-SG para a determinação das % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻, com os solventes acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ e MEC, respectivamente. A FA recomenda o uso de papel cromatográfico para a determinação da % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻, com os solventes NaCl 0,9% e metanol 85%, respectivamente. O IPEN faz uso de W3MM com NaCl 0,9% para a determinação da % ^{99m}TcO₂ e W3MM com acetona para % ^{99m}TcO₄⁻ (**TAB. 8 e 42**).

Na **TAB. 43** estão relacionados os resultados de R_f de ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e MDP-^{99m}Tc nos diferentes sistemas cromatográficos.

TABELA 43 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$ em diferentes suportes cromatográficos.

Solvente		R _f nos suportes cromatográficos	
		ITLC-SG	W3MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	0,7-0,9 ^{IPEN}
	$\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$	0	0
MEC	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,8-1 ^{FE}	0,9-1
	$\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$	0	0
Metanol 85%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,4-0,7 ^{FA}
	$\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$	*	0
Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{FE}	--
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1	--
	$\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$	0,9-1	--
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0 ^{FA e IPEN}
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,7-0,9
	$\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$	*	1

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Os R_f de $\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$ em acetona, MEC ou metanol foram iguais a zero, enquanto que com o uso de acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ ou NaCl 0,9%, $\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$ foi carregado para o final do suporte (R_f entre 0,9 – 1).

Foi possível determinar % $^{99m}\text{TcO}_2$ nos sistemas em que foram utilizados os solventes acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ e NaCl 0,9%, pois os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$ foram próximos. A determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode ser realizada através dos sistemas em que utilizou-se acetona, MEC ou metanol, considerando-se que os R_f de $\text{MDP-}^{99m}\text{Tc}$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ foram iguais a zero e R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ próximo de 1; apenas no sistema de metanol 85% e W3MM, o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ficou entre 0,4-0,7.

Na **TAB. 44** estão apresentados os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos sistemas estudados.

TABELA 44 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ em MDP- ^{99m}Tc .

% Impureza nos Suportes cromatográficos			
% Impureza	Solvente	ITLC-SG	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Acetona	--	0,25±0,06 ^{IPEN}
	MEC	0,41±0,07 ^{FE}	0,12±0,01
	Metanol 85%	--	0,37±0,12 ^{FA}
$^{99m}\text{TcO}_2$	Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	0,23±0,16 ^{FE}	--
	NaCl 0,9%	--	0,92±0,15 ^{FA e IPEN}

Utilizando-se W3MM e metanol 85% (FA) ou acetona (IPEN), as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram iguais a 0,37 e 0,25%, respectivamente. A substituição do suporte ITLC-SG (FE) por W3MM para determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (em MEC), resultou em 0,12% de diferença.

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ obtida em acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ e ITLC-SG (FE) foi de 0,23%, e com o uso do sistema NaCl 0,9 % e W3MM (FA e IPEN) foi de 0,92%. Na **TAB. 45** estão relacionados os resultados de % PRq de MDP- ^{99m}Tc até 240 minutos de marcação.

TABELA 45 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de MDP- ^{99m}Tc .

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistema	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Sistema	%PRq
30	0,92±0,15	W3MM e NaCl 0,9% ^{FA} e ^{IPEN}	0,37±0,12	W3MM e Metanol	98,71 ± 0,13
240	1,06±0,10		0,58±0,11	85% ^{FA}	98,36 ± 0,10
			0,25±0,06	W3MM e acetona	98,83 ± 0,10
			0,43±0,09	^{IPEN}	98,51 ± 0,10
30	0,23±0,16	ITLC-SG e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹ ^{FE}	0,41±0,07	ITLC-SG e MEC ^{FE}	99,36 ± 0,14
240	0,32±0,13		0,52±0,06		98,16 ± 0,09

Os resultados de % PRq foram acima de 98% e o coeficiente de variação entre os resultados de % PRq obtidas através dos métodos FA, FE e IPEN foi de 0,92% em 30 minutos de marcação (**TAB. 45**).

5.9 Comparação das metodologias para controle radioquímico de PIRO-^{99m}Tc

Os métodos para controle radioquímico, por cromatografia planar de PIRO-^{99m}Tc descritos na FA, FE e IPEN estão relacionados na **TAB. 46**.

TABELA 46 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em PIRO-^{99m}Tc.

Impureza	Sistemas Cromatográficos		
	FA	FE	IPEN
^{99m} TcO ₂	ITLC-SG e NaCl 0,9%	ITLC-SG e acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	ITLC-SG e NaCl 0,9%
^{99m} TcO ₄ ⁻	ITLC-SG e acetona	ITLC-SG e acetona	W1MM e acetona

FA, FE e IPEN recomendam o uso de ITLC-SG para a determinação da % ^{99m}TcO₂, sendo NaCl 0,9% o solvente utilizado na FA e no IPEN, e acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ o solvente da FE (**TAB. 8 e 46**). Na determinação de % ^{99m}TcO₄⁻, FA e FE indicam ITLC-SG com acetona, e IPEN W1MM e acetona.

