



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E  
NUCLEARES

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE QUÍMICA E  
CONTROLE DA QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO 3'-FLUORO-  
DESOXITIMIDINA (<sup>18</sup>FLT) NO CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES  
DO NORDESTE**

Recife

2018

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE QUÍMICA E  
CONTROLE DA QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO 3'-FLUORO-DESOXITIMIDINA  
(<sup>18</sup>FLT) NO CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Aplicação de Radioisótopos na Indústria e na Medicina.

**Orientadora:** Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira

Recife

2018

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

O48e Oliveira, Raquel Cordeiro de.  
Estabelecimento de procedimentos para síntese química e controle da qualidade do radiofármaco 3'-fluoro-desoxitimidina ( $^{18}\text{FLT}$ ) no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste. / Raquel Cordeiro de Oliveira. - Recife, 2018.  
97 f. : il., figs., gráfs., tabs.  
  
Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.  
  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2018.  
Inclui referências e apêndices.  
  
1. Engenharia Nuclear. 2. Radiofármacos. 3.  $^{18}\text{FLT}$ . 4. Radiotraçador. I. Oliveira, Mércia Liane de, orientadora. II. Título.

CDD 621.48 (22. ed.)

UFPE

BDEN/2018-31

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTOS PARA SÍNTESE QUÍMICA E  
CONTROLE DA QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO 3'-FLUORO-DESOXITIMIDINA  
(<sup>18</sup>FLT) NO CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 30/07/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira (Orientadora)  
CRCN-NE/CNEN

---

Dra. Juliana Batista da Silva (Examinadora Externa)  
CDTN/UFMG

---

Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Externa)  
UFPE

---

Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo (Examinadora Externa)  
UFPE

Dedico este texto a Deus, pela força, coragem e pela vida.

Aos meus pais, Célia e José, pela dedicação e por me fazer sempre ter acesso aos estudos.

Ao meu companheiro, Kelvin, pelo amor, paciência, dedicação e ensinamentos, tanto profissionais quanto pessoais,

Aos pacientes que necessitam da Medicina Nuclear.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar vida, oportunidades e esperança frente aos desafios.

A Mainha e Painho, por serem minha base, meus exemplos e minha motivação a sempre seguir em frente.

A Kelvin por ser o meu companheiro, o melhor professor de matemática, conselheiro, cozinheiro, psicanalista, motivador e razão para nunca desistir.

A Mércia pela oportunidade, ensinamentos e por ser um exemplo de pessoa e mentora a qual sempre irei me espelhar.

A Chicó, Bolt e Jade, meus filhos de quatro patas, por me darem alegrias e amor.

Aos amigos de laboratório e convivência que me apoiaram quando foi necessário, tanto no meio acadêmico quanto no pessoal.

“Se apenas leres os livros que toda a gente lê, apenas podes pensar o mesmo que os outros estão a pensar” (MURAKAMI, H., 2008).

## RESUMO

O câncer envolve um conjunto de patologias responsáveis por grande parte das mortes no mundo. Por ser um tipo de doença recorrente e progressiva ao longo do tempo, são necessários métodos de diagnóstico que levem à sua detecção precoce, aumentando a resposta do paciente ao tratamento e, conseqüentemente, suas expectativa e qualidade de vida. Diversas técnicas de Medicina Nuclear são empregadas com a finalidade de detecção de carcinomas, dentre elas destaca-se a Tomografia por Emissão de Pósitrons aliada à Tomografia Computadorizada (PET/CT), que utiliza radiofármacos. Estudos realizados com a 3'-fluoro-desoxitimidina ( $^{18}\text{FLT}$ ) mostram que esse radiofármaco é mais específico que o  $^{18}\text{FDG}$  ( $[^{18}\text{F}]$  Fludesoxiglicose) para marcação das células tumorais, aumentando a qualidade do diagnóstico. Devido à importância desse radiofármaco, o presente projeto visou estabelecer procedimentos de síntese e controle da qualidade do  $^{18}\text{FLT}$  na Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), bem como investigar a pureza radioquímica do produto. O rendimento radioquímico médio obtido foi  $3,97 \pm 1,31\%$ , tendo o produto pureza radioquímica  $\geq 95\%$ . As impurezas químicas quantificadas foram menores do que  $0,1 \text{ mg/mL}$ , a concentração de etanol nas amostras foi menor que  $10\%$ , bem como acetonitrila esteve abaixo de  $0,04\%$ . A pureza radioquímica do produto foi investigada frente fatores como pH, temperatura e adição de estabilizante. Em todas as condições, a pureza radioquímica foi mantida constante. Foi possível sintetizar o radiofármaco proposto com boa pureza radioquímica, bem como os outros requisitos preconizados por compêndios oficiais. As metodologias para controle da qualidade do radiofármaco foram estabelecidas e, quando necessário, validadas. Todos os critérios farmacopeicos, com base na monografia da Farmacopeia Europeia de  $^{18}\text{FLT}$  e outros compêndios oficiais, como a Farmacopeia Americana, foram alcançados. Este trabalho poderá servir como guia para implementação deste novo radiofármaco no CRCN-NE, possibilitando a distribuição comercial deste para hospitais de Recife e Região Nordeste.

**Palavras-chave:** Radiofármacos.  $^{18}\text{FLT}$ . Radiotraçador.

## ABSTRACT

Cancer involves a set of pathologies responsible for most of the world's deaths. Because it is a recurrent and progressive type of disease over time, diagnostic methods that lead to their early detection are necessary, increasing the patient's response to treatment and, consequently, their expectations and quality of life. Several techniques of Nuclear Medicine are used for the detection of carcinomas, among them the Positron Emission Tomography allied to Computed Tomography (PET/CT), which uses radiopharmaceuticals. Studies performed with 3'-fluoro-deoxythymidine ( $^{18}\text{FLT}$ ) show that this radiopharmaceutical is more specific than  $^{18}\text{FDG}$  ( $^{18}\text{F}$  Fludeoxyglucose) for labeling tumor cells, increasing the quality of the diagnosis. Due to the importance of this radiopharmaceutical, the present project aimed to establish procedures for the synthesis and quality control of  $^{18}\text{FLT}$  in the Division of Radiopharmaceuticals Production (DIPRA) of the Regional Center of Nuclear Sciences of the Northeast (CRCN-NE), as well as to investigate the radiochemical stability of product. The average radiochemical yield obtained was  $3.97 \pm 1.31\%$ , the product having radiochemical purity  $\geq 95\%$ . The quantified chemical impurities were lower than 0.1 mg/mL, ethanol concentration in the samples was less than 10%, as well as acetonitrile was below 0.04%. The radiochemical purity of the product was investigated against factors such as pH, temperature and addition of stabilizer. In all conditions the radiochemical purity was kept constant. It was possible to synthesize the proposed radiopharmaceutical with good radiochemical purity, as well as the other requirements recommended by official compendia. The methodologies for controlling the quality of the radiopharmaceutical were established and, when necessary, validated. All pharmacopoeia criteria based on the European Pharmacopoeia monograph of  $^{18}\text{FLT}$  and others official compendia, like United States Pharmacopoeia, were achieved. This work may serve as a guide for the implementation of this new radiopharmaceutical in the CRCN-NE, making possible the commercial distribution of this to hospitals in Recife and Northeast Region.

**Keywords:** Radiopharmaceuticals.  $^{18}\text{FLT}$ . Radiotracer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da emissão, interação e aniquilação dos pósitrons emitidos por decaimento $\beta^+$ .....	24
Figura 2 –	Esquematização da estrutura do DNA e de um nucleotídeo.....	31
Figura 3 –	Bases nitrogenadas. Purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina, citosina e uracila), respectivamente.....	32
Figura 4 –	Nucleosídeo timidina e seu análogo $^{18}\text{FLT}$ .....	34
Figura 5 –	Metabolismo celular da timidina e de seu análogo $^{18}\text{FLT}$ ...	35
Figura 6 –	Reação simplificada de síntese do $^{18}\text{FLT}$ .....	37
Figura 7 –	Imagens PET de paciente com tumor cerebral. As áreas mais alaranjadas representam a captura do radiofármaco. À esquerda imagem obtida com $^{18}\text{FDG}$ . À direita, imagem obtida com $^{18}\text{FLT}$ .....	39
Figura 8 –	Imagens PET de ratos com áreas tumorais e de inflamação. Em A temos imagem obtida com $^{18}\text{FLT}$ . Em B, imagem obtida com $^{18}\text{FDG}$ .....	40
Figura 9 –	Organização do módulo para $^{18}\text{FLT}$ dentro da célula de síntese. a) módulo Synthera, b) cassete IFP para inserção dos reagentes acetonitrila e Cryptand, c) cassete IFP suporte, adaptado para inserção de NaOH 1M e HCl 2M, d) frasco reator inserido no forno aquecedor, e) frasco de rejeitos. ....	46
Figura 10 –	Tela de trabalho do Synthera, adaptada de $^{18}\text{FDG}$ para síntese de $^{18}\text{FLT}$ .....	47

Figura 11 –	Detalhes dos reagentes e estrutura de síntese. a) cartucho QMA, b) solução Cryptand, c) 25 mg de precursor Boc dissolvido em acetonitrila, d) frasco reator, e) HCl 2 M, f) NaOH 1 M. ....	48
Figura 12 –	Organização da capela de exaustão blindada, utilizada para purificação de <sup>18</sup> FLT. Em zoom, colunas de purificação.....	48
Figura 13 –	Resultado do teste de residual de Cryptand.....	60
Figura 14 –	Atividade radioativa vs. tempo para as três amostras de <sup>18</sup> FLT.....	61
Figura 15 –	Cromatograma, obtido em CLAE, de uma das sínteses de <sup>18</sup> FLT .....	62
Figura 16 –	Gráfico de CCD, mostrando pico radioativo correspondente a <sup>18</sup> FLT.....	63
Figura 17 –	Gráfico de cromatografia a gás, mostrando os solventes residuais da síntese de <sup>18</sup> FLT .....	64
Figura 18 –	Gráfico da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários de uma das curvas para o etanol.....	66
Figura 19 –	Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear ajustado para o Etanol.....	67
Figura 20 –	Gráfico da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários de três curvas para a acetonitrila.....	68
Figura 21 –	Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear ajustado para a acetonitrila.....	70
Figura 22 –	Gráfico de uma análise de solventes residuais por cromatografia a gás, mostrando boa separação (resolução) entre os picos.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Emissores de pósitron ciclotron-produzidos mais utilizados em PET e suas principais características .....	25
Tabela 2 –	Sistema cromatográfico para determinação de solventes residuais em <sup>18</sup> FLT.....	53
Tabela 3 –	Critérios de aceitação para os parâmetros do ensaio de endotoxinas utilizando o PTS.....	54
Tabela 4 –	Parâmetros de validação da metodologia de cromatografia a gás, usada no controle da qualidade do <sup>18</sup> FLT .....	56
Tabela 5 –	Parâmetros e resultados das sínteses de <sup>18</sup> FLT.....	58
Tabela 6 –	Resultados do controle da qualidade físico-químico de <sup>18</sup> FLT .....	59
Tabela 7 –	Dados do ensaio de endotoxinas bacteriana dos três lotes de <sup>18</sup> FLT .....	64
Tabela 8 –	Análise de variância para o modelo linear ajustado para uma faixa de concentração de 2.500 a 10.000 µg/ml de Etanol com 95% de intervalo de confiança.....	68
Tabela 9 –	Análise de variância para o modelo linear ajustado para uma faixa de concentração de 200 a 800 µg/ml de acetonitrila com 95% de intervalo de confiança.....	69
Tabela 10 –	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do etanol e da acetonitrila .....	70
Tabela 11 –	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão para o etanol.....	71
Tabela 12 –	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão para a acetonitrila.....	71

Tabela 13 –	Resultado dos ensaios para robustez observando a variação da temperatura (°C) nas áreas do pico e nos tempos de retenção dos analitos.....	72
Tabela 14 –	Resultado dos ensaios para robustez observando a variação do fluxo da fase móvel (mL/min) nas áreas do pico e nos tempos de retenção dos analitos.....	73
Tabela 15–	Pureza radioquímica dos três lotes de <sup>18</sup> FLT por cromatografia em camada delgada (CCD).....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{18}\text{F}$  Flúor 18;

$^{18}\text{FDG}$  Fludesoxiglicose;

$^{18}\text{FLT}$  Fludesoxitimidina ou 3'-fluoro-desoxitimidina;

$^{18}\text{FLT-DP}$  Difosfato de  $^{18}\text{FLT}$ ;

$^{18}\text{FLT-MP}$  Monofosfato de  $^{18}\text{FLT}$ ;

$^{18}\text{FLT-TP}$  Trifosfato de  $^{18}\text{FLT}$ ;

$^{40}\text{K}$  Potássio 40;

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  Tecnécio 99 metaestável;

$^{103}\text{Pd}$  Paládio 103;

$^{131}\text{I}$  Iodo 131;

$^{131}\text{I-NaI}$  Iodeto de sódio;

$^{133}\text{Xe}$  Xenônio 133;

CAN Nitrato de amônio cério;

CCD Cromatografia em camada delgada;

$\text{CH}_3\text{CN}$  Acetonitrila;

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTP Citidina trifosfato;

DNA Ácido desoxirribonucleico;

Et al. E outros;

eV Elétron-volt;

HCl Ácido clorídrico;

HIV do inglês *Human Immunodeficiency Vírus*, vírus da imunodeficiência humana;

INCA Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva;

$\text{K}_2\text{CO}_3$  Carbonato de potássio;

keV quilo elétron-volt;

LAL Lisado de *Limulus amebocite*.

MeV Mega elétron-volt;

NaOH Hidróxido de sódio

pH Potencial hidrogeniônico;

Psi Do inglês *pound force per square inch*, ou unidade de força por polegada quadrada. Unidade de medida da pressão;

RMN Ressonância Magnética Nuclear;

RNA Ácido ribonucleico;

TBAHCO<sub>3</sub> Bicarbonato tetrabutilamônio;

TK Timidina quinase;

TMP Timidina monofosfato;

TSB Caldo soja tripticaseína;

UMP Uridina monofosfato;

USP Farmacopeia Americana;

UTP Uridina trifosfato;

UV Ultravioleta.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	METABOLISMO CELULAR E CÂNCER .....	20
2.2	PET/CT .....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Emissores de pósitrons, interação e decaimento <math>\beta^+</math></b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Radiofármacos PET</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.3</b>	<b><math>^{18}\text{FDG}</math>: visão geral, síntese, aplicações e limitações</b> .....	<b>27</b>
2.3	$^{18}\text{FLT}$ .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Histórico</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Síntese, degradação e acúmulo de nucleotídeos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Mecanismo de absorção de <math>^{18}\text{FLT}</math></b> .....	<b>33</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Síntese do <math>^{18}\text{FLT}</math> e métodos de marcação</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Vantagens do <math>^{18}\text{FLT}</math> sobre o <math>^{18}\text{FDG}</math></b> .....	<b>38</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Avaliação da qualidade do <math>^{18}\text{FLT}</math></b> .....	<b>41</b>
2.3.6.1	Controle da qualidade físico-químico .....	41
2.3.6.2	Controle da qualidade microbiológico.....	43
2.3.7	Fatores que influenciam a pureza radioquímica de radiofármacos.....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1	INFRAESTRUTURA.....	45
3.2	SÍNTESE DE $^{18}\text{FLT}$ .....	45
<b>3.2.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>45</b>
3.3	CONTROLE DA QUALIDADE.....	50
<b>3.3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>50</b>
3.4	VALIDAÇÃO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A GÁS UTILIZADO NO CONTROLE DA QUALIDADE.....	54
3.5	PUREZA RADIOQUÍMICA DE $^{18}\text{FLT}$ FRENTE A DIFERENTES AGENTES.....	57
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>

4.1	SÍNTESE E CONTROLE DA QUALIDADE DE <sup>18</sup> FLT.....	58
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A GÁS NO CONTROLE DE QUALIDADE.....	65
4.2.1	<b>Linearidade</b> .....	66
4.2.2	<b>Especificidade</b> .....	69
4.2.3	<b>Limites de Detecção e Quantificação</b> .....	70
4.2.4	<b>Precisão e exatidão</b> .....	70
4.2.5	<b>Robustez</b> .....	71
4.3	PUREZA RADIOQUÍMICA DE <sup>18</sup> FLT FRENTE A DIFERENTES AGENTES.....	73
5	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	<b>APÊNDICE A</b> .....	89
	<b>APÊNDICE B</b> .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos de câncer diagnosticados no Brasil tende a aumentar com o passar dos anos, segundo tendência mundial. Estima-se que, em 2018, serão diagnosticados cerca de 68.220 novos casos de câncer de próstata, 59.700 novos casos de câncer de mama feminino e 36.360 novos casos de câncer de cólon e reto (INCA, 2018).

O aumento esperado no número de novos casos de câncer torna necessária a busca por métodos que possam diagnosticar mais precocemente esta patologia e, nesse aspecto, a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), aliada à Tomografia Computadorizada (CT), é uma das metodologias mais utilizadas mundialmente. O PET, primeiramente proposto para o diagnóstico de enfermidades em 1951, é um exame que possibilita a detecção precoce de diversas patologias, além do câncer. Dentre as vantagens deste exame destacam-se o fato de o mesmo não ser invasivo, indicar com grande confiança a posição e o tamanho de tumores (quando associada à CT) e, ainda, permitir que informações metabólicas e anatômicas sejam adquiridas. Esta técnica está baseada na administração ao paciente de um radiofármaco emissor de pósitrons. Logo após sua emissão, o pósitron interage com um elétron, dando origem a pares de fótons de 511 keV, emitidos em sentidos opostos, que serão utilizados na formação de imagens anatômicas e metabólicas dos pacientes, evidenciando áreas onde houve a maior captação de radiofármacos, que no caso, serão os tumores (ROBILLOTA, 2006; SAHA, 2005).

No Brasil, a diversidade de radiofármacos utilizados em PET é menor do que a mundial, sendo que o radiofármaco mais sintetizado e utilizado atualmente para esta finalidade é o  $^{18}\text{F}$ -Fludeoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ FDG). Tal radiofármaco funciona como um análogo da glicose, utilizada em maior quantidade pelas células tumorais do que pelas células normais, o que possibilita a diferenciação das mesmas (ZHANG et al, 2012).

Desde o início da produção, o Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), distribuiu cerca de 4 mil e 200 doses de  $^{18}\text{F}$ FDG, beneficiando pacientes da região Nordeste do Brasil. Estima-se que, disponibilizando novos radiofármacos, o Centro ofereça alternativas mais específicas, as quais podem beneficiar a população, em especial, a Nordestina.

Apesar de ser o radiofármaco para PET mais usado mundialmente e o único produzido no CRCN-NE, a desvantagem do  $^{18}\text{F}$ FDG é que, células que possuem naturalmente metabolismo alto e, conseqüentemente consomem altas taxas de glicose (como as células cerebrais e as do miocárdio), podem ser confundidas com células tumorais, já que o  $^{18}\text{F}$ FDG se liga às células citadas e sinaliza uma falsa ocorrência de tumor. Além disso, pelo fato de sítios inflamatórios apresentarem grande atividade glicolítica celular, estes também são radiomarcados por  $^{18}\text{F}$ FDG, dificultando a delimitação do que é tumor e do que é inflamação. Para isso, necessita-se de um radiofármaco que se ligue preferencialmente a células neoplásicas, mas não às células normais. Neste cenário é que surge o radiotraçador 3'-fluoro-desoxitimidina ( $^{18}\text{F}$ FLT) (ROBILLOTTA, 2006; SAHA, 2005; ZHANG et al, 2012).

O  $^{18}\text{F}$ FLT, investigado desde 1998, é um análogo da timidina, a qual é transformada em nucleosídeos dentro das células, possibilitando a proliferação destas. Uma característica comum dos carcinomas é o aumento na taxa basal de proliferação celular, o que requer maior síntese de moléculas orgânicas essenciais às células, como o DNA, RNA, proteínas e lipídios. Vale ressaltar que os DNA e RNA humanos são basicamente constituídos por cinco bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina, uracila e timina. As bases nitrogenadas são ligadas a um anel de desoxirribose e se tornam nucleotídeos, sendo a timina transformada no nucleosídeo timidina por meio de sua ligação ao anel desoxirribose. Dentro das células, a timidina e os outros nucleosídeos podem ser fosforilados e originar nucleotídeos, os quais são as peças chave para síntese do DNA e proliferação celular (BADING; SHIELDS, 2008).

Logo, nas células tumorais, a captação do  $^{18}\text{F}$ FLT é maior do que em células normais, o que possibilita a detecção de tumores com alta taxa de proliferação, permitindo também a diferenciação entre áreas em funcionamento normal, como o cérebro, das áreas tumorais. O radiofármaco em questão já é difundido na literatura e se apresenta como inovador no meio diagnóstico (VESSELLE et al., 2002). Na Região sudeste do Brasil, o radiofármaco em questão já foi sintetizado e esforços vêm sendo empregados para sua disponibilização clínica, como se pode constar nos trabalhos de Tafas (2014) e Zanette (2013). Porém, na região Nordeste, nenhum centro de radiofarmácia disponibiliza  $^{18}\text{F}$ FLT, seja para pesquisa ou para diagnóstico.

Dessa forma, este trabalho objetivou o estabelecimento de procedimentos para síntese e controle da qualidade do radiofármaco  $^{18}\text{FLT}$ , por meio de adaptação dos métodos de produção de  $^{18}\text{FDG}$ , bem como da estrutura do CRCN-NE para realização dos ensaios de controle da qualidade do produto acabado.

Os objetivos específicos foram:

- Adaptar os protocolos e procedimentos de síntese, validados para  $^{18}\text{FDG}$ , para obtenção do radiofármaco  $^{18}\text{FLT}$ ;
- Estabelecer ou adaptar metodologias para investigar a qualidade do produto, seja físico-químico ou microbiológico. Esta etapa utilizou das metodologias preconizadas pela Monografia de  $^{18}\text{FLT}$ , presente na oitava edição da Farmacopeia Europeia (EP);
- Validar, no caso das metodologias não farmacopeicas, as metodologias utilizadas no controle da qualidade do produto;
- Estudar a influência dos parâmetros temperatura, pH e adição de estabilizante na pureza radioquímica do produto acabado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 METABOLISMO CELULAR E CÂNCER

Naturalmente, as células humanas estão em constante processo de renovação e multiplicação. Tais processos ocorrem devido à necessidade de reparos, modificações favoráveis ao organismo ou até mesmo pela necessidade de células novas para o funcionamento normal dos tecidos. Para que os processos de renovação e multiplicação ocorram é necessária a utilização de energia e de substratos pelas células, o que aumenta a demanda energética e molecular. O processo de aumento da demanda energética e molecular pode ser um processo fisiológico, que ocorre normalmente, ou patológico, que ocorre no caso das neoplasias (DE BERARDINIS et al., 2008; FERREIRA, 2010; ZHAO et al., 2013).

Existem dois tipos de neoplasias, isto é, duas formas de classificar o desenvolvimento e multiplicação anormal de células. As neoplasias benignas podem ser classificadas como o crescimento anormal de células muito parecidas com as células do tecido normal no qual se originaram. Este tipo de neoplasia tem taxa de crescimento lenta, não metastiza e nem invade os tecidos vizinhos. Como exemplos de neoplasias benignas podem ser citados o lipoma de cólon e o meningioma de cérebro (SHEAR, 2002). As neoplasias malignas, ou cânceres, são compostos por células bastante diferenciadas das células de origem, possuem alta taxa de proliferação e podem metastizar e invadir tecidos. Como exemplo destas podemos citar o carcinoma renal e o hepático (KLATT, 2017).

O câncer envolve um grupo de patologias que geram modificações em células e em moléculas básicas ao funcionamento celular, como os lipídeos, carboidratos e proteínas. As características metabólicas das células cancerígenas diferem das do metabolismo nas células normais, no sentido de que as cancerígenas são mais dependentes da glicólise aeróbica (efeito Warburg), da glutaminólise e da síntese de ácidos graxos para proliferação (CAIRNS et al., 2011; DEBERARDINIS et al., 2008; VANDER HEIDEN et al., 2009). Logo, as modificações nos perfis moleculares devido às alterações metabólicas, causadas pelos cânceres, tornam possível identificar e rastrear as células cancerígenas.

Mundialmente, as técnicas mais utilizadas para detecção e rastreamento de tumores envolvem métodos de medicina nuclear, como por exemplo, a Tomografia

Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) e a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) (CHUNG, 2002; NESTLE et al., 2005). Estas técnicas utilizam das características e especificidade dos radiofármacos para detecção de diversos tipos de cânceres. No caso do SPECT, são utilizados radiofármacos emissores de radiação gama. No caso do PET, os radiofármacos são compostos de um radionuclídeo emissor de pósitrons e um fármaco específico ao tipo de tumor a ser detectado (SAHA, 1998).

Ainda sobre o SPECT, as imagens obtidas consistem em um conjunto de imagens planas, que descrevem a distribuição da radioatividade no paciente. Os cortes tomográficos transaxiais são obtidos a partir de técnicas de reconstrução tomográfica. Para isso, uma câmera convencional é girada em torno do paciente, registrando uma imagem em cada ângulo (POZZO, 2005). Uma das desvantagens do SPECT é a formação de imagens com menor resolução, bem como maior quantidade de artefatos, em comparação às imagens obtidas por meio do PET.

## 2.2 PET/CT

A Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) é uma modalidade diagnóstica que se tornou indispensável para a detecção e o acompanhamento de diversos tipos de câncer. O componente chave do PET são os radiotraçadores, ou fármacos marcados com radionuclídeos emissores de pósitrons (IAEA, 2012).

A imagiologia médica é considerada uma maneira sofisticada e menos invasiva de visualizar as estruturas anatômicas corporais. Os raios X, a Tomografia Computadorizada (CT) e a ressonância magnética nuclear (RMN) permitem a obtenção de imagens finamente detalhadas das estruturas do organismo. Porém, algumas vezes são necessárias, além da imagem anatômica, imagens que mostrem as funções fisiológicas dos órgãos e não apenas de suas delimitações anatômicas.

Imagens que fornecem informações fisiológicas sobre um determinado órgão ou sobre o organismo em si podem ser adquiridas por meio do decaimento de radioisótopos ligados a moléculas com propriedades biológicas conhecidas, ou seja, podem ser adquiridas utilizando-se radiofármacos (OLLINGER; FESSLER, 1997).

Num exame PET típico, o radiofármaco é injetado por via intravenosa e são fornecidos dados sobre a concentração de radiofármacos nos tecidos e sobre os órgãos marcados ao longo do tempo. Estes dados são combinados com uma

estimativa do tempo da concentração plasmática do radiofármaco, o que representa a sua absorção pelo tecido, e são processados com um modelo compartimental contendo equações que descrevem os processos de transporte e reação que o radiofármaco sofre (PHELPS, 2000; RAICHLE, 1983).

Com relação à aquisição de imagens por meio da PET, existem vários protocolos internacionalmente estabelecidos. Antes da aquisição das imagens, são realizados diariamente testes de controle da qualidade, como os de transmissão, emissão e scan de referência. Após a administração de radiofármacos marcados com flúor 18, espera-se entre 30-60 minutos para que o radiofármaco se acumule nos órgãos de interesse e se dê o início do exame, que pode durar entre 20 a 45 minutos, dependendo da estatura do paciente e do aparelho utilizado (BASU et al., 2011).

Em regiões como o tórax e o abdômen, a demonstração do aumento da captação de alguns radiofármacos em imagens PET é limitada. Isto devido ao fato de que, por serem regiões complexas e com muitos órgãos, não é possível obter uma localização exata da captação do radiofármaco para uma estrutura específica, por exemplo, com a precisão de que um tumor seria visto numa imagem de CT. Teoricamente, é possível fazer o alinhamento post-hoc de imagens obtidas separadamente com o scanner PET e com o scanner CT, o que é uma técnica difícil devido ao deslocamento da posição dos órgãos, que pode ocorrer com o movimento do paciente e pode até depender da curvatura dos leitos dos scanners (KINAHAN et al., 1998).

Para resolver a problemática da dificuldade das imagens PET em mostrar a localização real dos radiofármacos absorvidos, um único tomógrafo com a capacidade de adquirir imagens PET e CT anatômicas foi desenvolvido com colaboração entre a Universidade de Pittsburgh e a Siemens. O objetivo do tomógrafo em questão foi originar um equipamento para imagens oncológicas que forneça imagens anatômicas e funcionais corretamente alinhadas (KINAHAN et al., 1998; OLLINGER; FESSLER, 1997).

Só por volta de 2001 o primeiro scanner PET/CT foi utilizado clinicamente, aumentando a acurácia na detecção de patologias. A junção da CT ao PET, além de fornecer informações anatômicas, também permite a correção da atenuação dos fótons que são absorvidos pelo corpo do paciente. Ou seja, as imagens adquiridas por PET/CT fornecem informações mais exatas sobre a localização dos

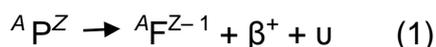
radiofármacos até mesmo em áreas mais profundas do corpo do paciente (ELSINGA, 2012; OLLINGER; FESSLER, 1997; BASU et al., 2011; SCOTT; HOCKLEY, 2012).

Logo, o PET/CT, desde sua criação, tornou-se um importante método de imagem para diagnóstico. Ao longo dos anos e à descoberta de novos radiofármacos e às novas técnicas de reconstrução de imagens, o PET vem se tornando um método robusto e exato utilizado no mundo todo, fornecendo informações cada vez mais exatas e precoces acerca de diversas patologias, principalmente o câncer.

### 2.2.1 Emissores de pósitrons, interação e decaimento $\beta$

Um nuclídeo é um elemento químico caracterizado por seus números de massa ( $A$ ) e atômico ( $Z$ ), no qual a estabilidade é determinada pelo número de nêutrons e prótons. Uma vez que a relação próton/nêutron varia, o nuclídeo se torna instável, ou seja, se torna um radionuclídeo (ou radioisótopo). O radionuclídeo é a parte responsável pela radiação presente nos radiofármacos que pode voltar à estabilidade por meio da emissão de radiação ionizante na forma de partículas alfa ( $\alpha$ ), pósitrons ( $\beta^+$ ), elétrons ( $\beta^-$ ), e elétrons Auger, ou na forma de radiação eletromagnética (raios X ou  $\gamma$ ) (CEMBER; JOHNSON, 2009).

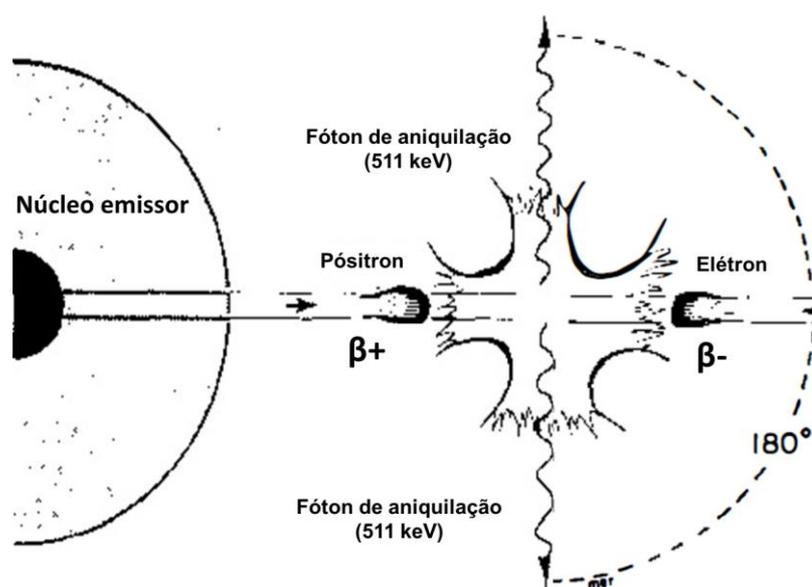
Os radionuclídeos com excesso de prótons comparado ao número de nêutrons podem se estabilizar emitindo pósitrons por meio de dois processos: emissão de pósitrons (decaimento  $\beta^+$ ) ou de captura eletrônica (EC). Como esquematizado na equação 1, no decaimento  $\beta^+$ , o radionuclídeo pai transforma o próton excedente em um nêutron, emitindo uma partícula  $\beta^+$  e um neutrino ( $\nu$ ) (TURNER, 2007):



O pósitron é a antipartícula do elétron, tendo a mesma massa, porém com carga positiva. O pósitron emitido percorre pequenas distâncias até ser freado ao interagir com as nuvens de elétrons presentes no meio (Figura 1). O que determina a distância percorrida pelo pósitron, ou *range*, é a sua energia e a densidade das nuvens de elétrons presentes na matéria (BASU et al., 2011).

Poucos são os elementos químicos que emitem naturalmente pósitrons. O  $^{40}\text{K}$  é um exemplo de emissor natural de pósitrons, comum na superfície terrestre e que possui meia-vida em torno de  $1,251 \times 10^9$  anos (NOYES et al., 1977). Entretanto, a maioria dos radionuclídeos emissores de pósitrons precisam ser sintetizados em aceleradores de partículas do tipo cíclotron.

**Figura 1 – Esquema da emissão, interação e aniquilação dos pósitrons emitidos por decaimento  $\beta^+$ .**



Fonte: modificado de Raichle, 1983.

Os cíclotrons foram inicialmente construídos por volta de 1930, o que tornou possível a produção de radioisótopos em quantidades abundantes para seus usos em medicina e indústria. Alguns cíclotrons são dedicados à produção de um único radionuclídeo, como exemplo o  $^{18}\text{F}$  ou  $^{15}\text{O}$  (IAEA, 2008). Existe também uma variedade de cíclotrons dedicados à produção de mais de um radioisótopo, como exemplo o cíclotron de 500 MeV, localizado no Laboratório Nacional do Canadá para Física de Partículas Nucleares e Ciência Baseada em Aceleradores (TRIUMF), e que produz vários tipos de radionuclídeos (IAEA, 2009). A tabela 1 mostra os principais radionuclídeos produzidos por cíclotrons e utilizados em exames PET. A tabela mostra também seus tempos de meia-vida e a energia de aceleração necessária para que o radionuclídeo seja sintetizado no cíclotron.

Existem vários exemplos de usos dos radionuclídeos produzidos em cíclotrons em medicina, biologia e diversas áreas de pesquisa, embora as aplicações médicas representem a maior percentagem de uso destes radionuclídeos, principalmente como radiotraçadores. Utilizar átomos radioativos como traçador para determinar como esses átomos migram durante as reações químicas e processos biológicos se tornou um método específico e bastante utilizado para investigação de processos e patologias.

**Tabela 1 – Emissores de pósitron cíclotron-produzidos utilizados em PET e suas principais características**

<b>Radionuclídeo</b>	<b>Meia-vida (T<sub>1/2</sub>) em minutos</b>	<b>Energia de aceleração para produção no cíclotron.</b>
<sup>15</sup> O	2,03	11-26 MeV
<sup>13</sup> N	10	11-19 MeV
<sup>11</sup> C	20,03	11-17 MeV
<sup>18</sup> F	109,08	8-17 MeV

Fonte: modificado de IAEA, 2008.

Atualmente o radionuclídeo mais utilizado em radiofármacos para diagnóstico na PET é o <sup>18</sup>F. Devido a sua meia-vida relativamente longa quando comparada aos outros radionuclídeos, o <sup>18</sup>F permite sínteses mais longas. Esta meia-vida permite também que o radiofármaco possa ser levado do local de síntese até o local do exame (ELSINGA, 2012).

O <sup>18</sup>F é sintetizado pelo bombardeamento de água enriquecida com <sup>18</sup>O por prótons acelerados, em cíclotrons. Posteriormente à síntese, o <sup>18</sup>F é removido da mistura aquosa por meio de colunas de troca aniônica, onde apenas ele ficará retido. Para eluição do <sup>18</sup>F é utilizada solução de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) catalisadores como o Kryptofix ou tetrabutylamônio (TBA). Tal eluição é necessária para que qualquer resíduo de água seja retirado, o que garante a redução das pontes de hidrogênio e, conseqüentemente, a reatividade do <sup>18</sup>F (YU, 2006).

O <sup>18</sup>F pode ser incorporado a moléculas por meio de reações de substituição eletrofílica ou substituição nucleofílica. Destes dois modos de síntese, as reações de substituição nucleofílica são as mais utilizadas mundialmente, originando radiofármacos.