Os resultados dos R_f de ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e PIRO-^{99m}Tc obtidos nos diferentes suportes estão apresentados na **TAB. 47**.

TABELA 47 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$ em diferentes suportes cromatográficos.

		R_f nos suportes cromatográficos				
Solvente		ITLC-SG	TLC-cel	HPTLC-cel	W31ET	W1MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0-0,1	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1 ^{FA e FE}	1	0,8-1	0,9-1	0,7-0,9 ^{IPEN}
	$\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$	*	--	--	--	0
Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{FE}	0	0	0	--
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,6-0,7	0,8-0,9	0,8-0,9	--
	$\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$	*	1	1	--	--
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0 ^{FA e IPEN}	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,6-0,8	0,9-1	0,8-1	0,7-0,8
	$\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$	0,7-1	0,9-1	1	0,9-1	-

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Somente no sistema W1MM/acetona foi possível determinar % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, uma vez que o R_f de $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$ foi igual ao R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$).

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ pode ser determinada em $R_f = 0$ com HPTLC-cel em acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ ou NaCl 0,9%. Apesar dos R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$ ficarem localizados no final do suporte ($R_f = 0,6 - 1$), em TLC-SG, W31ET e W1MM observou-se arraste de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (**TAB. 47**).

Não foram determinadas a % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pelo sistema ITLC-SG/acetona (FA e FE) e a % $^{99m}\text{TcO}_2$ em ITLC-SG/acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ (FE) devido a indisponibilidade do suporte ITLC-SG nesta fase do trabalho. A utilização dos suportes ITLC-SG ainda disponíveis foram destinados à realização das análises de rotina (ITLC-SG e NaCl 0,9%). Para substituir o uso de ITLC-SG no sistema IPEN (% $^{99m}\text{TcO}_2$) foram avaliados outros suportes (**TAB. 48**).

Na **TAB. 48** estão apresentados os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos diferentes sistemas cromatográficos.

TABELA 48 - % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$.

% Impureza nos Suportes cromatográficos						
% Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-celulose	HPTLC-Celulose	W31ET	W1MM
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Acetona	* FA e FE	--	--	--	0,34±0,02 IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹	* FE	1,18±0,11	0,51±0,11	--	--
	NaCl 0,9%	1,06±0,02 FA e IPEN	1,94±0,27	0,82±0,24	3,24±0,28	--

* Indisponibilidade dos suportes ITLC-SG

A % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtida com o sistema W1MM/acetona foi igual a 0,34%.

A % $^{99m}\text{TcO}_2$ determinada com ITLC-SG e NaCl 0,9% (FA e IPEN) foi igual a 1,06%. Em NaCl 0,9% com TLC-cel e HPTLC-cel, as % $^{99m}\text{TcO}_2$ foram iguais a 1,94 e 0,82%, respectivamente; nestes mesmos suportes em acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ foram de 1,18 e 0,51%, respectivamente. Dentre os suportes a base de celulose, apenas o sistema W31ET/NaCl 0,9% não foi eficiente na separação entre $^{99m}\text{TcO}_2$ e $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$, resultando em % $^{99m}\text{TcO}_2$ igual a 3,24%. A melhor separação entre $^{99m}\text{TcO}_2$ e $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$ foi observada em HPTLC-cel/acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ (0,51%).

Considerando-se que as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em 30 e 240 minutos após marcação, obtidas através do sistema do IPEN (W1MM/acetona) foram iguais a 0,34 ± 0,02 e 0,37 ± 0,13%, respectivamente, foram calculadas as % PRq de $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$ (TAB. 49).

TABELA 49 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % PRq de $\text{PIRO-}^{99m}\text{Tc}$.

Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_2$	Sistemas	% PRq*
30	0,51±0,11	HPTLC-celulose (Acetato de sódio 1,66 mol L ⁻¹)	99,15 ± 0,07
240	0,68± 0,12		98,95± 0,13
30	0,82±0,24	HPTLC-celulose (NaCl 0,9%)	98,84±0,13
240	0,96±0,69		98,67±0,41
30	1,06±0,02	ITLC-SG (NaCl 0,9%) FA e IPEN	98,60±0,02
240	1,08±0,13		98,55±0,13

* $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (30min) = 0,34% e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (240min) = 0,37%

O suporte HPTLC-celulose apresentou perfil de separação semelhante ao ITLC-SG, seja em solvente de acetato de sódio 1,66 mol L⁻¹ ou NaCl 0,9%. As % PRq foram acima de 98% e o coeficiente de variação foi menor que 0,7%, em 30 minutos após a marcação.

5.10 Comparação das metodologias para controle radioquímico de SAH-^{99m}Tc

Os métodos para controle radioquímico, por cromatografia planar do SAH-^{99m}Tc descritos na FA, FE e IPEN estão relacionados na **TAB. 50**.