### 2.2.2 Radiofármacos PET

Atualmente, diversos ramos da ciência podem empregar a PET em seus estudos, utilizando radiofármacos, o que possibilita a necessidade pela descoberta de novos radiotraçadores e a análise de dados mais sofisticada. A maioria dos radiofármacos são preparações constituídas por duas estruturas: um fármaco e um radionuclídeo. O radionuclídeo será responsável pela radiação, já o fármaco será o determinante do comportamento biológico e da biodistribuição do radiofármaco (KOWALSKY; FALEN, 2004; TEWSON; KROHN, 1998).

Estas preparações farmacológicas, em PET servem a duas funções principais. A primeira função é a utilização de radiofármacos de forma que a preparação radiomarcada é administrada a um paciente e algum processo patológico ou bioquímico anormal leva a uma distribuição anormal da preparação, o que torna o radiofármaco um traçador de patologias. A segunda função principal dos radiofármacos é, devido a sua taxa de tempo de biodistribuição no organismo, tornar possível a quantificação e a dedução do dano fisiológico ou patológico (BALLINGER et al., 2008; BURGER et al., 2012; TEWSON; KROHN 1998).

Pode-se pensar que todos radiofármacos possuem ação farmacológica no organismo, o que é um equívoco. Devido ao fato dos radiofármacos para diagnóstico serem utilizados em quantidades pequenas para servirem apenas como marcadores, não existe uma relação dose-resposta com os radiofármacos PET, ao contrário do que concerne aos fármacos convencionais (THEOBALD, 2011).

Os radiofármacos PET, para atingirem seus objetivos diagnósticos, precisam possuir afinidade por determinados órgãos ou tumores. Isto garante a especificidade do radiofármaco à estrutura que se deseja analisar, conseqüentemente também garante a boa qualidade do exame diagnóstico. Esta afinidade é, em grande parte dos casos, oferecida pelo componente farmacológico ligado ao radioisótopo. Quando depositado em um órgão específico ou em tumores, os radioisótopos instáveis presentes nos radiofármacos PET tentam se estabilizar emitindo radiação ionizante, o que ocorre por meio da emissão de pósitrons (BALLINGER et al., 2012).

### 2.2.3 $^{18}\text{F}$ FDG: visão geral, síntese, aplicações e limitações

Atualmente um dos radiofármacos mais utilizados para fins diagnósticos em PET é o  $^{18}\text{F}$ FDG, ou  $^{18}\text{F}$ -Fludesoxiglicose, que consiste numa molécula de glicose marcada com flúor radioativo ( $^{18}\text{F}$ ). O  $^{18}\text{F}$ FDG foi sintetizado inicialmente com a finalidade de observar o metabolismo glicolítico cerebral, o que se expandiu para estudos sobre tumores (WELCH, 2003). O  $^{18}\text{F}$ FDG possibilita não só a detecção primária dos tumores, como também o estadiamento, a detecção de metástases e o acompanhamento da terapia anticâncer (KOSTAKOGLU et al., 2003).

O  $^{18}\text{F}$ FDG funciona como um análogo da glicose, utilizada em maior quantidade por células tumorais do que por células normais, pois o tumor apresenta alta taxa proliferativa, precisando de muita energia para sintetizar estruturas para se expandir, o que aumenta sua taxa de metabolismo glicolítico. O chamado “Efeito Warburg”, predominante em células tumorais, é conhecido como responsável pelos aumentos proliferativo e glicolítico dos tumores, bem como o aumento do potencial maligno tumoral (HEIDEN et al., 2009).

Para serem sintetizados, tanto o  $^{18}\text{F}$ FDG quanto outros radiofármacos de mesma complexidade, precisam passar por processos de radiomarcagem que, como o nome sugere, consiste em adicionar o radioisótopo à estrutura do fármaco. O tipo de radiomarcagem depende de qual radionuclídeo está sendo empregado e das propriedades químicas do fármaco que será marcado (ROBILLOTTA, 2006).

Os processos de radiomarcagem e síntese são feitos, geralmente, em equipamentos automatizados conhecidos como módulos de síntese. Os módulos automatizados garantem uma menor dose de exposição ocupacional, maior reprodutibilidade das reações de síntese, a redução do tempo total de síntese e a definição de protocolos com todas etapas exatas a serem seguidas (IAEA, 2012; WELCH, 2003).

Após todo processo de síntese, é necessário assegurar a qualidade do  $^{18}\text{F}$ FDG produzido para que, assim, ele possa ser distribuído e utilizado em diagnóstico. Atualmente as farmacopeias Americana (USP) e Europeia (European Pharmacopoeia, EP) são as utilizadas em radiofarmácia para estabelecer os testes de controle da qualidade para assegurar que o  $^{18}\text{F}$ FDG sintetizado esteja dentro dos padrões aceitáveis.

Os testes estabelecidos pelas USP e EP para atestar a qualidade das amostras de  $^{18}\text{F}$ FDG são: identidade radionuclídica, identidade e pureza radioquímica, pureza química (solventes residuais e residual de Kryptofix), pH, esterilidade e endotoxinas bacterianas (EP, 2013; USP, 2008; YU et al., 2006).

Uma das limitações do  $^{18}\text{F}$ FDG é o fato de que células que possuem, naturalmente, metabolismo glicolítico alto e precisam de altas taxas de glicose (como exemplo as células cerebrais e as miocárdicas) podem ser confundidas com células tumorais, pois o  $^{18}\text{F}$ FDG se liga às células citadas e mimetiza a ocorrência de um tumor (ROBILLOTA, 2006; SAHA, 2008). Além disso, processos inflamatórios ou infecciosos podem ser confundidos com tumores quando se utiliza deste radiofármaco. O  $^{18}\text{F}$ FDG não é útil na detecção de tumores que não apresentam metabolismo glicolítico alterado, como exemplo o câncer de próstata (GROOVES et al., 2007; MENEZES et al., 2009).

A absorção de  $^{18}\text{F}$ FDG em doenças granulomatosas, inflamação, processos de reparação pós-terapêutica, músculos, lesões fibroticamente ativas e tecido adiposo marrom pode levar potencialmente a resultados falsos positivos (LIND et al., 2004).

Além disso, casos envolvendo massas metastáticas de carcinoma de células renais, nódulos de pulmão metastáticos de neoplasia extrapulmonar, carcinomas broncoalveolares e alguns carcinomas de mama ductais e lobulares invasivos já foram investigados com  $^{18}\text{F}$ FDG, sendo sinalizados como casos falso negativos (BERGER et al., 2000; KIM et al., 1998; MONTRAVERS et al., 2000; AVRIL et al., 2000).

Para vencer as limitações do  $^{18}\text{F}$ FDG, diversos novos radiofármacos vêm sendo sintetizados e descobertos. Dentre estes se destaca o  $^{18}\text{F}$ FLT, ou fluoro-desoxitimidina, que será profundamente abordado neste trabalho, e é um radiofármaco que se liga preferencialmente a células neoplásicas com alta taxa de proliferação, com captação muito baixa em células normais (KOSTAKOGLU et al., 2003; ROBILLOTA, 2006; SAHA et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

### 2.3 $^{18}\text{F}$ FLT

O  $^{18}\text{F}$ FLT, ou 3'-fluoro-desoxitimidina, é um novo radiofármaco que vem sendo investigado como traçador da proliferação celular. Isso porque o  $^{18}\text{F}$ FLT é um análogo

da timidina, a qual é transformada em nucleotídeos dentro das células, possibilitando a proliferação destas. Logo, nas células tumorais, a captação do  $^{18}\text{F}$ FLT é maior do que em células normais, o que possibilita a detecção de tumores com alta taxa de proliferação, permitindo também a distinção entre áreas em funcionamento normal, como o cérebro, das áreas tumorais. O radiofármaco em questão já é difundido na literatura e se apresenta como inovador no meio diagnóstico (ZHANG et al., 2012).

### 2.3.1 Histórico

O FLT foi originalmente sintetizado como um agente antineoplásico e antirretroviral, e, conceitualmente, é semelhante à azidotimidina, o primeiro agente anti-HIV estudado. Um análogo não radioativo da timidina, o [ $^{19}\text{F}$ ]3-fluoro-3-desoxitimidina ( $^{19}\text{F}$ FLT) foi sintetizado por volta de 1969 com a função de agente antitumoral (LANGEN et al., 1969). Logo em seguida, o  $^{18}\text{F}$ -FLT foi sintetizado depois que pesquisadores descobriram as propriedades anti-HIV da azidotimidina. Nos ensaios iniciais, realizando-se testes em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida na fase I da doença, verificou-se que o  $^{18}\text{F}$ -FLT ofereceu alta toxicidade a doses clinicamente úteis, o que inviabilizou seu uso terapêutico (FLEXNER et al., 1994).

Posteriormente, estudos farmacológicos do  $^{18}\text{F}$ FLT evidenciaram que este poderia ser administrado com segurança em doses utilizadas em PET. Estudos pilotos com  $^{18}\text{F}$ FLT em animais e pacientes demonstraram que, se utilizado como marcador, o  $^{18}\text{F}$ FLT produz imagens de alto contraste nas áreas de tumores e de tecidos em proliferação (SHIELDS et al., 1998; VESSELLE et al., 2002).

Após a descoberta de que  $^{18}\text{F}$ FLT foi capaz de sinalizar tumores e outros tecidos com alta taxa de proliferação, sua aplicação em PET se ampliou e gerou vários outros estudos acerca das propriedades, da síntese, da especificidade e da capacidade de detecção tumoral. A partir de tais estudos diversos trabalhos foram publicados, o que fortaleceu a importância do  $^{18}\text{F}$ FLT como um radiofármaco mais específico para detecção e distinção entre tumores e tecidos normais (BEEN et al., 2004; SHIELDS et al., 1998; SHIELDS, 2003; VESSELLE et al., 2012).

Recentemente, estudos realizados no Brasil avaliaram e validaram a síntese, a qualidade e ensaios de viabilidade metabólica e toxicidade clonogênica em amostras de  $^{18}\text{F}$ FLT (NASCIMENTO, 2014; ZANETTE, 2013). Tais estudos reforçam

a necessidade de expansão da síntese e da utilização de  $^{18}\text{FLT}$  em exames PET, o que pode vir a fornecer maiores sensibilidade e especificidade na detecção e acompanhamento de tumores.

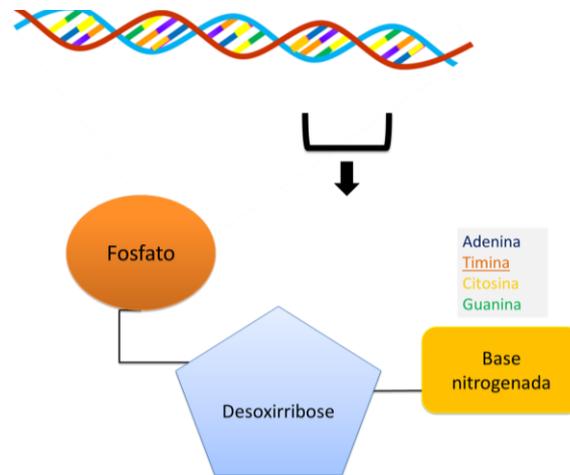
Por ser análogo à timidina, um tipo de nucleosídeo, o  $^{18}\text{FLT}$  é internalizado nas células por transportadores de nucleosídeos, é fosforilado e acumula-se no meio intracelular. Este processo será abordado a seguir para que se possa entender os mecanismos de ação que tornam o  $^{18}\text{FLT}$  um ótimo marcador de processos proliferativos e um radiofármaco promissor para detecção e estadiamento de tumores, bem como promissor também no acompanhamento da terapia antitumoral.

Com relação à farmacocinética de  $^{18}\text{FLT}$ , já se sabe que este radiofármaco fica acumulado em órgãos que possuem alta taxa de proliferação, como a medula óssea. Parte da atividade de  $^{18}\text{FLT}$  fica retida no fígado, onde este passa por processos de glicuronidação, de forma que o  $^{18}\text{FLT}$  ligado ao glicuronídeo representa 25% da atividade total no plasma após 60 minutos da administração, o que torna o  $^{18}\text{FLT}$  mais hidrossolúvel. A eliminação de  $^{18}\text{FLT}$  é predominantemente renal (BADING; SHIELDS, 2008).

### **2.3.2 Síntese, degradação e acúmulo de nucleotídeos**

O DNA ou ADN (ácido desoxirribonucleico) é a molécula orgânica chave da maioria dos seres vivos, e que contém instruções genéticas para coordenar o funcionamento e desenvolvimento de todas as células. Como esquematizado na Figura 2, o DNA é composto de nucleotídeos, que são diversas estruturas ligadas entre si. Os nucleotídeos citados são polímeros compostos por uma molécula de açúcar contendo cinco carbonos (pentoses), um grupo fosfato (ácido fosfórico) e uma base nitrogenada.

**Figura 2 – Esquemática da estrutura do DNA e de um nucleotídeo.**



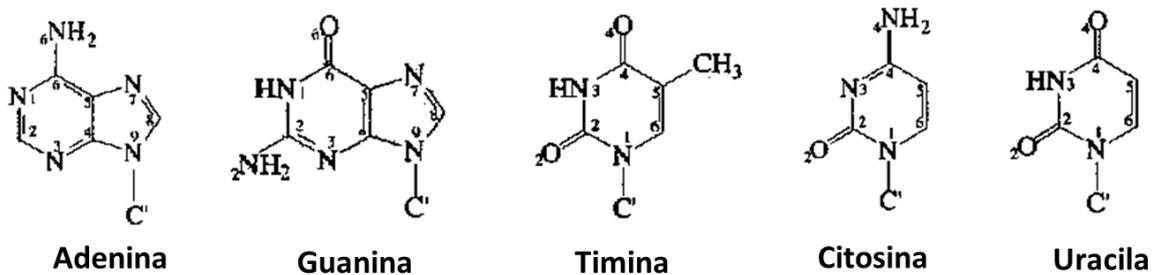
As bases nitrogenadas podem ser púricas (adenina e guanina) ou pirimidínicas (citosina ou timina). Destas quatro bases nitrogenadas, só a timina não constitui o RNA (ácido desoxirribonucleico), o que torna esta base um marcador útil para estudos sobre o DNA. Quando uma base nitrogenada está ligada apenas ao açúcar, sem o grupo fosfato, origina-se um nucleosídeo que, dentro da célula, poderá ser fosforilado e originar um nucleotídeo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; PIERCE, 2004). As bases purínicas e pirimidínicas são esquematizadas na Figura 3, sendo a uracila constituinte apenas do RNA. Observa-se que as púricas são constituídas quimicamente por um anel de seis lados ligado a um anel de cinco lados. Já as pirimidínicas são formadas apenas por um anel de seis lados. O grupamento fosfato constitui num átomo de fósforo ligado a quatro átomos de oxigênio, o qual, devido à sua carga negativa, confere acidez às moléculas de DNA e RNA (CLOWNEY et al., 1996; PIERCE, 2004).

Para originar as moléculas de DNA, os nucleotídeos ligam-se entre si por meio de ligações fosfodiéster, que são ligações fortes, do tipo covalente. Ao fim da junção de vários nucleotídeos, são formados polinucleotídeos e, por fim, a molécula de DNA ou RNA (PIERCE, 2004).

A síntese de nucleosídeos pode ser feita por duas vias distintas. A primeira é a via *de novo*, que produz os nucleosídeos a partir de amônia, ribose, gás carbônico e aminoácidos. A segunda é a via de recuperação, que recicla as bases

nitrogenadas livres e os nucleosídeos, ambos resultantes do metabolismo dos ácidos nucleicos (PIERCE, 2004).

**Figura 3 – Bases nitrogenadas. Purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina, citosina e uracila), respectivamente.**



Fonte: modificado de CLOWNEY et al., 1996.

Na biossíntese das pirimidinas utiliza-se o aminoácido ácido aspártico para a síntese dos anéis pirimidínicos. Na via *de novo*, seis reações de biossíntese são realizadas, dando origem à uridina monofosfato (UMP), que originará uridina trifosfato (UTP), citidina trifosfato (CTP) e timidina monofosfato (TMP), respectivamente. Na via de recuperação ocorre a presença da família das enzimas timidina quinase (TK). Estas enzimas fosforilam a timidina que foi obtida de fontes externas, para produzir timidina monofosfato (VOET; VOET, 2006).

As timidina quinase (TK) estão presentes nas células de mamíferos em duas configurações: TK1 e TK2. A TK1 é classificada como uma enzima altamente envolvida na proliferação celular, praticamente sem atividade nas células quiescentes, e abundantemente ativa nas células em proliferação, principalmente no final da fase G1 e durante a fase S do ciclo celular, o que está relacionado à alta taxa de síntese do DNA. Já é conhecido na literatura que a TK1 é a responsável por transformar timidina em timidina monofosfato, utilizando ATP, para em seguida originar a timidina trifosfato. A TK2 está presente em taxas constantes na mitocôndria durante todo ciclo celular (BADING; SHIELDS, 2008).

Dentro das células, os nucleosídeos são fosforilados e se tornam nucleotídeos. Para entrar na célula, os nucleosídeos podem se difundir pela membrana celular, pois são hidrofílicos e, neste caso, não precisam de transportadores intracelulares. Porém, apesar da hidrofiliçidade dos nucleosídeos, ao longo da evolução as células adquiriram mecanismos de transporte e absorção

de nucleosídeos. Atualmente existem duas classes de transportadores de nucleosídeos: a classe equilibrativa (ENT) e a concentrativa (CNT) (KONG et al., 2004).

Da família dos transportadores equilibrativos (ENT) já são conhecidos quatro subtipos principais: ENT 1 humano (hENT1) que transporta nucleosídeos purínicos e pirimidínicos; ENT 2 humano (hENT2), que além dos nucleosídeos também transporta bases nitrogenadas para a célula; ENT 3 humano (hENT3) que é pH dependente; e o ENT 4 humano (hENT4), que também é pH dependente e se localiza no cérebro e no coração (KONG et al., 2004).

Os transportadores concentrativos fazem o transporte ativo dos nucleosídeos por meio do gradiente de sódio e potássio, apresentando seletividade entre nucleosídeos purínicos e pirimidínicos. Desta família já foram identificados três subtipos humanos: hCNT1, que transporta nucleosídeos pirimidínicos com alta afinidade; hCNT2, que transporta predominantemente uridina e nucleosídeos purínicos; hCNT3, que transporta tanto nucleosídeos purínicos quanto pirimidínicos (KONG et al., 2004; PAPROSKI et al., 2010).