TABELA 50 - Sistemas cromatográficos (FA, FE e IPEN) para determinação de % ^{99m}TcO₂ e % ^{99m}TcO₄⁻ em SAH-^{99m}Tc.

Impureza	Sistemas Cromatográficos		
	FA	FE	IPEN
^{99m} TcO ₂	--	--	--
^{99m} TcO ₄ ⁻	ITLC-SG e acetona	ITLC-SG e MEC	ITLC-SG e Metanol 85%

A FA, FE e IPEN recomendam o uso de ITLC-SG e os solventes acetona, MEC e metanol 85%, respectivamente, para determinação da % ^{99m}TcO₄⁻ e não apresentam metodologia para a determinação de % ^{99m}TcO₂. Devido à escassez do suporte ITLC-SG nesta fase do trabalho, foram realizadas somente as análises descritas pelo método IPEN por serem análises de rotina da DIRF. Outros suportes foram avaliados com o objetivo de buscar alternativas ao uso do ITLC-SG para a determinação de ^{99m}TcO₄⁻. Os resultados de R_f de ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e SAH-^{99m}Tc estão apresentados na **TAB. 51**.

TABELA 51 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$ em diferentes suportes cromatográficos.

		R_f nos suportes cromatográficos			
Solvente		ITLC-SG	TLC-SG	W1MM	W3MM
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1 ^{FA}	0,8-1	0,7-0,9	0,7-0,9
	$\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$	0	--	0	0
MEC	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	* ^{FE}	0,9-1	0,8-0,9	0,9-1
	$\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$	0	--	-	-
Metanol 85%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	*	0,7-0,9 ^{IPEN}	0,4-0,6	0,4-0,7
	$\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$	*	0	-	-

* Indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Ocorreu arraste de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ao longo do suporte resultando em R_f entre 0,4 – 0,7 com o uso de W1MM ou W3MM em metanol 85%. Nos demais sistemas, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migrou com o solvente, e o R_f ficou entre 0,7-1.

$^{99m}\text{TcO}_2$ e $\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$ permaneceram na origem em $R_f = 0$ e por isso o controle radioquímico foi utilizado apenas para a determinação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Os resultados da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtidos nos diferentes suportes cromatográficos estão relacionados na **TAB. 52**.

TABELA 52 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em $\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$.

		% Impureza nos Suportes cromatográficos			
% Impureza	Solvente	ITLC-SG	TLC-SG	W1MM	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Metanol 85%	1,42±0,39 ^{IPEN}	--	0,07±0,01	0,10±0,03
	MEC	* ^{FE}	1,56±0,21	--	--
	Acetona	* ^{FA}	1,70±0,45	--	0,15±0,05

* Indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Uma vez que os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em W1MM e W3MM foram entre 0,4-0,7 (**TAB. 51**) e os tempos de corrida foram superiores a uma hora e meia, considerou-se que o sistema de TLC-SG com acetona ou MEC foram os mais adequados para substituir as fitas de ITLC-SG, além da acetona e MEC serem solventes recomendados pelos compêndios oficiais. As % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq em $\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$ estão apresentados na **TAB. 53**.

TABELA 53 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de $\text{SAH-}^{99m}\text{Tc}$.

Suporte	Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	%PRq
ITLC-SG/metanol	30	1,42± 0,39	98,58±0,39
85% IPEN	240	1,30± 0,29	98,70±0,29
TLC-SG/Acetona	30	1,70± 0,45	98,30±0,45
	240	1,49± 0,39	98,54±0,39
TLC-SG/MEC	30	1,56± 0,21	98,44±0,21
	240	1,31± 0,27	98,27±0,27

Não houve diferença significativa entre os sistemas TLC-SG/acetona ou MEC e o método IPEN (ITLC-SG/metanol 85%), pois o coeficiente de variação foi menor que 1% em até 240 minutos após a marcação. Os valores de % PRq foram acima de 98%.

5.11 Comparação das metodologias para controle radioquímico de Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc

Os métodos para controle radioquímico, por cromatografia planar do Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc descritos na FE e IPEN estão relacionados na **TAB. 54**.

TABELA 54 - Sistemas cromatográficos (FE e IPEN) para determinação de % $^{99m}\text{TcO}_2$ e % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .

Impureza	Sistemas Cromatográficos	
	FE	IPEN
$^{99m}\text{TcO}_2$	--	--
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	ITLC-SG e NaCl 0,9%	W3MM e acetona

A FA não possui metodologia descrita para a determinação da % PRq por cromatografia planar.

FE e IPEN possuem sistemas apenas para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, recomendando o uso de ITLC-SG com NaCl 0,9% e W3MM e acetona, respectivamente.

Foram avaliados outros suportes cromatográficos, a fim de buscar alternativas ao ITLC-SG (método da FE) e verificar a influência do suporte na determinação da % PRq em Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .

Os R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc estão apresentados na **TAB. 55**.

TABELA 55 - R_f de $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc em diferentes suportes cromatográficos.

Solvente		R_f nos suportes cromatográficos					
		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1 ^{FE}	0,9-1	0,9-1	0,9-1	0,7-0,8	0,7-0,9
	SnCOLOIDAL- ^{99m}Tc	0	0	0	0	0	0
Acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$	0	0	0	0	0	0
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1	0,8-1	1	0,8-1	0,7-0,9	0,7-0,9 ^{IPEN}
	SnCOLOIDAL- ^{99m}Tc	*	0	0	0	0	0

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Os sistemas foram utilizados para a determinação da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$, pois $^{99m}\text{TcO}_2$ e Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc permaneceram na origem do suporte ($R_f = 0$).

Os R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em NaCl 0,9% ou acetona com o uso de W1MM ou W3MM variaram entre 0,7-0,9, indicando arraste. Nos demais suportes o R_f de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variou de 0,8 a 1. As % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtidas nos sistemas cromatográficos estão relacionados na **TAB. 56**.

TABELA 56 - % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc .

% Impureza	Solvente	% Impureza nos Suportes cromatográficos					
		ITLC-SG	TLC-SG	HPTLC-SG	HPTLC-cel	W1MM	W3MM
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	NaCl 0,9%	1,59±0,06 ^{FE}	0,26±0,04	0,77±0,05	0,63±0,05	0,52±0,03	0,68±0,04
	Acetona	*	0,80±0,09	0,80±0,07	1,18±0,11	0,94±0,03	1,16±0,03 ^{IPEN}

* indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

No sistema ITLC-SG e NaCl 0,9% (FE) a % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi igual a 1,59%. No mesmo solvente, as % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram de 0,26% a 0,77%, dependendo do suporte utilizado.

Em acetona, os resultados de % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ variaram de 0,80% a 1,18% e foram superiores aos determinados em NaCl 0,9%.

Em ambos solventes, os tempos de análise foram menores quando se utilizaram os suportes HPTLC-SG ou HPTLC-cel.

Os valores da % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de Sn COLOIDAL- ^{99m}Tc obtidos nos sistemas FE, IPEN e aqueles em que foram utilizados HPTLC-SG e HPTLC-cel, com 30 e 240 minutos após a marcação, estão apresentados na **TAB. 57**.

TABELA 57- % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % PRq de SnCOLOIDAL- ^{99m}Tc .

Suporte	Tempo (min)	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	%PRq
ITLC/NaCl 0,9% ^{FE}	30	1,59±0,06	98,41± 0,06
	240	1,68± 0,10	98,32± 0,10
W3MM/acetona ^{IPEN}	30	1,16±0,03	98,84± 0,03
	240	1,23± 0,09	98,77± 0,09
HPTLC-SG/NaCl 0,9%	30	0,77±0,05	99,23± 0,05
	240	0,98± 0,07	99,02± 0,07
HPTLC-cel/NaCl 0,9%	30	0,63±0,05	99,37± 0,05
	240	0,88± 0,06	99,62± 0,06
HPTLC-SG/acetona	30	0,80±0,07	99,20± 0,07
	240	1,02± 0,10	98,98± 0,10
HPTLC-cel/acetona	30	1,18±0,11	98,82± 0,11
	240	1,34± 0,07	98,66± 0,07

Os resultados de % PRq obtidos com os sistemas em que foram utilizados NaCl 0,9% ou acetona apresentaram coeficiente de variação igual a 1,46% em até 240 minutos após a marcação.

Os resultados da % PRq não foram influenciados pelos suportes (W3MM, HPTLC-SG ou HPTLC-cel) ou solventes (NaCl 0,9% ou acetona), e podem ser utilizados como alternativas ao ITLC-SG. Os valores de % PRq foram acima de 98% (**TAB. 57**).

5.12 Avaliação do custo de análise de % PRq considerando-se os diferentes suportes cromatográficos

Foi realizado um levantamento do custo de cada suporte cromatográfico utilizado neste estudo a fim de avaliar o preço de análise de % PRq. Na **TAB. 58** estão apresentadas as descrições de cada suporte cromatográfico (quantidade de folhas na caixa, dimensões) e na **TAB. 59** está relacionado o custo unitário da fita (suporte) nas dimensões utilizadas neste trabalho.

TABELA 58 - Apresentação (Embalagem) dos suportes cromatográficos.

Suporte	Quantidade de folhas/placas na embalagem	Dimensões das folhas/placas
	(caixa)	(comprimento x largura)
ITLC-SG*	50 unidades	30 x 11,5 cm
W3MM	100 unidades	46 x 57 cm
W17M	25 unidades	46 x 57 cm
W31ET	25 unidades	46 x 57 cm
TLC-cel	25 unidades	20 x 20 cm
TLC-SG	25 unidades	20 x 20 cm
TLC-SG fase reversa	25 unidades	20 x 20 cm
HPTLC-cel	25 unidades	20 x 20 cm
HPTLC-SG	25 unidades	20 x 20 cm

* Marca Agilent – produzido a partir de 2011 e não utilizado neste trabalho.