### **2.3.3 Mecanismo de absorção de $^{18}\text{FLT}$**

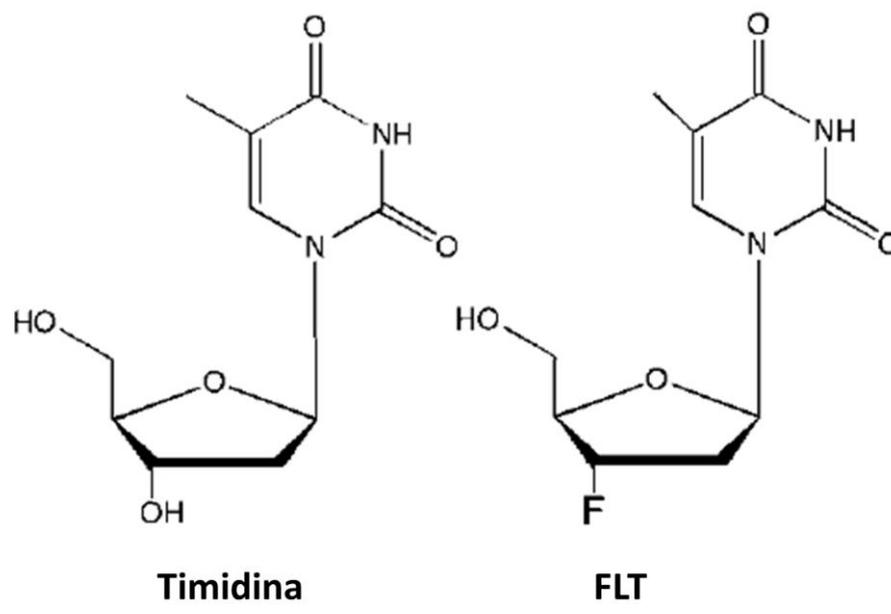
Conhecendo-se os transportadores de nucleosídeos, diferentes estudos buscaram sintetizar análogos destes nucleosídeos com a finalidade de analisar processos metabólicos e até mesmo com a finalidade terapêutica contra certos tipos de patologia, principalmente os tumores. O  $^{18}\text{FLT}$  é um análogo do nucleosídeo timidina e vem sendo utilizado como ferramenta diagnóstica.

Na Figura 4 observa-se a similaridade entre a molécula de timidina e o  $^{18}\text{FLT}$ . Pode-se notar que a única diferença entre as duas moléculas é a presença do átomo de flúor 18 radioativo ( $^{18}\text{F}$ ), no carbono 3 da ribose, ao invés do grupo hidroxila (SHIELDS, 2003). Logo, devido a esta semelhança, o  $^{18}\text{FLT}$ , estimulado pelo mecanismo de reparação celular ou pela via de recuperação, atravessa a membrana celular mediado pelos transportadores de pirimidinas (hENT1, hENT2, hCNT1 e hCNT3), sendo o hENT1 o mais requerido no processo (PAPROSKI et al., 2010).

Como esquematizado na Figura 5, dentro da célula, a molécula de  $^{18}\text{FLT}$ , mediada pela família de enzimas TK, reage com grupos fosfato, originando monofosfato de  $^{18}\text{FLT}$  ( $^{18}\text{FLT-MP}$ ), difosfato de  $^{18}\text{FLT}$  ( $^{18}\text{FLT-DP}$ ) e trifosfato de

$^{18}\text{FLT}$  ( $^{18}\text{FLT-TP}$ ). Devido à substituição da hidroxila que existia no carbono 3, a molécula de  $^{18}\text{FLT}$  não é incorporada às moléculas de DNA e se torna resistente à degradação, acumulando-se intracelularmente. Foi visto que, em certas espécies de mamíferos, o  $^{18}\text{FLT}$  é excretado na urina, sem alterações em sua estrutura. Em humanos, foi verificado que 2 horas após administração, 50% do  $^{18}\text{FLT}$  encontra-se no sangue em formato de glicuronídeo, após metabolização pelo fígado. Por sofrer metabolização no fígado, as imagens PET de tumores hepáticos obtidas com  $^{18}\text{FLT}$  ficam comprometidas (BEEN et al., 2004; PAPROSKI et al., 2010; SHIELDS et al., 2005).

**Figura 4 – Nucleosídeo timidina e seu análogo,  $^{18}\text{FLT}$ .**

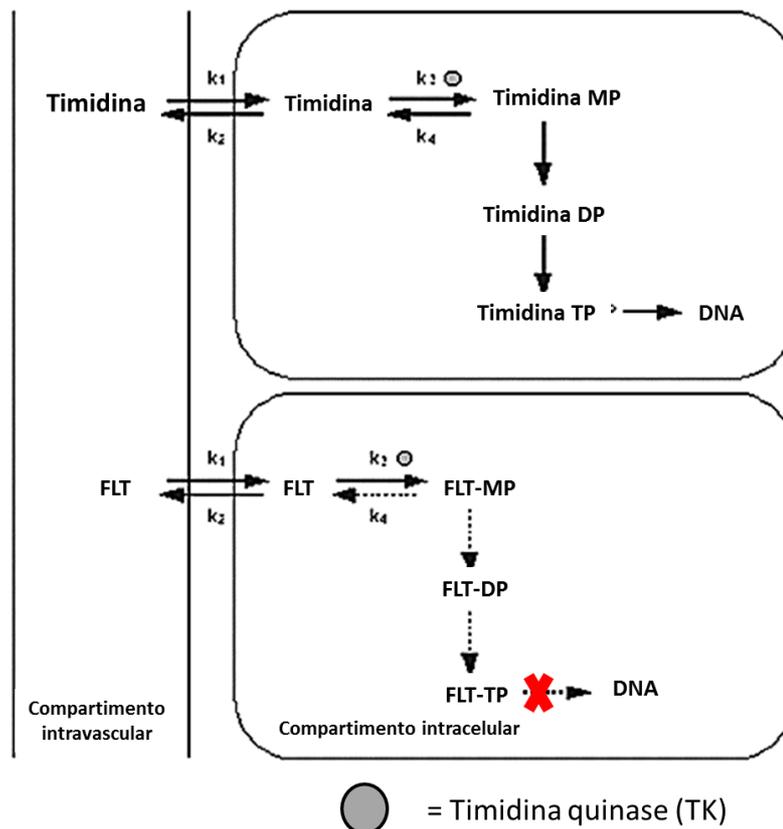


Fonte: modificado de SHIELDS, 2003.

Portanto, pode-se perceber que a utilização de  $^{18}\text{FLT}$  na aquisição de imagens PET diagnósticas depende da quantidade e do tipo de transportador de nucleosídeos presente nas células, da atividade da enzima TK1, bem como da competição da timidina endógena, da taxa de reparo celular e do catabolismo dos nucleotídeos endógenos. A quantidade endógena de timidina, derivada da via de recuperação, da via *de novo*, ou da alimentação é um dos parâmetros que afeta

diretamente a absorção do  $^{18}\text{F}$ FLT e, conseqüentemente, pode vir a afetar a qualidade dos exames PET.

**Figura 5 – Metabolismo celular da timidina e de seu análogo  $^{18}\text{F}$ FLT.**



Fonte: modificado de BEEN et al., 2004.

#### 2.3.4 Síntese do $^{18}\text{F}$ FLT e métodos de marcação

Pode-se dizer que a produção de radiofármacos contendo  $^{18}\text{F}$  consiste de seis etapas básicas: a produção do emissor de pósitrons ( $^{18}\text{F}$ ), purificação do emissor, secagem, marcação do emissor com o precursor, retirada dos grupos protetores, purificação e formulação do radiofármaco.

A etapa de purificação do radiofármaco pode ser realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e/ou por cartuchos compactados de purificação, do tipo Sep-Pak<sup>®</sup>. O tipo de precursor, sua concentração, a temperatura e o tempo de

síntese, o grau de evaporação da acetonitrila, o tipo de eluente e a possível adição de solventes alcóolicos ao precursor influenciam diretamente no rendimento radioquímico da síntese (OH et al., 2004).

Por se tratar de um novo radiofármaco, ainda são realizados estudos buscando a otimização do processo de radiomarcagem do  $^{18}\text{FLT}$ . Atualmente existem três diferentes rotas de marcação química do  $^{18}\text{F}$  para originar  $^{18}\text{FLT}$ : o método de Grierson, o método de Machulla e o método utilizando o precursor BOC nosil, o qual será empregado neste trabalho (BEEN et al., 2004).

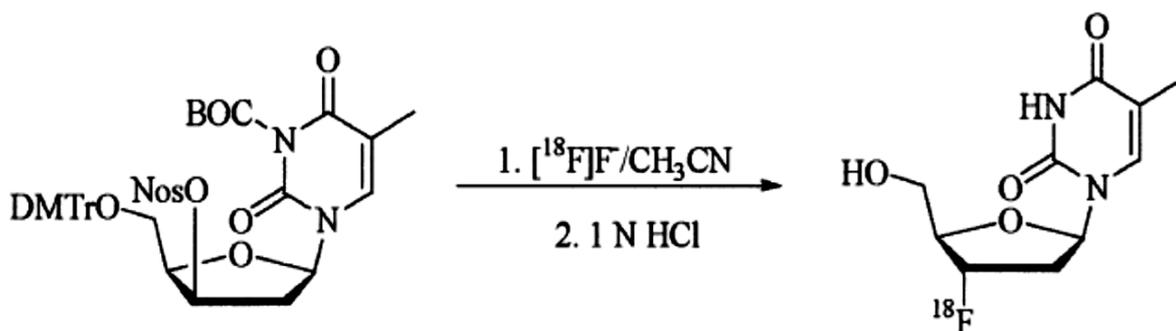
O método de Grierson foi o primeiro a ser publicado, onde foi utilizado nosilato como precursor. Por este método, o precursor, protegido na posição 5'-O e na posição N com 4,4'-dimetoxitritil e dimetoxibenzil, respectivamente, é preparado em sete passos de reação a partir de L-timidina. Após à fluoração nucleofílica ( $100^{\circ}\text{C}$ , 10 min), os grupos protetores são extraídos por oxidação com nitrato amônio cério (CAN). Neste modo de síntese, foram relatados rendimentos radioquímicos corrigidos de 13%, com um tempo de síntese de 100 minutos. Uma grande desvantagem deste primeiro método foi o aparecimento de precipitados após a oxidação do CAN, o que originou problemas de automatização e perdas de radioatividade no passo de filtração dos precipitados. Outros grupos de pesquisa substituíram o grupo protetor N-dimetoxibenzil para um grupo N-BOC, permitindo a desproteção fácil com ácido clorídrico, evitando a formação de precipitados. Em seguida, a rota de Grierson pôde facilmente ser automatizada com um módulo de síntese comercialmente disponível, oferecendo rendimentos radioquímicos de 11,5%, utilizando 10 mg de precursor e 33% com 40 mg de precursor. O tempo total de síntese foi reduzido para 40 minutos (GRIERSON; SHIELDS, 2000; MARTIN et al., 2002; YUN et al., 2003).

O método de Machulla para síntese de  $^{18}\text{FLT}$  foi publicado em 2000, alguns meses após a primeira publicação de Grierson e Shields. Neste estudo, dois novos tipos de precursor foram utilizados: anidrotimidina e a anidrotimidina protegida com o grupo dimetoxitritil (DMTr). Utilizando apenas anidrotimidina como precursora e condições de fluoração com temperatura  $130^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, foi relatado um rendimento radioquímico de 5,3%. Para anidrotimidina protegida com DMTr, o rendimento radioquímico foi de 14,3% utilizando a temperatura  $160^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguido de desproteção com HCl. Embora os rendimentos radioquímicos sejam relativamente baixos em comparação com a síntese envolvendo nosilato, muitos

grupos de estudo ainda utilizam este método, principalmente com anidrotimidina protegida com DMTr como precursor (BEEN et al., 2004; MACHULLA et al., 2000).

A marcação do  $^{18}\text{F}$  pelo método do precursor BOC nosil pode ser feita em módulos automatizados de síntese e ocorre logo após a secagem do fluoreto com acetonitrila, em frasco reator. Tendo ocorrido completa secagem, o precursor BOC nosil é adicionado ao frasco contendo fluoreto, o que inicia a reação de marcação. Sob aquecimento a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 5 minutos e na presença do catalisador Kryptofix ou  $\text{TBAHCO}_3$ , o  $^{18}\text{F}$  se agrega ao carbono 3 da ribose e desloca o grupo nosil, num processo denominado substituição nucleofílica. Após fluoração, o precursor BOC sofre hidrólise ácida com  $\text{HCl}$  1N, em meio aquecido aproximadamente por  $85\text{ }^\circ\text{C}$ . Assim, os grupos protetores BOC e dimetoxitritil (DMTr) são retirados da molécula, dando origem ao  $^{18}\text{FLT}$ . O processo simplificado da síntese do  $^{18}\text{FLT}$  por este método é esquematizado na Figura 6 (OH et al., 2004). Por ser reportada na literatura como uma das rotas de síntese com maior rendimento, quando utilizados módulos automatizados de síntese, esta foi a rota de síntese de  $^{18}\text{FLT}$  empregada neste trabalho (MARTIN et al, 2002; OH et al, 2003).

Figura 6 – Reação simplificada de síntese do  $^{18}\text{FLT}$ .



Fonte: modificado de OH et al, 2004.

Em seguida, o  $^{18}\text{FLT}$  segue para o processo de purificação, seja por cartuchos compactados contendo colunas de purificação, ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao módulo de síntese. Após a purificação, são realizados testes de controle de qualidade nas amostras de  $^{18}\text{FLT}$  produzidas, os quais serão mostrados neste trabalho.

### 2.3.5 Vantagens do $^{18}\text{FLT}$ sobre o $^{18}\text{FDG}$

Após o surgimento da possibilidade de investigar tumores com  $^{18}\text{FLT}$ , diversos estudos foram publicados e muitos outros vêm sendo desenvolvidos. Em 2003, Buck et al. utilizaram imagens PET produzidas com  $^{18}\text{FLT}$  e  $^{18}\text{FDG}$  para investigar a proliferação tumoral do câncer de células pequenas do pulmão. Comparando as imagens para os dois diferentes radiofármacos, foi possível concluir que a captação de  $^{18}\text{FLT}$  se correlacionou melhor à proliferação de tumores pulmonares do que a captação do  $^{18}\text{FDG}$ , o que mostrou que o  $^{18}\text{FLT}$  pode ser mais útil como um biomarcador seletivo para a proliferação tumoral (BUCK et al., 2003). Em outro estudo, Herrmann e colaboradores estudaram diferenças entre  $^{18}\text{FLT}$  e  $^{18}\text{FDG}$  na detecção de tumores pancreáticos. No estudo foi possível perceber que, nas imagens com  $^{18}\text{FLT}$ , foi obtida maior especificidade na detecção dos tumores (HERRMANN et al., 2012).

O  $^{18}\text{FLT}$  também se mostrou mais útil do que o  $^{18}\text{FDG}$  no acompanhamento da terapia anticâncer. Estudando células derivadas de carcinoma epidermóide esofágico humano com alta taxa de proliferação, pode-se verificar que, dependendo da droga citostática utilizada, o  $^{18}\text{FLT}$  apresentava alterações específicas na sua taxa de absorção, o que não ocorreu com  $^{18}\text{FDG}$ . Este modo específico da captação de  $^{18}\text{FLT}$  dependente da quimioterapia utilizada deve ser levado em conta nos estudos PET usando  $^{18}\text{FLT}$  para o monitoramento do tratamento (DITTMANN et al., 2002).

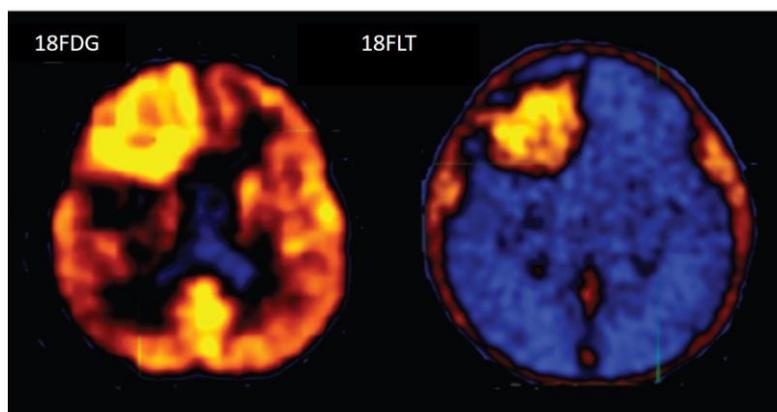
Outro estudo também reforçou a importância do  $^{18}\text{FLT}$  no acompanhamento do tratamento anticâncer. Utilizando experimentos *in vivo* com camundongos portadores de câncer de células escamosas, foi possível reforçar a ideia de que o  $^{18}\text{FLT}$  pode ser utilizado para monitorar a resposta à radioterapia externa. Isto abre possibilidades de futuros estudos clínicos adicionais para comparar as propriedades do  $^{18}\text{FLT}$  a diversos outros marcadores (MOLTHOFF et al., 2007).

Barthel e colaboradores, em 2003, puderam observar que, entre o  $^{18}\text{FLT}$  e o  $^{18}\text{FDG}$ , o primeiro mostrou maior captação no sangue, plasma, fígado, rins e intestino delgado e uma menor captação no cérebro, medula espinhal, coração e músculo, áreas onde o diagnóstico com PET utilizando  $^{18}\text{FDG}$  pode oferecer dificuldades de resolução (BARTHEL et al., 2003). Na Figura 7 pode-se evidenciar que  $^{18}\text{FLT}$  é mais específico do que  $^{18}\text{FDG}$  para a detecção de tumores cerebrais.

Com  $^{18}\text{F}$ FDG uma grande área cerebral foi radiomarcada e, com  $^{18}\text{F}$ FLT, menor foi a área radiomarcada e mais evidente ficou o tumor.

Um dos estudos comparativos mais importantes envolvendo  $^{18}\text{F}$ FDG e  $^{18}\text{F}$ FLT é o de Liu e colaboradores (2012). Neste estudo foi reportado um caso de uma paciente que apresentava lesões na mama, a qual passou por PET com  $^{18}\text{F}$ FLT a fim de detectar se as lesões eram benignas ou malignas. Entretanto, nenhuma captação de  $^{18}\text{F}$ FLT foi observada na mama, mas houve captação no mediastino anterior direito. As imagens PET do  $^{18}\text{F}$ FDG mostraram uma leve captação deste radiofármaco apenas nas lesões mamárias. Posteriormente, uma análise patológica de timectomia foi realizada comprovando a presença de timoma, e não de câncer de mama como seria indicado pelo PET apenas com  $^{18}\text{F}$ FDG (LIU et al., 2012).