O ITLC-SG apresentado na **TAB. 58** é da marca Agilent e não da Pall Corporation por ser o material com características semelhantes e atualmente disponíveis no mercado. Entretanto, não foram realizados ensaios com o suporte ITLC-SG da Agilent por não haver tempo suficiente para a realização dos ensaios neste trabalho. Os dados apresentados na **TAB. 58** foram utilizados para o cálculo do custo unitário na dimensão de uso de cada suporte (**TAB. 59**).

TABELA 59 - Custo unitário do suporte cromatográfico.

Suporte		Custo (R\$)					
	Caixa*	Dimensões da Fita (comprimento x largura)					
		1,5 x 17,5	1,5 x 12,5	2,5 x 12,5	2,5 x 7,5	1,5 x 9,5	
	ITLC-SG	2026,66	5,79	2,90	--	--	--
	W3MM	556,45	0,06	0,04	--	--	--
	W17M	1500,00	0,68	0,45	--	--	--
	W31ET	1500,00	0,68	0,45	--	--	--
	TLC-cel	950,00	2,71	2,11	--	--	--
	TLC-SG	530,00	1,51	1,18	--	--	--
	TLC-SG fase reversa	2585,51	--	5,75	9,40	3,45	--
	HPTLC-cel	1556,50	--	--	--	--	2,39
HPTLC-SG	2680,32	--	--	--	--	4,12	

* custo da caixa em agosto/2010.

Como um dos objetivos específicos deste trabalho foi buscar suportes alternativos ao ITLC-SG foram realizadas comparações entre o custo dos demais suportes em relação ao ITLC-SG. O custo do ITLC-SG (1,5 x 17,5 cm) foi um dos mais elevados quando comparado aos outros suportes mais utilizados neste trabalho, a saber: HPTLC-SG (1,5 x 9,5 cm); HPTLC-cel (1,5 x 9,5 cm); TLC-SG (1,5 x 17,5 cm) e papéis Whatman.

W3MM foi um dos suportes mais utilizados neste trabalho e muito indicado pela literatura (**TAB. 06**). Foi o suporte que apresentou o menor custo, pois o valor da caixa foi um dos menores, e por possuir 100 folhas em cada caixa, tornou o custo da análise ainda menor (**TAB. 59**). O suporte W17M apresentou o mesmo custo de W31ET (**TAB. 58 e 59**).

6.0 CONCLUSÕES

Não houve diferença significativa entre os diferentes sistemas cromatográficos ao comparar os resultados de % PRq e que apenas em ECD-^{99m}Tc no sistema descrito na FA (Parte 1 e 2), o resultado da % PRq foi abaixo de 90%.

A alteração da proporção da fase móvel de acetona:acetato de amônio 60:40 descrita no sistema da FA (ECD-^{99m}Tc) para 80:20 possibilitou a determinação da % ^{99m}TcO₄⁻ e também da % ^{99m}TcO₂.

A análise comparativa entre os métodos FA, FE e IPEN para alguns RL foi prejudicada devido à indisponibilidade do suporte ITLC-SG.

Observou-se que o suporte HPTLC-celulose apresentou ser uma alternativa ao ITLC-SG para a determinação de % PRq por cromatografia planar.

O tempo de análise com suporte cromatográfico do tipo HPTLC-SG ou HPTLC-celulose foram menores que os obtidos em TLC-SG.

Para ECD-^{99m}Tc e MIBI-^{99m}Tc, os ensaios realizados com suportes em dimensões maiores (2,5 cm de largura x 12,5 cm de comprimento) que as recomendadas pelas farmacopeias não influenciaram os resultados de % PRq obtidos, mas facilitaram a determinação dos R_f das impurezas e do produto.

Os suportes W17M e W31ET apresentaram arraste do produto e/ou impurezas ao longo do suporte na maioria dos ensaios.