**Figura 7 – Imagens PET de paciente com tumor cerebral. As áreas mais alaranjadas representam a captura do radiofármaco. À esquerda imagem obtida com  $^{18}\text{F}$ FDG. À direita, imagem obtida com  $^{18}\text{F}$ FLT.**



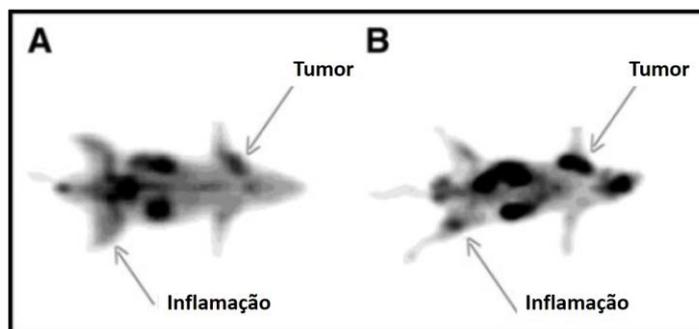
Fonte: modificado de CHEN et al, 2005.

Um problema característico do  $^{18}\text{F}$ FDG é sua afinidade por tecidos inflamatórios. Durante o processo de quimioterapia e radioterapia, podem ocorrer pontos de inflamação nas áreas tumorais, o que aumenta a captação do  $^{18}\text{F}$ FDG pelos tumores e sinaliza erroneamente uma ineficácia na terapia antitumoral. Vale lembrar que as células inflamatórias geralmente possuem baixa taxa de proliferação e, por ser um radiofármaco específico da proliferação celular, o  $^{18}\text{F}$ FLT não se liga às células inflamatórias e pode exatamente refletir a resposta tumoral frente à terapia e reduzir o número de casos falso-positivos em relação ao  $^{18}\text{F}$ FDG (DE SAINT-HUBERT; BREPOELS; MOTTAGHY, 2010). Um caso prático deste fato pode ser

visto na Figura 8, onde é possível constatar que, em estudo com ratos,  $^{18}\text{F}$ FLT não se ligou a pontos de inflamação (WAARDE et al., 2003).

Apesar de ser um radiofármaco relativamente novo em comparação ao  $^{18}\text{F}$ FDG, vários estudos já elucidaram o papel do  $^{18}\text{F}$ FLT no diagnóstico e acompanhamento de alguns cânceres. O PET com  $^{18}\text{F}$ FLT é uma ferramenta promissora para a geração de imagens de câncer de mama primário e metástases. Estudos adicionais são necessários para avaliar a utilidade clínica do  $^{18}\text{F}$ FLT para caracterização de tumores primários, detecção de metástases linfonodais e monitoramento da resposta tumoral à terapia (SMYCZEK-GARGYA et al., 2004).

**Figura 8 – Imagens PET de ratos com áreas tumorais e de inflamação. Em A temos imagem obtida com  $^{18}\text{F}$ FLT. Em B, imagem obtida com  $^{18}\text{F}$ FDG.**



Fonte: modificado de WAARDE et al, 2003.

Outros estudos são encorajadores e indicam um possível papel para  $^{18}\text{F}$  FLT na monitoração da resposta ao tratamento em pacientes com câncer de mama, tumores cerebrais, sendo sua captação melhor do que a de  $^{18}\text{F}$ FDG para a detecção de tumores cerebrais recorrentes (GROVES et al., 2007).

O  $^{18}\text{F}$ FLT permite avaliação precoce de efeitos antiproliferativos, tornando-se um radiotraçador promissor para o desenvolvimento de novos tratamentos para glioma (RUEGER et al., 2011), linfomas (WAGNER et al., 2003), pode também desempenhar um papel significativo na avaliação de lesões pulmonares indeterminadas (VESSELLE et al., 2002), na detecção de câncer retal (MUIJS et al., 2011), e na diferenciação da malignidade e benignidade de casos de leiomioma uterino (YAMANE et al., 2012).

### 2.3.6 Avaliação da qualidade do $^{18}\text{FLT}$

Todos os fármacos, por serem administrados em humanos, precisam obrigatoriamente passar por rigorosos testes de controle da qualidade. Com os radiofármacos a regra é a mesma e todos ensaios de controle de qualidade visam assegurar a segurança dos pacientes, assegurando que todos os limites da fabricação estejam de acordo aos padrões éticos, morais e legais.

Atualmente existem legislações, guias e monografias farmacopeicas que recomendam os parâmetros e os limites de aceitação que devem ser avaliados a cada tipo de radiofármaco. Os radiofármacos utilizados no PET, em especial, possuem propriedades que os tornam diferentes dos demais radiofármacos, em especial sua meia vida relativamente mais curta.

As farmacopeias Americana (USP) e Europeia (EP) fornecem os testes e os limites para a maioria dos radiofármacos. A USP determina que radiofármacos PET com meia vida maior ou igual a 20 minutos devem passar pelos seguintes testes: pH, verificação visual, identidade e pureza radionuclídica, identidade e pureza química, solventes residuais, endotoxinas e esterilidade (USP, 2012). Para  $^{18}\text{FLT}$ , são realizados os testes empregados em outros radiofármacos marcados com  $^{18}\text{F}$ . Estes testes podem ser simplificados e divididos em físico-químicos e microbiológicos, e são preconizados pelas USP, EP e por compêndios da ANVISA. Recentemente, a EP publicou uma monografia sobre o  $^{18}\text{FLT}$  (EP, 2013).

#### 2.3.6.1 Controle de qualidade físico-químico

- pH: tendo em consideração que o sangue, em condições fisiológicas, possui o pH 7,4, é necessário o controle das faixas de pH das soluções injetadas nos pacientes para que estas se aproximem do pH fisiológico. O teste de pH pode ser realizado por meio de equipamentos calibrados, como os pHmetros, ou por meio de fitas medidoras com leitura visual que indicam o pH de 2 a 9. A faixa de pH aceitável para as injeções intravenosas fica entre 2 a 12, porém quanto mais próximo do pH fisiológico, melhor. Dessa forma, espera-se que as amostras de  $^{18}\text{FLT}$  produzidas se enquadrem numa faixa de pH entre 4,5 a 8,5 (STRICKLEY, 2004; YU, 2006).

- Teste de verificação visual: visa à caracterização, a olho nu, do radiofármaco produzido para verificar características como cor e textura. É um teste de fácil execução, no qual se faz a observação do radiofármaco em frascos estéreis de penicilina, a fim de detectar a coloração e a presença de partículas. A formulação final de  $^{18}\text{FLT}$  deve ser límpida e livre de partículas suspensas.
- Identidade e pureza radionuclídica: realizado para investigar se o radionuclídeo presente na amostra é o flúor-18. O teste em questão é realizado por meio da avaliação da meia vida do radiofármaco em ativímetro e pela observação das emissões de energia, realizadas por detectores de germânio. O  $^{18}\text{F}$  tem tempo de meia-vida entre 105 e 115 minutos e deve ser o responsável por pelo menos 99,5% das emissões em 0,511 e 1,022 MeV para que as amostras do radiofármaco sejam aprovadas e liberadas (USP, 2012).
- Pureza radioquímica: este ensaio é realizado por meio da cromatografia em camada delgada (ou CCD), em placas de sílica gel. Busca avaliar a presença de impurezas radioativas nas amostras de  $^{18}\text{FLT}$ , sendo estas mais comumente representadas pelo próprio fluoreto originado na síntese. É preconizado que, nas amostras, no mínimo 95% das emissões radioativas sejam originadas do  $^{18}\text{FLT}$  (que apresenta fator de retenção 0,7) e que no máximo 5% venha do fluoreto (EP, 2013).
- Identidade e pureza química s principais impurezas não radiomarcadas encontradas nas formulações de  $^{18}\text{FLT}$  são o Kryptofix e Estavudina. A Estavudina é analisada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando UV (PASCALI et al., 2012), enquanto que o Kryptofix é determinado por metodologia *spot test*. Os limites destas substâncias nas formulações de  $^{18}\text{FLT}$  são de até 50  $\mu\text{g/mL}$  para Kryptofix e 0,1 mg/V para a Estavudina (EP, 2013).
- Solventes residuais: este teste busca detectar e quantificar esses solventes que, por possuírem toxicidade, precisam estar em quantidades mínimas nas amostras, evitando efeitos adversos nos pacientes e no meio ambiente. Os solventes residuais mais comuns nas amostras de  $^{18}\text{FLT}$  são acetonitrila e etanol, sendo comumente detectados por Cromatografia Gasosa (HUNG, 2002). É estabelecido que o limite de etanol nas formulações é no máximo 10% e, para acetonitrila, o limite é <0,04% (v/v) (EP, 2013).

### 2.3.6.2 Controle de qualidade microbiológico

- Teste de endotoxinas: o teste para detecção de endotoxinas é utilizado com a finalidade de quantificar os níveis das endotoxinas (lipossacarídeos indutores de reações inflamatórias) das bactérias Gram negativas presentes nos radiofármacos. Pode ser realizado por método de coagulação em gel, método turbidimétrico, ou cromogênico. São preconizados valores para os níveis de endotoxinas no  $^{18}\text{FLT}$  que não poderão ser excedidos devido ao risco que apresentará ao paciente (FUKUMORI, 2008). O limite das endotoxinas na formulação é 17,5 unidades de endotoxina por mL do radiofármaco (EP, 2013).
- Teste de esterilidade: o teste de esterilidade é empregado na detecção de possíveis microrganismos que possam ter contaminado o radiofármaco, impossibilitando sua aplicação intravenosa. É realizado inoculando-se parte do radiofármaco em dois meios de cultura diferentes (caldo tioglicolato e caldo soja tripticaseína), a fim de detectar microrganismos de diferentes características, de modo que qualquer turvação desenvolvida nos meios de cultura indica contaminação (BRASIL, 2010).

### 2.3.7 Fatores que influenciam a pureza radioquímica de radiofármacos

Para que possa ser utilizado por pacientes em PET, o  $^{18}\text{FLT}$  produzido deverá passar por testes de pureza radioquímica, onde é possível determinar o tempo útil da formulação radiofarmacêutica. A pureza radioquímica também desempenha papel fundamental na proteção do paciente, ao qual deve ser assegurada a exposição mínima às radiações ionizantes de forma que, quanto maior a pureza radioquímica, menor volume de radiofármaco é injetado no paciente (BROSSARD et al., 2013).

Diversos fatores podem vir a alterar a pureza radioquímica ou química dos fármacos na forma farmacêutica líquida, sendo estes a temperatura, umidade, luz, pH, presença de agentes estabilizantes e outros fatores próprios da formulação radiofarmacêutica (FAWDRY, 2007).

Com relação à temperatura, sabe-se que valores elevados desta podem levar à decomposição dos radiofármacos. Karwath e colaboradores (2005) verificaram que amostras de  $^{18}\text{FDG}$ , radiofármaco semelhante ao  $^{18}\text{FLT}$ , expostas a altas

temperaturas (acima de 130 °C), mesmo por alguns minutos, apresentaram um perfil de decomposição acelerado. Este comportamento foi atenuado em meio alcalino (KARWATH et al, 2005).

A radiólise é um processo que ocorre em meios aquosos contendo radiação e que influencia diretamente a pureza radioquímica dos radiofármacos. Neste caso, a radiação emitida pelos pósitrons de flúor pode iniciar uma reação química, levando à alteração e decomposição na estrutura do radiofármaco. A decomposição induzida pela radiação ocorre normalmente através da geração de radicais livres originados da interação entre a radiação ionizante e a água (FAWDRY, 2007). Este mesmo fato foi observado por Jimenez e colaboradores, analisando  $^{18}\text{F}$ FDG, onde se observou que altas taxas de radiação emitidas pelo radiofármaco contribuem para a degradação (JIMENEZ et al, 2006).

Em se falando da importância do pH, já foi mostrado que pequenas alterações neste parâmetro podem prolongar a pureza radioquímica dos radiofármacos, como mostrado por Martinez e Leiva, em 2012. Estes autores verificaram que o ajuste do pH de  $^{18}\text{F}$ FDG em torno de 5,5, pela adição de ácido cítrico às formulações, foi eficiente para manter a pureza radioquímica do composto por pelo menos 12h (MARTINEZ, LEIVA, 2012).

Um importante agente estabilizante de pureza radioquímica nas formulações radiofarmacêuticas é o etanol. Diversos estudos mostram que pequenas concentrações de etanol são suficientes para estabilizar a pureza radioquímica de  $^{18}\text{F}$ FDG. Entretanto, os estudos encontrados na literatura diferem quanto à concentração ideal de etanol para a estabilidade do produto final (JACOBSON et al, 2009). Outra forma de vencer a radiólise e a degradação é o uso de estabilizantes redutores como o ácido ascórbico, que podem retardar a taxa de decomposição e melhorar a vida útil dos radiofármacos (FAWDRY et al., 2007).

Vale ressaltar ainda que, em formas líquidas, a degradação da formulação pode levar, além da inadequação das amostras, a alterações visuais como a manifestação de turbidez, precipitação, descoloração, alterações na viscosidade ou separação de fases devido à quebra da formulação original (BROSSARD et al., 2013). Dessa forma, é de extrema importância o conhecimento de fatores ou agentes que possam vir alterar a pureza radioquímica da formulação de  $^{18}\text{F}$ FLT, de forma que seja possível combater estes e obter amostras com maior tempo de uso pelos centros de medicina nuclear.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INFRAESTRUTURA

Todos os ensaios de síntese e controle da qualidade do  $^{18}\text{FLT}$  foram realizados na Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA), do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE).

#### 3.2 SÍNTESE DE $^{18}\text{FLT}$

##### 3.2.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes e insumos: kit para síntese automatizada de  $^{18}\text{FDG}$ , contendo solução Cryptand (Kryptofix) e acetonitrila, sem os demais reagentes para este radiofármaco. Precursor Boc-Nosyl, todos da ABX Chemicals (Alemanha). Solução de cloreto de sódio 2 molar, solução de hidróxido de sódio, 2 molar.

Os principais equipamentos utilizados na síntese foram: ciclotron Cyclone18 (IBA, Bélgica); módulo de síntese Synthera, também da IBA, conjunto de cassete (IFP) para síntese automatizada do  $^{18}\text{FDG}$ , tubos, conectores e agulhas do cassete para síntese de  $^{18}\text{FDG}$ , todos da marca ABX Chemicals (Alemanha), computador e software específicos para realização da síntese e blindagens de tungstênio. Foram também utilizados cartuchos para purificação de fase reversa QMA, PSH- $\text{H}^+$ , WAX, HLB, e Alumina, filtro Millex-GS, da Merck-Millipore (EUA).

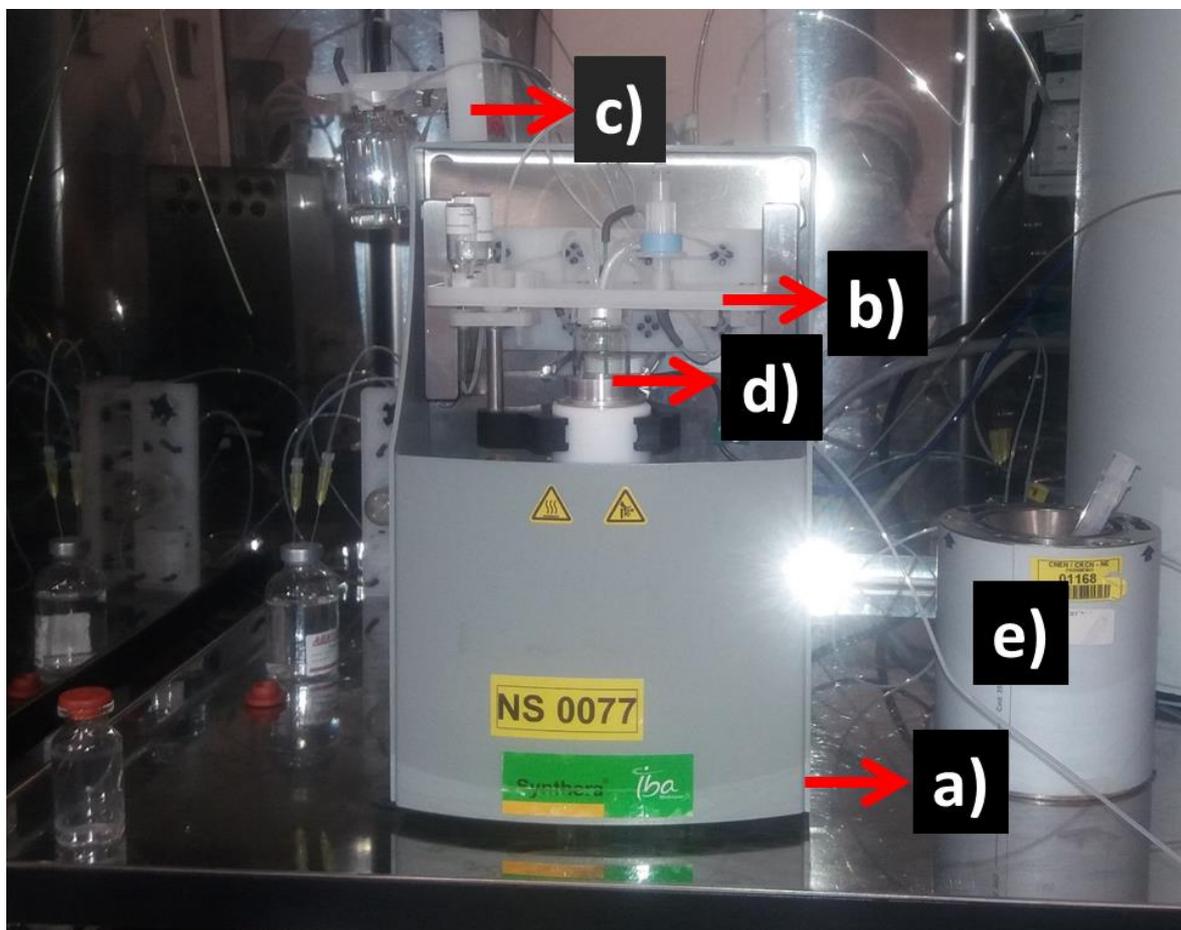
##### 3.2.2 Métodos

Os íons fluoreto utilizados para marcar o FLT foram obtidos por meio da reação nuclear de substituição nucleofílica  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , por meio do bombardeamento de água enriquecida ( $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ) fornecida pela Center of Molecular Research – CMR (Moscou, Rússia), com feixe de prótons em um ciclotron Cyclone18/9 MeV, Ion Beam Applications (IBA, Louvain-la-Neuve, Bélgica) no CRCN-NE.