Na maioria dos sistemas em que foi avaliado MEC como fase móvel, foi observado bom desenvolvimento cromatográfico em rápido tempo de análise, mostrando ser um solvente alternativo a acetona na determinação da % ^{99m}TcO₄⁻.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, E.B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.T.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. **RBCF**, v. 44, n. 1, p. 1-12, 2008.
2. OLIVEIRA, R.S.; BENEVIDES, C. A.; HWANG, S. F.; SALVI R. P. C.; FREITAS I. M. A. T. R. Radiofarmácia e radiofármacos no Brasil: aspectos sanitários e fabris para a construção de uma linha de produção de radiofármacos PET. **RBCF**, v. 44, n. 2, p.181-184, 2008.
3. OLIVEIRA, R.S. Regulamentação de radiofármacos: União Européia, Estados Unidos e Brasil. **Lat. Am. J. Pharm.** , v. 27, n. 6, p. 906-908, 2008.
4. FERENCZI-FODOR, K.; VÉGH, Z.; RENGGER, B. Impurity profiling of pharmaceuticals by thin-layer chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 1218, p. 2722-2731, 2011.
5. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 17, de 16 de abril de 2010. Disponível na Internet <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jan 2012.
6. CASTIGLIA, S.G., SILVA, C.P.G., PEREIRA, N.S., ARAYA, G., MENDOZA, M., FREIRE, D.E; VERDERA, S. *Manual de Protocolos de Calidad de Radiofarmacos – Producción y Control de Radiofármacos*, ARCAL XV, 1999.
7. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 63, de 18 de dezembro de 2009. Disponível na Internet <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 09 jan 2012.
8. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 64, de 18 de dezembro de 2009. Disponível na Internet <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 09 jan 2012.

9. **UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP-NF 34.** Rockville, United States Pharmacopeia Convention, 2011.
10. **EUROPEAN PHARMACOPOEIA.** 7. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, 2011.
11. STELMACH, H.A.; QUINN, J.L. Radiopharmaceutical quality control. **Semin. Nucl. Med.**, v. 4, n. 3, p. 295-303, 1974.
12. 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.
13. HOYE, A. Determination of radiochemical purity of some radiochemicals and pharmaceuticals by paper chromatography, thin layer chromatography and high voltage electrophoresis. **J. Chromatog.** v. 28, p. 379-384, 1967.
14. BILLINGHURST, M.W. Chromatographic quality control of ^{99m}Tc -labeled compounds. **J. Nucl. Med.**, v. 14, n. 11, p. 793-797, 1973.
15. KROHN K.A.; JANSOLT A.L. Radiochemical quality control of short-lived radiopharmaceuticals. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v. 28, p. 213-227, 1977.
16. RUSSEL, C.D.; MAJERIK, J.E. Determination of pertechnetate in radiopharmaceuticals by high pressure liquid, thin layer and paper chromatography. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 30, p. 753-756, 1979.
17. WONG, S.H.; HOSAIN, P.; ZEICHNER, S.J.; SPITZNAGLE, L.A.; HOSAIN, F. Quality Control studies of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals by high performance liquid chromatography. **Int. J. Appl. Radiat. A. Isot.**, v. 32, p. 185-186, 1981.
18. TAYLOR, A.; HANSEN, L.; ESHIMA, D.; MALVEAUX, E.; FOLKS, R.; SHATTUCK, L.; LIPOWSKA, M.; MARZILLI, L.G. Comparison of Technetium-99m-LL-EC Isomers in rats and humans. **J. Nucl. Med.** v. 38, p. 821-826, 1997.

19. DECRISTOFORO, C.; SILLER, R.; CHEN, F.; RICCABONA, G. Radiochemical purity of routinely prepared ^{99m}Tc radiopharmaceuticals: A retrospective study. **Nucl. Med. Commun.**, v. 21, p. 349-354, 2000.
20. COLLINS, CAROL H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. São Paulo: Editora da Unicamp, 2006.
21. DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia, um breve ensaio. **Quim. Nova**, v. 7, p. 21-25, 1998.
22. BOZKURT, M.F.; KIRATLI, P.O.; KONYALI, D.; METIN, F. Quality control of instant kit ^{99m}Tc -mercapto acetyl triglycine with inter- and intra-operator measurements. **Hell. J. Nucl. Med.**, v. 12, n. 1, p. 59-62, 2009.
23. [IPEN-CNEN/SP] Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Comissão Nacional de Energia Nuclear; Manual de especificações técnicas dos Radiofármacos DIRF. Disponível na internet <www.ipen.gov.br>. Acesso em: 14 set 2011.
24. WUNDERLICH, G.; HERRLING, P.; ZÜRN, A.; ANDERS, P.; KOTZERKE, J. Chromatographic determinations of radiochemical purity. **Nuklearmedizin** n. 49, p.1-5, 2010.
25. MILLAR A.M.; O'BRIEN, L.M.; BEATTIE, L.A.; CRAIG, F. An evaluation of paper chromatography for measuring the levels of radiochemical impurities in ^{99m}Tc Medronate Injection. **J. Label. Compd. Radiopharm.**, v. 53, p. 11-14, 2010.
26. GARCIA, E.J. Um espaço para a radiofarmácia. **Pharmacia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 4-8, 2002.
27. OLIVEIRA, R.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A. História da radiofarmácia e as implicações da emenda constitucional N.49. **RBCF**, v. 44, n. 3, p. 377-382, 2008.
28. OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.E.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Radiopharmaceuticals and applications. **Braz. J. Pharm. Sciences**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