Após a produção no ciclotron, o  $^{18}\text{F}$  foi transferido, através de capilares, até a célula quente onde ocorreu o processo de síntese.

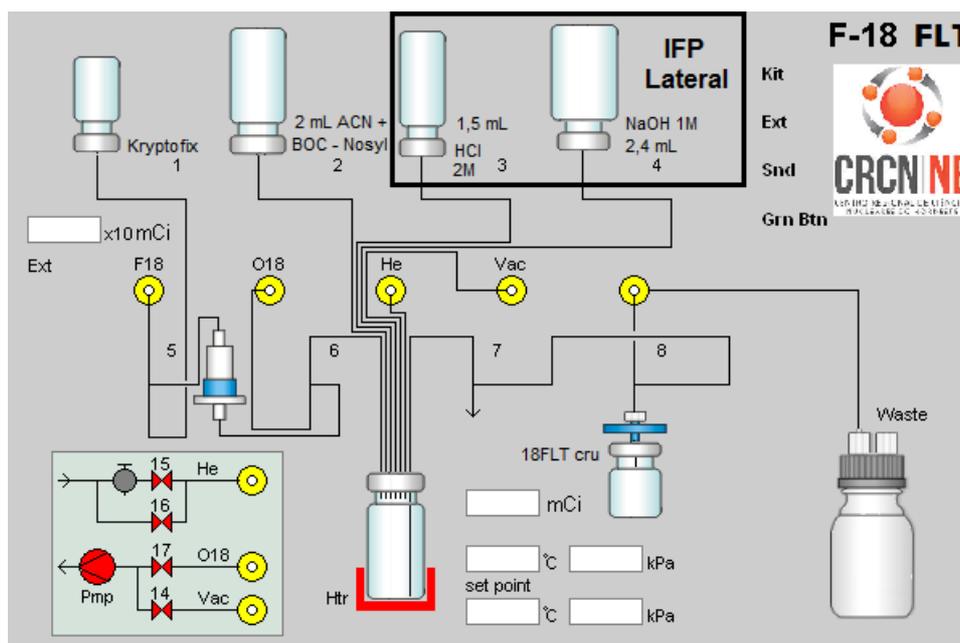
A síntese de  $^{18}\text{FLT}$  foi realizada por meio da adaptação dos kits e cassetes de  $^{18}\text{FLT}$  no módulo de síntese Synthera. Os reagentes dos kits foram colocados em posições específicas no cassete, de modo a operar as etapas realizadas no módulo por meio de um *software* contendo o passo a passo (*script*) específico para síntese automatizada. Como o *script* comercial para síntese de  $^{18}\text{FLT}$ , obtido da IBA, não possibilitou a síntese da fluorotimidina no módulo, optou-se por modificar o *script* já utilizado em  $^{18}\text{FDG}$ , incluindo neste os parâmetros necessários para a síntese de  $^{18}\text{FLT}$ . Todas etapas foram monitoradas e, quando necessário, modificadas por meio do *software*. Na figura 9 é possível ver a organização do Synthera e do kit para a síntese de  $^{18}\text{FLT}$ .

**Figura 9 – Organização do módulo para  $^{18}\text{FLT}$ , dentro da célula de síntese. a) módulo Synthera, b) cassete IFP para inserção dos reagentes acetonitrila e Cryptand, c) cassete IFP suporte, adaptado para inserção de NaOH 1M e HCl 2M, d) frasco reator inserido no forno aquecedor, e) frasco de rejeitos.**



A tela de trabalho mostrada no *software* de síntese do Synthera é mostrada na figura 10. Nesta é possível, ao longo da síntese, alterar a ordem de abertura das válvulas, interromper a síntese ou até mesmo alterar o passo a passo, se necessário.

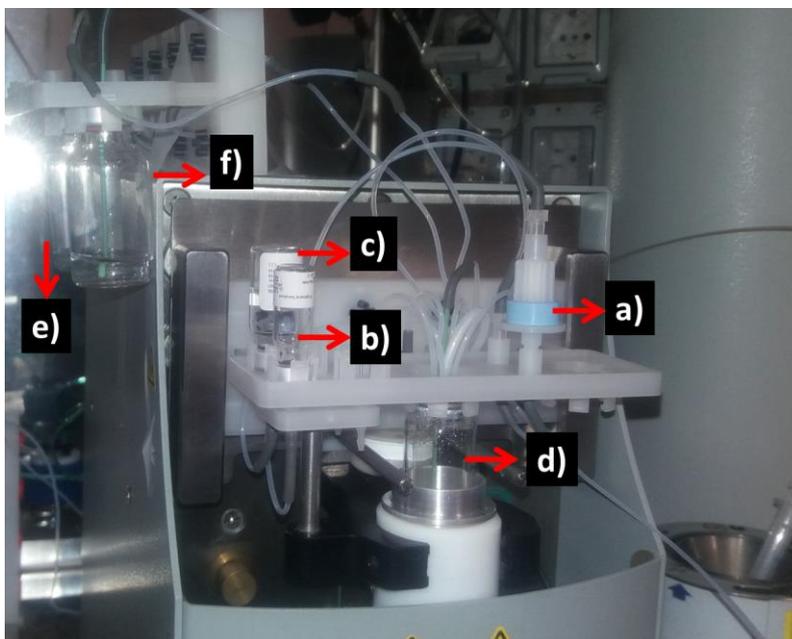
**Figura 10 – Tela de trabalho do Synthera, adaptada de  $^{18}\text{F}$ FDG para síntese de  $^{18}\text{F}$ FLT.**



Após a chegada do  $^{18}\text{F}$ , carregado pela água enriquecida, na célula de síntese, é necessário purificar o  $^{18}\text{F}$ , o que foi feito pela retenção deste no cartucho QMA (figura 11, a). Em seguida, o  $^{18}\text{F}$  retido foi eluído pela solução Cryptand (figura 11, b) e alocado no frasco reator (fig. 11, d).

Nas condições corretas de tempo e temperatura de síntese, a mistura contendo 25 mg do precursor BOC-Nosyl dissolvido em 2 mL de acetonitrila (fig. 11, c) foi enviada para o frasco reator, onde ocorreu a marcação do precursor Boc com o  $^{18}\text{F}$ . Vale ressaltar que esta concentração foi escolhida com base em estudos na literatura, mostrando-se ideal para o satisfatório rendimento radioquímico das sínteses. Em seguida, 1,5 mL de HCL 2M (fig. 11, e) foi colocado na mistura BOC- $^{18}\text{F}$  para que os grupos protetores do precursor fossem hidrolisados, originando  $^{18}\text{FLT}$  e impurezas. Ao fim da hidrólise, 2,4 mL de NaOH 1M foram injetados na mistura com finalidade de contrapor o pH baixo. A mistura contendo  $^{18}\text{FLT}$  e suas impurezas relacionadas foi enviada a frasco de coleta protegido por castelo de tungstênio.

**Figura 11 – Detalhes dos reagentes e estrutura de síntese. a) cartucho QMA, b) solução Cryptand, c) 25 mg de precursor Boc dissolvido em acetonitrila, d) frasco reator, e) HCl 2 M, f) NaOH 1 M.**



Depois da obtenção de  $^{18}\text{FLT}$  foi necessário realizar a purificação manual da mistura, para retirar as impurezas relacionadas à síntese. Para isso, após condicionamento prévio, os cartuchos PSH- $\text{H}^+$ , WAX e HLB foram acoplados em série, como mostra a figura 12.

**Figura 12 – Organização da capela de exaustão blindada, utilizada para purificação de  $^{18}\text{FLT}$ . Em zoom, colunas de purificação.**



A mistura de  $^{18}\text{FLT}$  foi injetada nos cartuchos e, em seguida, o  $^{18}\text{FLT}$  retido nestes foi eluído por meio da injeção de etanol 10% pelos cartuchos. Nesta etapa

acoplou-se também o cartucho Alumina (cor verde). Coletado o  $^{18}\text{FLT}$  puro, a amostra foi filtrada e enviada ao controle de qualidade. Vale ressaltar que esta etapa ocorreu com uso dos EPI's necessários para radioproteção do operador, bem como o uso de dosímetros de tórax e dedo, para estimativa da dose recebida.

Terminados os processos de síntese e purificação, foram realizados cálculos para avaliação dos rendimentos radioquímicos corrigido e não corrigido. No primeiro, foi quantificada a porcentagem da atividade empregada na síntese que permaneceu na formulação final de  $^{18}\text{FLT}$ , ou seja, a quantidade de atividade que radiomarcou o produto, como mostrada na equação a seguir:

$$R = 100\% \frac{A_i}{A_f}$$

onde:  $A_i$  é atividade inicial empregada na síntese;

$A_f$  é a atividade medida na amostra de  $^{18}\text{FLT}$  após síntese e purificação.

Já para o rendimento corrigido, foi estimado o rendimento total com base no decaimento radioativo ocorrido ao longo do tempo de síntese, conforme equação a seguir:

$$RC = 100\% \frac{A_f}{e^{-kT}}$$

onde:  $A_f$  é atividade final, após síntese e purificação;

$e^{-kT}$  é o valor exponencial da constante de decaimento do flúor-18 sobre o tempo total ocorrido entre a síntese, purificação e medição da atividade inicial.

Após síntese, purificação e cálculo dos rendimentos radioquímicos, as amostras de  $^{18}\text{FLT}$  seguiram para controle da qualidade.

### 3.3 CONTROLE DA QUALIDADE

#### 3.3.1 Materiais

Para o controle de qualidade físico-químico, foram utilizados o padrão de FLT da ABX; padrão de estavudina grau USP; acetonitrila grau CLAE; padrão Kryptofix (ou Cryptand); fitas de pH; cromatoplasmas de sílica gel; água deionizada; béckers e balões volumétricos de volumes variados.

Os equipamentos para controle físico-químico: cromatógrafo a gás Agilent 6850; cromatógrafo a líquidos de alta eficiência, modelo 1200 da Agilent Technologies (EUA) com injetor manual, equipado com coluna de octadecilsilano, modelo Luna LC-18 25 cm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Phenomenex, Estados Unidos) ou coluna, também de octadecilsilano, modelo Supelcosil LC-18 25 cm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula da Sigma-Aldrich (Alemanha); atímetro modelo Curiementor da PTW (Freiburg im Breisgau, Alemanha); detector de germânio hiperpuro HPGe, modelo CG1020 da Canberra (Meriden, Estados Unidos).

Para controle microbiológico foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: sistema de teste portátil Endosafe, modelo PTS (Estados Unidos); meio de cultura estéril líquido caseína de soja e tioglicolato; frascos estéreis e apirogênicos de 10 ml; membranas filtrantes de 0,22 µm; estufas de incubação; purificador de água Milli-Q da Millipore Merck (EUA); béqueres e balões volumétricos de volumes variados.

#### 3.3.2 Métodos

**pH:** o teste de pH foi realizado em fitas medidoras com leitura visual. A amostra de <sup>18</sup>FLT foi aplicada de forma a cobrir toda parte quimicamente sensível que compõe as fitas e, em seguida, comparada à tabela padrão de pH contida na embalagem das fitas. De acordo com os compêndios oficiais, o valor do pH dos medicamentos injetáveis deve estar compreendido na faixa de 4,5 e 8,5, próximo ao do sangue. Vale ressaltar que a medida de pH através de fitas é um método aceito pelas farmacopeias e estabelecido no CRCN-NE e em outros centros de radiofarmácia. O

uso de pHmetro não foi possível, neste estudo, devido ao pequeno volume de  $^{18}\text{FLT}$  que é enviado ao controle físico-químico.

**Verificação visual:** todas amostras de  $^{18}\text{FLT}$  foram colocadas em frascos de penicilina e inspecionadas a olho nu, onde foi possível verificar a presença ou não de partículas contaminantes suspensas e a coloração das amostras.

**Identidade e pureza radionuclídica:** para determinar a atividade da amostra foi utilizado ativímetro. A atividade foi medida cinco vezes, a cada 10 segundos, nos minutos 0, 10, 20 e 30 de análise, após a chegada da amostra ao laboratório. Com os valores de atividade ao longo do tempo, foi estimado o tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) do  $^{18}\text{FLT}$ , a partir da equação 2 abaixo:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2 \times t}{\ln A/A_0} \quad (2)$$

onde:  $A_0$  é atividade inicial medida em cps, mCi ou  $\mu\text{Ci}$  no tempo zero;

$A$  é a atividade medida em cps, mCi ou  $\mu\text{Ci}$  no tempo  $t$ ;

$t$  é o tempo em minutos decorrido desde a obtenção de  $A_0$ .

Para a identidade radionuclídica, o radiofármaco deveria apresentar meia vida entre 105 e 115 minutos, relativa ao  $^{18}\text{F}$ .

O teste de pureza radionuclídica foi realizado utilizando detector de germânio hiperpuro. As amostras que contêm flúor-18 deveriam apresentar 99,5% das emissões gama observadas relativas a picos de 0,511 MeV e 1,022 MeV ou picos Compton de dispersão do  $^{18}\text{F}$ .

**Purezas Química e Radioquímica:** a pureza química foi analisada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel foi composta de gradiente água ultrapura:acetonitrila, em proporção 5:95. Esta mesma fase móvel foi injetada e transportada no CLAE a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. Os picos de radioatividade e UV da amostra de  $^{18}\text{FLT}$  foram comparados com os picos do padrão de referência do  $^{18}\text{FLT}$ . Os padrões de estavudina e fluortimidina também foram preparados e analisados previamente no CLAE, a uma concentração de 0,1 mg/mL,

como preconizado pela Farmacopeia Europeia, para quantificar estas impurezas na amostra de  $^{18}\text{FLT}$  (EP, 2013).

O residual da solução Cryptand (Kryptofix) foi determinado por meio de teste de mancha (*spot test*), onde, numa placa cromatográfica de sílica gel, foram gotejadas a solução padrão de Kryptofix, em concentração 0,05 mg/mL (limite farmacopeico), e a amostra de  $^{18}\text{FLT}$ . Em seguida, a mesma placa foi colocada em cuba contendo iodo ressublimado até que as manchas da solução padrão e da amostra fossem visualizadas, de forma que a mancha da amostra deveria ser mais tênue do que a da solução padrão, indicando concentração de Kryptofix, no radiofármaco menor do que a limite.

A pureza radioquímica foi avaliada por meio de CCD. O RF corresponde à razão entre a distância percorrida pela amostra e distância percorrida pela fase móvel. O RF do  $^{18}\text{FLT}$  está entre 0,6 e 0,7 mm, sendo que o fluoreto livre fica retido na origem (EP, 2013). Para realização da técnica, alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  foram aplicados a 2 cm da base da placa, local descrito como a origem da corrida cromatográfica. A área de aplicação foi seca com jato de ar frio e as placas foram acondicionadas em fase móvel contendo água:acetonitrila (5:95), até que a fase percorresse toda área de análise. Em seguida, a mesma placa foi alocada em radiocromatógrafo, para obtenção do RF e quantificação do fluoreto livre e de  $^{18}\text{FLT}$ .

**Determinação de solventes residuais:** Para detectar e determinar a presença dos solventes acetonitrila e etanol foi utilizada a técnica de cromatografia a gás utilizando o cromatógrafo acoplado a um detector de ionização em chamas. Foram preparadas soluções com concentrações definidas de etanol e acetonitrila. Após injetar as soluções padrão limite e a amostra no aparelho, houve o aquecimento destas em forno interno e, conseqüentemente, ionização dos componentes das substâncias. Segundo a Farmacopeia Europeia, para formulações farmacêuticas, o teor de acetonitrila não deve ultrapassar 0,04% (m/V), e o do etanol não deve ultrapassar a concentração de 10% (v/v). A taxa de fluxo empregada foi 3,0 mL/min, cada análise teve duração de seis minutos, a temperatura do forno esteve em 30°C durante o primeiro minuto de corrida, subindo para 60°C após o primeiro minuto em diante. A tabela 2 mostra os parâmetros utilizados nas análises de solventes residuais.

**Teste de endotoxinas:** a concentração de endotoxinas bacterianas em fluorodesoxitimidina foi determinada pelo método cinético-colorimétrico com auxílio do equipamento Endosafe® Portable Test System (PTS) - Charles River. Uma solução do produto final com diluição de 100 vezes foi aplicada em um cartucho dedicado a este equipamento. O cartucho contém quatro canais nos quais estão contidos o reagente LAL (indicativo de presença de endotoxinas) e um substrato cromogênico, além de conter endotoxina em dois dos canais, os quais serviram como controle positivo do produto. A execução do teste consistiu em inserir o cartucho no equipamento, preencher os dados requisitados pelo sistema e pipetar uma alíquota da amostra de <sup>18</sup>FLT em cada um dos quatro poços contido no cartucho.

**Tabela 2: Sistema cromatográfico para determinação de solventes residuais em <sup>18</sup>FLT. Os parâmetros sinalizados por \* não são farmacopeicos.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Solventes residuais	Etanol e Acetonitrila
Detector	Detector de ionização por chama (FID)
Fase estacionária	Coluna de sílica 0,25µm com 30mx0,53mm
Gás de arraste	Hélio (30 mL/min)
Hidrogênio (H <sub>2</sub> )	30 mL/min.*
Ar sintético	300 mL/min.
Temperatura da porta de injeção	250°C
Temperatura do detector	260°C
Duração da análise	6 minutos*
Temperatura inicial	30°C (0 a 1 minuto)*
Gradiente	60°C (1 a 6 minutos)*
Volume de injeção	1,0µL
Tempos de retenção	Etanol = 2,86 min. e Acetonitrila = 3,15 min*

O teste de endotoxinas duração de aproximadamente 15 minutos e forneceu informações quantitativas com resultados expressos em unidades de endotoxinas

por mililitro (UE/mL). Os critérios de aceitação para cada parâmetro do ensaio são mostrados na tabela 3.

**Tabela 3: Critérios de aceitação para os parâmetros do ensaio de endotoxinas utilizando o PTS.**

Parâmetro	Limites
Endotoxinas bacterianas na amostra	< 17,5 UE/mL
Coeficiente de variação 1	< 25 %
Coeficiente de variação 2	< 25 %
Recuperação do Spike <sup>1</sup>	50-200 %

**Teste de esterilidade:** os ensaios de esterilidade foram realizados em acordo aos compêndios oficiais, por inoculação direta. Foram utilizados tubos de ensaio contendo 7 mL de meio fluido de tioglicolato para cultura de bactérias anaeróbicas (embora também possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas) e tubos com 7 mL caldo de caseína trípica de soja (TSB) para cultura de leveduras, fungos e bactéria aeróbicas, que após inoculação de 0,5 mL amostra de <sup>18</sup>FLT com seringa e agulha estéreis (após decaimento radioativo), foram incubados a 33°C ± 2°C e 23°C ± 2°C, respectivamente, por 14 dias.

Se não houve crescimento de microrganismos, turbidez ou depósitos, o lote das amostras produzidas foi aprovado. Os meios de cultura foram preparados na Divisão de Produção de Radiofármacos do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, segundo metodologia já estabelecida e validada.

### 3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTES RESIDUAIS

Para garantir a confiabilidade da metodologia de Cromatografia Gasosa (CG) utilizada no controle da qualidade do <sup>18</sup>FLT, se tornou necessária a validação desta, em acordo com os guias de validação de metodologias disponíveis, tais como, o

<sup>1</sup> Spike: amostra controle positivo, com quantidade conhecida de endotoxinas.

Food and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopeia (USP), resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e a International Conference on Harmonization (ICH). Estes guias preconizam que cada validação deve ser personalizada, avaliando-se a necessidade dos testes experimentais para a metodologia em estudo.

Os testes de validação são divididos em três categorias de acordo com sua finalidade: I - Testes de identificação; II – Testes de impurezas; III- Testes de doseamento.

Neste trabalho, a metodologia utilizada corresponde à categoria II. Para a validação, segundo legislação, foram realizados os seguintes ensaios (ANVISA, 2017):

**Seletividade:** Este parâmetro foi avaliado submetendo-se etanol e acetonitrila, em diferentes concentrações, ao processo de corrida cromatográfica, de forma a investigar a capacidade do método em detectar e quantificar separadamente cada um dos analitos.

**Linearidade:** A linearidade foi avaliada por meio de três curvas curva de calibração, com no mínimo cinco concentrações de amostras, e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido deve ser igual ou superior a 0,99. Como preconizado, também foram obtidos os gráficos de resíduos para este parâmetro, bem como sua análise estatística (ANVISA, 2017). As curvas foram construídas empregando-se uma faixa entre 2.500 a 10.000  $\mu\text{g/mL}$  para o etanol e 200 a 800  $\mu\text{g/mL}$  para a acetonitrila em repetições autênticas.

**Precisão e Exatidão:** Para determinar a precisão do método por meio da repetibilidade e a exatidão, foram realizadas análises com soluções padrão autênticas em concentrações baixa, intermediária e alta de etanol e acetonitrila. Para estes, o desvio padrão relativo (DPR) foi obtido, sendo seu limite máximo justificado de acordo com as propriedades do método utilizado (ANVISA, 2017).

**Limites de detecção e quantificação (LD e LQ):** Para estes dois parâmetros foram utilizadas as equações 3 e 4 a seguir:

$$LD = \frac{3,3. \sigma}{IC} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \quad (4)$$

onde: IC é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas do ensaio de linearidade e  $\sigma$  é a média o coeficiente angular das três curvas de calibração.

**Robustez:** Na validação da metodologia da CG, foram variados os parâmetros de fluxo do gás de arraste e da temperatura da corrida nos resultados obtidos. Por fim, foi obtido o coeficiente de variação entre os resultados, o qual não deveria passar valor de 5%.

As análises realizadas para cada parâmetro de validação da metodologia de CG são mostradas na tabela 4. Vale ressaltar que o método inicial de CLAE não foi submetido a processo de validação, pois, como preconizado pela RDC número 166 de Julho de 2017, métodos de análise estabelecido por Farmacopeias e compêndios oficiais dispensa a obrigatoriedade da validação, desde que todos os parâmetros metodológicos sejam respeitados. Assim, foi utilizado o método da Farmacopeia Europeia para análise de  $^{18}\text{FLT}$  em CLAE, usando fluxo de fase móvel, coluna cromatográfica e todos os demais parâmetros preconizados. Isto permitiu a obtenção de resultados dentro do esperado em comparação a literatura (BRASIL, 2017; EP, 2013).

**Tabela 4: Parâmetros de validação da metodologia de cromatografia a gás, usada no controle da qualidade do  $^{18}\text{FLT}$ .**

Parâmetro	Descrição
Especificidade	Foram submetidas à análise soluções contendo acetonitrila e etanol. Cada um destes componentes deveria se apresentar em distintos tempos de retenção.
Linearidade	Foram obtidas três curvas de calibração, contendo ao menos cinco concentrações de etanol e acetonitrila.
Precisão e exatidão	Realizados testes intradia. Concentração

	alta, média e baixa de etanol e acetonitrila.
LD e LQ	Conforme item 3.4
Robustez	Alterações no fluxo do gás de arraste: variação de 0,1 mL/min para mais e menos; e na temperatura de corrida: variações de mais ou menos 1°C.

### 3.5 PUREZA RADIOQUÍMICA DE <sup>18</sup>FLT FRENTE A DIFERENTES AGENTES

Para investigação da influência dos parâmetros pH, temperatura de armazenamento e presença de estabilizante, foram obtidos três lotes de <sup>18</sup>FLT. Cada um dos lotes foi dividido em duas amostras: uma amostra original, recém-coletada do processo de síntese e considerada como amostra controle, e outra amostra, de mesmo volume, acondicionada em câmara climática a 40 °C, ou adicionada de solução tampão para elevação do pH, ou adicionada de ácido ascórbico a 10 mg/mL.

Em intervalos de duas horas, ambas as amostras foram submetidas ao teste de pureza radioquímica e, ao fim de oito horas de análise, cinco pontos de análises para cada condição fossem obtidos.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste trabalho foram utilizados os softwares Excel 2010<sup>®</sup> e R<sup>®</sup>, versão 3.4.3, para análise estatística. No caso do Excel 2010<sup>®</sup>, este foi utilizado para síntese dos gráficos de linearidade e meia-vida, bem como de seus coeficientes de correlação. O R<sup>®</sup> foi utilizado para análise estatística dos dados referentes à linearidade da validação da técnica de cromatografia a gás, por meio do teste ANOVA. O *script* utilizado no programa em questão pode ser visto no Apêndice B.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE E CONTROLE DA QUALIDADE DE $^{18}\text{FLT}$

A tabela 5 mostra os resultados de três sínteses semi-automáticas de  $^{18}\text{FLT}$ . Como preconizado, todas as sínteses foram monitoradas durante seu andamento, tanto por meio de software próprio de síntese, quanto por observação em tempo real das reações que ocorreram no módulo de síntese e dos caminhos que os reagentes percorreram. O *script* da síntese de  $^{18}\text{FLT}$ , modificado da versão original fornecida para  $^{18}\text{FDG}$ , pode ser visto no apêndice A. Vale ressaltar que o rendimento radioquímico corrigido soma ao rendimento a porcentagem referente ao decaimento da amostra ao longo da síntese.

**Tabela 5: Parâmetros e resultados das sínteses de  $^{18}\text{FLT}$ .**

Síntese	Rendimento não corrigido (%)	Rendimento corrigido (%)	Atividade específica final (GBq/ $\mu\text{mol}$ )
1 <sup>a</sup>	1,15%	1,70%	740,74
2 <sup>a</sup>	2,1%	3,04%	178,41
3 <sup>a</sup>	3,4%	4,90%	325,18

Assim, obteve-se como média do rendimento radioquímico não corrigido valor entre  $2,22 \pm 1,13\%$ . Já para o rendimento corrigido obteve-se valores entre  $3,97 \pm 1,31\%$  e, para a atividade específica, valores entre  $414,78 \pm 291,67 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ . Estes valores corroboram com a hipótese de Yun *et al* (2003), que cita o baixo rendimento radioquímico como um grande obstáculo para o na síntese de  $^{18}\text{FLT}$  (YUN *et al.*, 2003).

Em seus estudos, Machulla *et al* (2000), obtiveram rendimento de  $5,3 \pm 1,2\%$  ao fim da síntese, rendimento aproximado ao alcançado em uma das sínteses neste trabalho (MACHULLA *et al.*, 2000). Apesar dos rendimentos obtidos neste trabalho serem baixos, não se pode concluir que a síntese de  $^{18}\text{FLT}$  é inviável. Zanette, em 2013, obteve 6,78% de rendimento para o radiofármaco em questão, radiomarcando-o a  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ , com o catalisador  $\text{TBAHCO}_3$ . Já Nascimento (2014), obteve rendimento de 6,52% na síntese do mesmo radiofármaco, quando utilizando

o catalisador Kryptofix, como feito neste trabalho (NASCIMENTO, 2014; ZANETTE, 2013). Logo, conclui-se que, para este radiofármaco, baixos rendimentos já são esperados. Acredita-se também que, por ser uma metodologia implementada recentemente e que envolve purificação manual, os rendimentos obtidos foram inferiores ao esperado.

Na tabela 6 são mostrados os resultados dos testes de controle da qualidade físico-químico para as três sínteses. Todos os limites de aceitação foram preconizados por compêndios farmacopeicos. Em inspeção visual, todas amostras estavam límpidas e livres de partículas.

**Tabela 6: Resultados do controle da qualidade físico-químico<sup>18</sup>FLT.**

Teste	Aceitação	Síntese		
		1	2	3
pH	4,5 a 8,5	4,5	4,5	4,5
Residual de Kryptofix(µg/mL)	< 50	< 50	< 50	< 50
Identidade radionuclídica	Entre 105 e 115 minutos	106,14	110,76	110,45
Pureza radionuclídica	≥ 99,5% das emissões em 0,511 e 1,022 MeV	>99,5	>99,5	*2
FLT (mg/V)	≤ 0,1	0,013	<0,013	<0,013
Estavudina (mg/V)	≤ 0,1	0,001	<0,001	<0,001
Pureza radioquímica CCD (%)	> 95	>99,5	>99,5	99,5
Teor de etanol (V/V%)	≤ 10	6,47	6,34	<6,34

<sup>2</sup> Neste dia não foi realizada leitura de pureza radionuclídica devido a falha do detector de germânio (HPGe).

Teor de acetonitrila (m/V%)	< 0,04	0,00039	<0,00039	< 0,00039
-----------------------------	--------	---------	----------	-----------

O pH do produto final, nas três sínteses independentes, foi 4,5 (tabela 6). Este valor está na faixa estabelecida na literatura que é de 4,5 a 8,5 (EP, 2013), portanto não foi necessária a adição de tampão em nenhuma das sínteses para correção do pH, o que reduz a quantidade de possíveis impurezas na formulação.

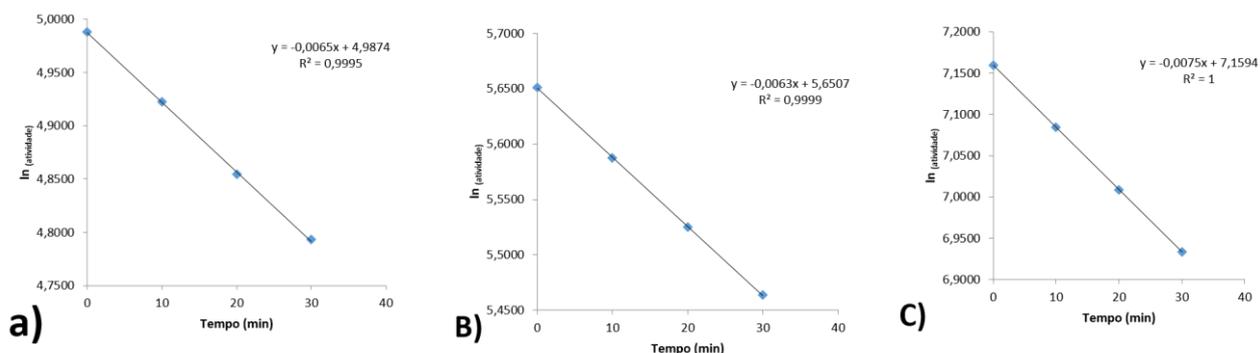
A figura 13 mostra uma das placas de sílica gel utilizadas para determinação do residual de Kryptofix (*spot test*). Em P foi aplicado 5µL de solução padrão limite de Kryptofix a 50 µg/mL e, em A, foi aplicado mesmo volume da amostra de <sup>18</sup>FLT. Percebe-se que não houve formação de manchas na área contendo amostra, em contraste à formada na área contendo padrão, o que demonstra que a concentração da impurezas nas amostras de <sup>18</sup>FLT produzidas estão abaixo dos limites preconizados pelos compêndios (EP, 2013).

**Figura 13 – Resultado em teste de residual de Cryptand.**



Em relação à identidade radionuclídica, após realizar as leituras de atividade nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos após a síntese, com ativímetro, para cada síntese confeccionou-se o gráfico de atividade detectada pelo tempo, e realizou-se cálculo de regressão linear para obter-se o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), como mostrado na figura 14. O tempo de meia vida médio, determinado para as amostras, foi 109,09 minutos.

**Figura 14 – Atividade radioativa vs. Tempo para as três amostras de  $^{18}\text{FLT}$ .**



Após a análises das amostras de  $^{18}\text{FLT}$  no detector de germânio hiperpuro, pode-se concluir que a pureza radionuclídica das amostras foi superior a 99,5% como preconizado (EP, 2013). No terceiro dia de análise, devido a falhas no funcionamento do detector, não foi possível leitura das emissões de energia (tabela 6). Neste dia, a pureza radionuclídica para a amostra foi avaliada em CLAE, com detector radioativo, sendo superior a 95%. Não houve formação de impurezas radiomarcadas.

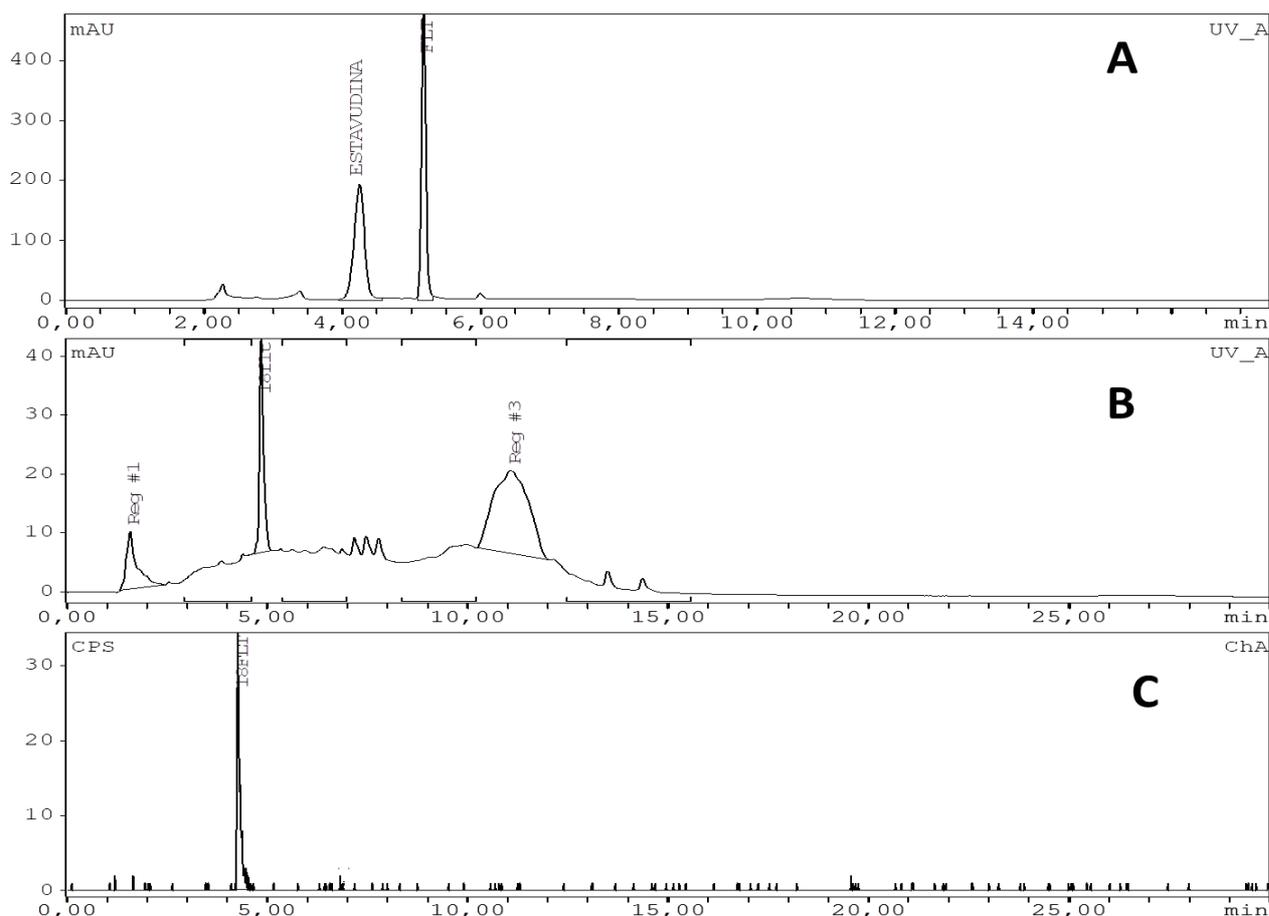
Os cromatogramas da CLAE com detectores UV e radioativo, para  $^{18}\text{FLT}$  e impurezas relacionadas foram obtidos de acordo com a metodologia farmacopeica, citada anteriormente. Em todos os testes após síntese, os cromatogramas mostraram uma boa resolução (maior que 2, como preconizado pelo ICH) entre as impurezas de síntese, o radionuclídeo livre e o produto radiomarcado. Na figura 15 podem-se ver os cromatogramas típicos do padrão, de  $^{18}\text{FLT}$  e seus produtos correlacionados.