29. SAHA, G.B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 4. ed. New York, NY: Springer, 1998.
30. 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.
31. ZHANG, X.E.; CHEN, X. Preparation and biodistribution of ^{99m}Tc -tricarbonyl complex with 4-[(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-dithioformate as a potential 5-HT_{1A} receptor imaging agent. **Appl. Radiat. and Isot.**, v. 65, p. 287–292, 2007.
32. THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
33. ALMEIDA, E.V. *Desenvolvimento e validação de metodologia para radiofármacos de Tecnécio-99m empregando cromatografia de alta eficiência (CLAE)*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.
34. CAMARGO, A.C. *Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato- ^{99m}Tc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.
35. ZOLLE, I. **Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine**. New York, NY: Springer, 2007.
36. OWUNWANNE, A., PATEL, M., SADEK, S. **The handbook of Radiopharmaceuticals**. 1 ed. London: Chapman & Hall Medical, p. 16-19; 92-130, 1995.
37. NOSCO, D.L.; BEATY-NOSCO, J.A. Chemistry of technetium radiopharmaceuticals 1: Chemistry behind the development of technetium-99m compound to determine kidney function. **Coordination chemistry reviews**, v.184, p. 91-123, 1999.
38. FUKUMORI, N.T.O. *Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

39. SRIVASTAVA, S.C.; MEINKEN, G.; SMITH, T.D.; RICHARDS, P. Problems Associated with stannous ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, v. 28, p. 83-95, 1977.
40. ZIMMER A, M.; PAVEL, D. G. Rapid miniaturized chromatographic quality-control procedures for Tc-99m radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, v. 18, p. 1230-1233, 1977.
41. COLLINS, C.H. O aperfeiçoamento da cromatografia em camada delgada. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 2, p. 5-9, 2010.
42. KÄMÄRÄINEN, E.L.; HAAPARANTA, M.; SIITARI-KAUPPI, M.; KOIVULA T.; LIPPONEN, T.; SOLIN, O. Analysis of ^{18}F -labelled synthesis products on TLC plates: Comparison of radioactivity scanning, film autoradiography, and a phosphoimaging technique. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 64, p. 1043-1047, 2006.
43. [CHROMBOOK 06/07] CHROMATOGRAPHY AT MERCK – EXPERIENCE DRIVES INNOVATION. Disponível em: <<http://www.chromatography.merck.de>>. Acesso em: 10 mai. 2011.
44. POOLE, C.F. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *J. Chromatogr. A.*, v. 1000, p. 963-984, 2003.
45. HAAPARANTA, M.; GRÖNROOS, T.; ESKOLA, O.; BERGMAN, J.; SOLIN, O. Planar chromatographic analysis and quantification of short-lived radioactive metabolites from microdialysis fractions. *J. Chromatogr. A.*, v. 1108, p. 136-139, 2006.
46. GÁSPAR, A.; BÁCSI, I. Forced flow paper chromatography: A simple tool for separations in short time. *Microch. Journal*, v. 92, p. 83-86, 2009.
47. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC Method Development*. Ed. John Wiley and Sons: New York, 1997.
48. POOLE, C.F.; DIAS, N.C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v. 892, p. 123-42, 2000.
49. **Farmacopéia Brasileira**, 5 ed. Brasília/DF, ANVISA, volume I e II, 2010.

50. ZUCCHINI, G. L.; MARINELLI, M.; POZZATO, R.; GARUTI P. Comparison of different chromatographic quality-control procedures to determine the radiochemical purity of common ^{99m}Tc -Diagnostic agents. ***Appl. Radiat. Isot.***, v. 38, n. 4, p. 283-288, 1987.
51. SALEHI, N.; LICHTENSTEIN, M.; POJER, P. T. Technetium-99m radiopharmaceutical preparation by surface adsorbed stannous ions. ***J. Nucl. Med.***, v. 28, n. 6, p. 1041-1046, 1987.
52. BILLINGHURST, M. W.; ECKERT, K.; MANG'ERA, K. Alternative quality control for technetium-99m IDA-complexes. ***Appl. Radiat. Isot.***, v. 61, p. 1151-1155, 2004.
53. MALLOL, J.; BONINO, C. Comparison of radiochemical purity control methods for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals used in hospital radiopharmacies. ***Nucl. Med. Commun.***, v. 18, p. 419-422, 1997.
54. MILLAR, A. M.; BEATTIE, L. A.; CRAIG, F.; O'BRIAN, L. M. An evaluation of GMCP-SA as a replacement for ITLC-SG when measuring the levels of radiochemical impurities in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals by thin-layer chromatography. ***J. Label Compd. Radiopharm.***, v. 52, p. 538-542, 2009.
55. BILLINGHURST, M. W.; ABRAMS, D. N.; DUPONT, J. A comparison of radiopharmaceutical labeling efficiency of chromatographic generator vs MEK Extraction [^{99m}Tc]Pertechnetate. ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 43, p. 1045-1049, 1992.
56. RUSSEL, C. D.; CASH, A. G. Complexes of technetium with pyrophosphate, etidronate, end medronate. ***J. Nucl. Med.***, v. 20, p. 532-537, 1979.
57. BERGER, R. Radical scavengers and the stability of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 33, p. 1341-1344, 1982.
58. IMRAN, M. B.; KHURSHID, S. J.; KARIN, H. M. A. Biological and radiochemical quality control of indigenous ^{99m}Tc -radiopharmaceutical kits. ***J. Radioanal. Nucl. Chem.***, v. 176, n.3, p. 211-223, 1993.

59. TERÁN, M.; SAVIO, E.; PAOLINO, A.; FRIER, M. Hydrophilic and lipophilic radiopharmaceuticals as tracers in pharmaceutical development: *In vitro* – *In vivo* studies. **BMC Nucl. Med.**, v. 5, n.5, p. 1-8, 2005.
60. VERBRUGGEN, A. M.; NOSCO, D. L.; NEROM, C. G. G.; BORMANS, G. M.; ADRIAENS P. J., 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.
61. VANBILLOEN, H. P.; CLEYNHENS, B. J.; VERBRUGGEN, A. M. Synthesis and biological evaluation of the four isomers of technetium-99m labeled ethylenecysteamine cysteine (^{99m}Tc -ECC), the monoacid derivative of ^{99m}Tc -L,L-ethylenedicysteine. **Nucl. Med. Biol.**, v. 27, p. 207-214, 2000.
62. AUNGURARAT, A.; NGAMPAYAD, T.; PHUMKEM, S.; TUNTAWIWATTANANONT, T. Stability study and optimization conditions of Tc-99m-L,L-ethylenedicysteine (Tc-99m-L,L-EC). **Thai Nucl. Med.**, v. 6, n. 1, p. 35-42, 2001.
63. BHATTACHARYA, K.; DEBNATH, M. C.; HALDER, K. K. CHATTOPADHYAY, S.; DAS, M. K.; SARKAR, B. R.; GANGULY, S.; BANERJEE, S. Single vial kit formulation of technetium-99m-L,L-ethylene dicysteine: Its characterization, biodistribution and comparison with commercially available ^{99m}Tc -L,L-EC Kits. **Current. Radiopharm.**, v.2, p. 32-41, 2009.
64. 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.
65. KOSLOWSKY, I.L.; BRAKE, S.E.; BITNER, S.J. Evaluation of the stability of ^{99m}Tc -HMPAO stored in syringes. **J. Nucl. Med. Technol.**, v. 29, n. 4, p. 197-200, 2001.
66. VALLABHAJOSULA, S.; ZIMMERMAN, R. E.; PICARD, M.; STRITZKE, P.; MENA, I.; HELLMAN, R. S.; TIKOFKY R. S.; STABIN, M. G.; MORGAN, R. A.; GOLDSMITH, S. J. 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.
67. DJOKIC, D.; JANKOVIC, D.; MAK SIN, T. Radiochemical purity and particles number determinations of modified ^{99m}Tc -macroaggregated albumin. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 67, n. 8/9, p. 573-579, 2002.

68. SANTAMARIA, A. R.; MARIN, Y. A.; CRESPO, F. Z.; DUENAS, N. M.; FERNANDEZ, R. R. Caracterización de la formulación de ^{99m}Tc -Macroagregados de albumina. **Nucleus**, n.45, p.11-17, 2009.
69. JOVANOVIĆ, V.; VUKANOVIĆ, R.; MAKŠIN, T.; JOVANOVIĆ, M. S. Statistical analysis of the results of ^{99m}Tc -MDP quality control. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 111, n. 1, p. 129-135, 1987.
70. TONELLI, D.; ZAPPOLI, S.; MARENGO, M. Determination of radiochemical purity of technetium-99m-labeled complexes by TLC. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 45, n. 5, p. 549-552, 1994.
71. 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.
72. TASDELEN, B. HPLC investigation of the radiochemical purity of ^{99m}Tc -MIBI. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 11, p. 1311-1318, 2011.
73. CAGNOLINI, A.; WHITENER, D.; JURISSON, S. Comparison of the kit performance of three ^{99m}Tc Myocardial Perfusion agents. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 435-439, 1998.
74. 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.
75. 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.
76. MAIOLI, C.; BESTETTI, A.; MILANI, F.; CORNALBA, G.P.; TAGLIABUE, L.; BENEDETTO, D.D.; ROGNONI, I.; TAROLO, G.L.; PARONI, R. Evaluation of different counting methods for use in radiochemical purity testing procedures for ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceuticals. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 66, p. 556-559, 2008.

77. 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, 1991.
78. HUNG, J.C.; HEROLD, T.J.; GIBBONS, R. Optimal conditions of ^{99m}Tc eluate for the radiolabeling of ^{99m}Tc –Sestamibi. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 599-603, 1996.