Em relação ao teste de pureza química, as impurezas foram quantificadas, comparando-se as áreas dos picos de solução padrão, farmacopeica, com as áreas das amostras. Foram encontradas concentrações menores de 0,1 mg/mL para as impurezas estavudina e FLT (não radiomarcado). Assim, os resultados puderam ser considerados satisfatórios e atenderam aos limites farmacopeicos (0,1 mg/mL de amostra) (EP, 2013).

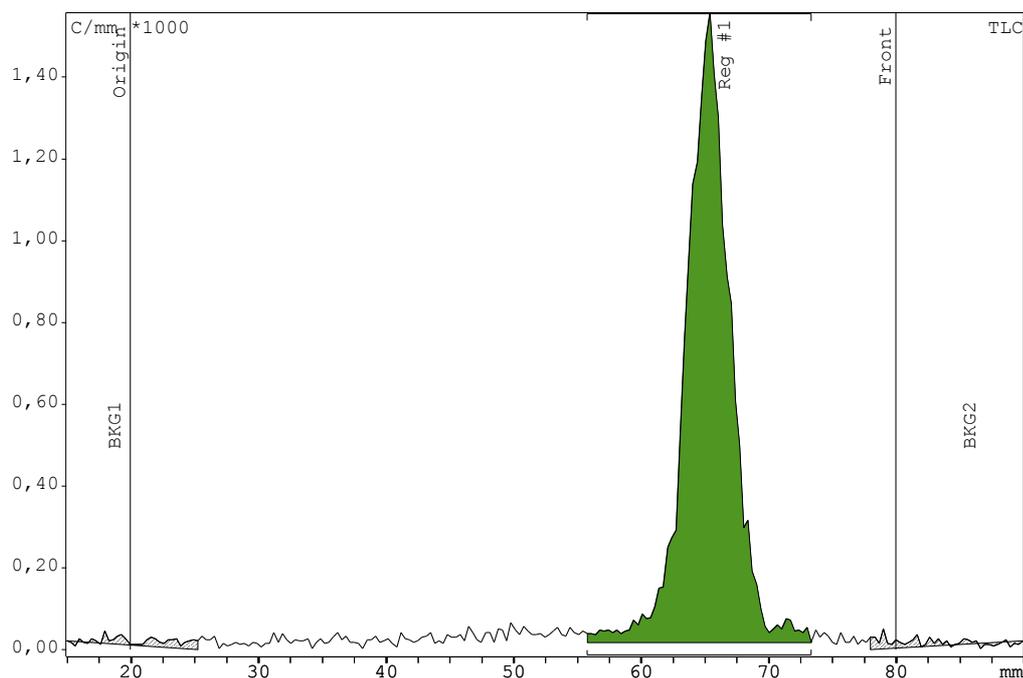
O tempo de retenção (RT) na CLAE, com as condições citadas anteriormente, de  $^{18}\text{FLT}$  foi 5,18 minutos. Embora as impurezas representadas pelas regiões 1, 2 e 3 não tenham sido identificadas, o resultado para este teste foi considerado satisfatório pois todas as impurezas se apresentam em concentração menor do que a

limite para impurezas de  $^{18}\text{FLT}$  (que é de menos do que 0,1 mg/V da amostra, ou seja, menor do que a concentração da solução padrão de  $^{18}\text{FLT}$ ) (EP, 2013).

**Figura 15 – Cromatograma, obtido em CLAE, de uma das sínteses de  $^{18}\text{FLT}$ . Em A, padrão de FLT e Estavudina, em detector UV. Em B, cromatograma em UV de  $^{18}\text{FLT}$  e impurezas relacionadas. Em C, cromatograma obtido com detector radioativo.**



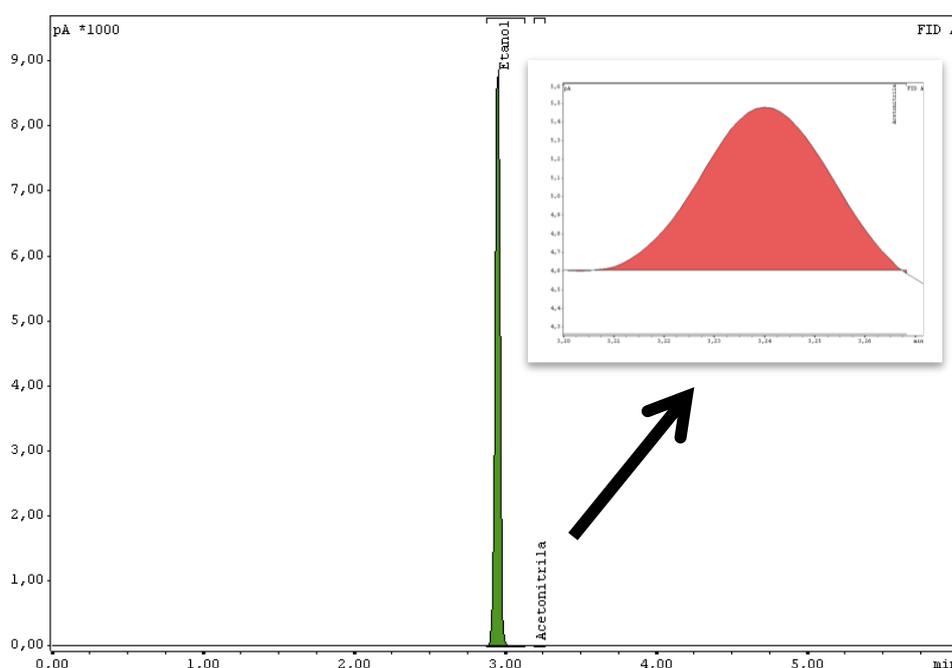
A pureza radioquímica das amostras foi avaliada por cromatografia em camada delgada. Nas três sínteses, a pureza determinada de  $^{18}\text{FLT}$  foi maior que 95%, não sendo detectada a presença do fluoreto livre em quantidade superior ou próxima ao limite (5%) (EP, 2013). Um dos cromatogramas pode ser observado na figura 16. A pureza radioquímica das amostras sugere eficiência da etapa de purificação, indicando que o fluoreto livre e todas outras possíveis impurezas radiomarcadas foram eliminadas nesta etapa. Como recomendado pela Farmacopeia Europeia, o produto radiomarcado apresentou fator de retenção entre 0,6 e 0,7 mm, comprovando também a identidade radioquímica de  $^{18}\text{FLT}$ .

**Figura 16: Gráfico de CCD, mostrando pico radioativo correspondente a  $^{18}\text{FLT}$ .**

Foram realizadas análises de cromatografia a gás, com finalidade de quantificar a presença dos solventes etanol e acetonitrila, os quais fazem parte do processo de síntese do  $^{18}\text{FLT}$ , sendo acetonitrila aplicada na retirada da água da reação de marcação, e, o etanol, na eluição do  $^{18}\text{FLT}$  da coluna de purificação. O produto radiomarcado apresentou um pico no tempo de retenção (figura 17) de 2,93 minutos, pico este correspondente ao solvente etanol. O pico correspondente à acetonitrila foi detectado no tempo 3,22 minutos. A quantidade média de etanol presente nas amostras foram 4,39% v/v e, para acetonitrila, a porcentagem média encontrada foi 0,00097%.

De acordo com a oitava edição da Farmacopeia Europeia, nas formulações de  $^{18}\text{FLT}$ , os limites dos solventes etanol e acetonitrila são 10% (V/V) e 0,04% (m/V), respectivamente. Desta maneira, o radiofármaco produzido de forma semiautomática não apresentou valores de solventes residuais acima do limite estabelecido na literatura (EP, 2013).

**Figura 17 –Gráfico de cromatografia a gás, mostrando os solventes residuais da síntese de <sup>18</sup>FLT. Em zoom, pico da acetonitrila.**



Em relação ao controle de qualidade microbiológico, foram realizados os testes de esterilidade e endotoxinas bacterianas de duas amostras de sínteses independentes. A concentração de endotoxinas bacterianas foi determinada pelo método cinético-colorimétrico com auxílio do equipamento Endosafe® Portable Test System (PTS) - Charles River. Uma solução do produto final com diluição de 100 vezes foi aplicada em um cartucho dedicado a este equipamento, 24 horas após a síntese.

O teste teve duração de aproximadamente 15 minutos e forneceu informações quantitativas com resultados expressos em unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL). Os resultados encontrados são mostrados na tabela 7.

**Tabela 7: Dados do ensaio de endotoxinas bacteriana de dois lotes de <sup>18</sup>FLT.**

Parâmetros de análise	Limites	Lotes avaliados	
		1	2
Endotoxinas bacterianas na amostra (EU/mL)	< 17,5	<5,00	<5,00
Coefficiente de Variação 1 (Sample RXN time CV%)	< 25	0,0	0,0
Coefficiente de Variação 2 (Spike RXN time CV%)	< 25	1,1	5,2
Recuperação do Spike (%)	50-200	89	77

Os resultados evidenciaram que os requisitos para teste de endotoxinas bacterianas foram atingidos nas amostras analisadas.

O ensaio de esterilidade foi, como o teste de endotoxinas, realizado 24 horas após a síntese. Alíquotas de 0,5 mL do radiofármaco foram e transferidos assepticamente para os meios de cultura específicos e incubados. Após 14 dias, nenhuma das amostras inoculadas nos meios específicos apresentou crescimento microbiano, evidenciando que o produto manteve sua esterilidade.

#### 4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTES RESIDUAIS

Apesar de ser uma metodologia já utilizada no controle da qualidade do  $^{18}\text{FDG}$ , tornou-se necessário validar um novo método para investigação dos solventes residuais em  $^{18}\text{FLT}$ , por meio de cromatografia a gás, uma vez que alterações na velocidade do fluxo do gás de arraste, no fluxo de gás hidrogênio na temperatura de corrida foram feitas, para adaptação às análises deste novo radiofármaco. Assim, as alterações feitas originaram uma nova metodologia, não presente em nenhuma farmacopeia.

Para validação da metodologia analítica baseada em Cromatografia a Gás (CG), foram preparadas soluções autênticas com cinco valores de concentração para etanol, tendo como ponto médio a concentração limite de etanol nas amostras; o mesmo procedimento foi repetido para o solvente acetonitrila. Partindo dos resultados para etanol e acetonitrila nas amostras, pode-se observar que estes estão próximo à concentração média de 8% para etanol, e 0,04% para acetonitrila. Logo, esses valores foram tomados como o limite nas amostras, e extrapolados para construção das demais concentrações a serem usadas no processo de validação. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com RDC166/2017, a qual preconiza que a faixa de trabalho, para a determinação de teor de solventes, deve ser de 80% a 120% da concentração limite do analito esperada no produto (BRASIL, 2017).

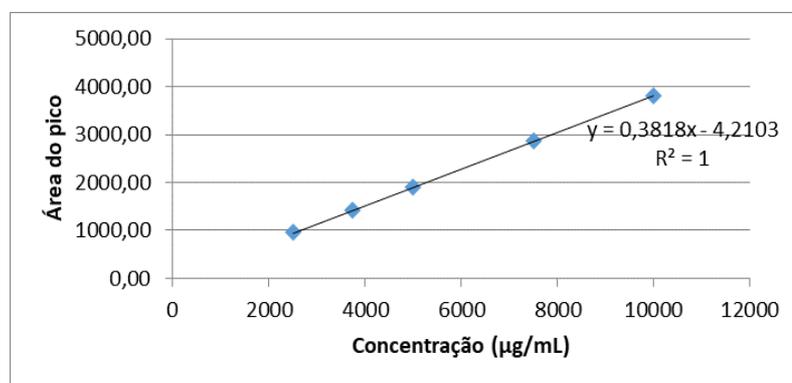
### 4.2.1 Linearidade

Para os testes de linearidade foram observadas três curvas da área dos analitos em função da concentração das amostras, contemplando-se 5 níveis de concentração em cada. Foi observada a relação entre as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) e as áreas dos picos, e a variância da curva de regressão linear foi estimada pelo método dos mínimos quadrados. A figura 18 mostra o gráfico de regressão linear dos resultados referentes a etanol e, bem como seu coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Pode-se observar que as áreas dos picos para etanol aumentam linearmente de acordo com o aumento da concentração nas amostras. Isso permitiu obter coeficiente de correlação da curva ( $R^2$ ) maior do que 0,990, indicando boa linearidade do método.

Através da Análise de Variância ANOVA com 5% de significância (tabela 8), pode-se testar a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada.

**Figura 18: Gráfico da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários de uma das curvas para o etanol.**



O valor de F referente à média quadrática do modelo (168,95) assumiu um valor muito maior que o F-crítico tabelado (3,48) com 4 e 10 graus de liberdade. Para um modelo de regressão, quanto maior o F em relação ao F-crítico, melhor, pois isto significa que o modelo tem maior intervalo de confiança.

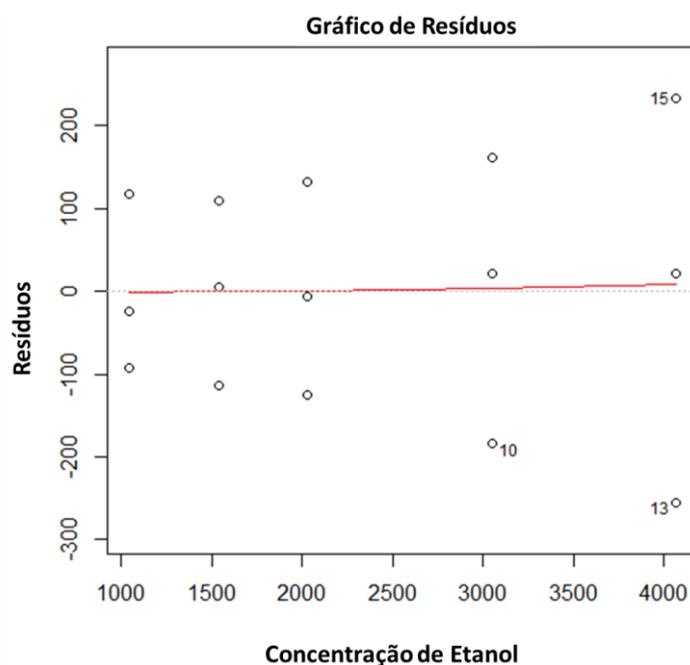
**Tabela 8: Análise de variância para o modelo linear ajustado para uma faixa de concentração de 2.500 a 10.000 µg/ml de Etanol com 95% de intervalo de confiança.**

Fonte da Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	F-crítico
Modelo	4	17704779,5	4426194,88	168,95	3,48
Residual amostral	10	261976,7	26197,67		3,48

Além de fazer os testes F, é necessário também examinar os resíduos deixados pelo modelo validado. O gráfico dos resíduos para etanol (figura 19) mostra que o modelo está bem ajustado. Os resíduos estão distribuídos aleatoriamente e não há nada indicando que a sua variância não é constante ou depende das concentrações de etanol estudadas.

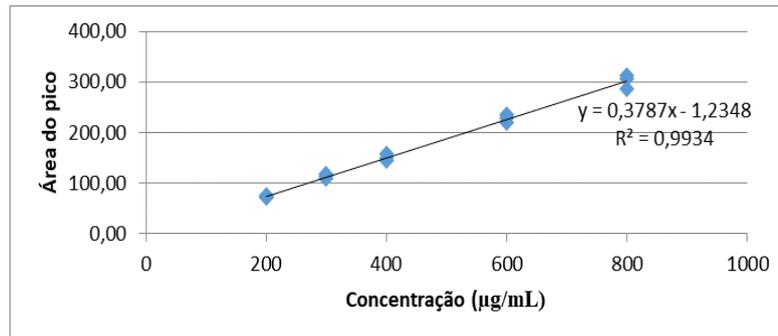
A figura 20 mostra o gráfico de regressão linear dos resultados referentes a acetona, bem como seu coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Novamente, para acetona observa-se coeficiente de correlação dentro dos valores esperados, concluindo que o método de detecção dos solventes residuais da síntese, por meio de cromatografia a gás, apresenta linearidade.

**Figura 19: Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear ajustado para o Etanol.**



No caso da acetonitrila, a reta de regressão apresentou um  $R^2 = 0,9934$ , calculado a partir da relação entre a soma quadrática devido à regressão e a soma quadrática total, concluindo que o modelo conseguiu explicar 99,34% da variância explicável máxima, o que pode ser considerado satisfatório (BRASIL, 2017).

**Figura 20: Gráfico da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários de três curvas para a acetonitrila.**



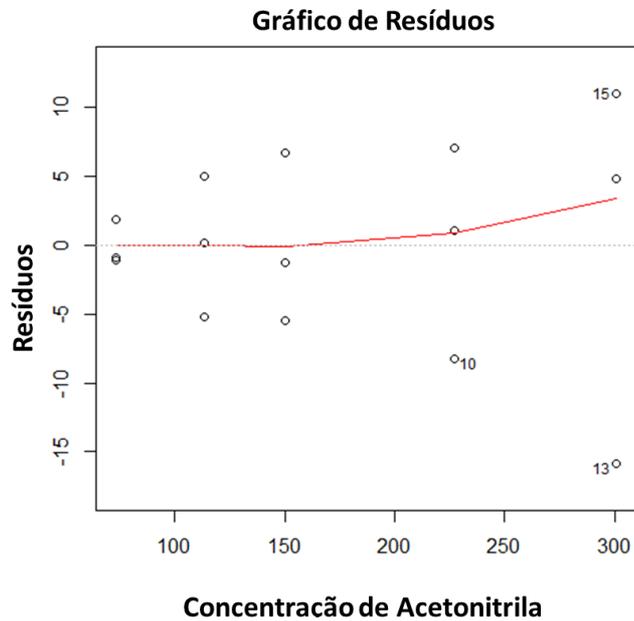
Da mesma forma que os testes com o etanol, os testes com a acetonitrila mostraram um valor de  $F$  referente à média quadrática do modelo (384,41) muito maior que o  $F$ -crítico tabelado (3,48) com 4 e 10 graus de liberdade, novamente demonstrando que o modelo apresenta um seguro intervalo de confiança.

**Tabela 9: Análise de variância para o modelo linear ajustado para uma faixa de concentração de 200 a 800 µg/ml de acetonitrila com 95% de intervalo de confiança.**

Fonte da Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F	F-crítico
Modelo	4	99826,17	24956,54	384,41	3,48
Residual amostral	10	649,20	64,92		3,48

O gráfico dos resíduos para acetonitrila (figura 21), analogamente ao etanol, mostra um modelo bem ajustado, com os resíduos distribuídos aleatoriamente não havendo indicação que sua variância não é constante.

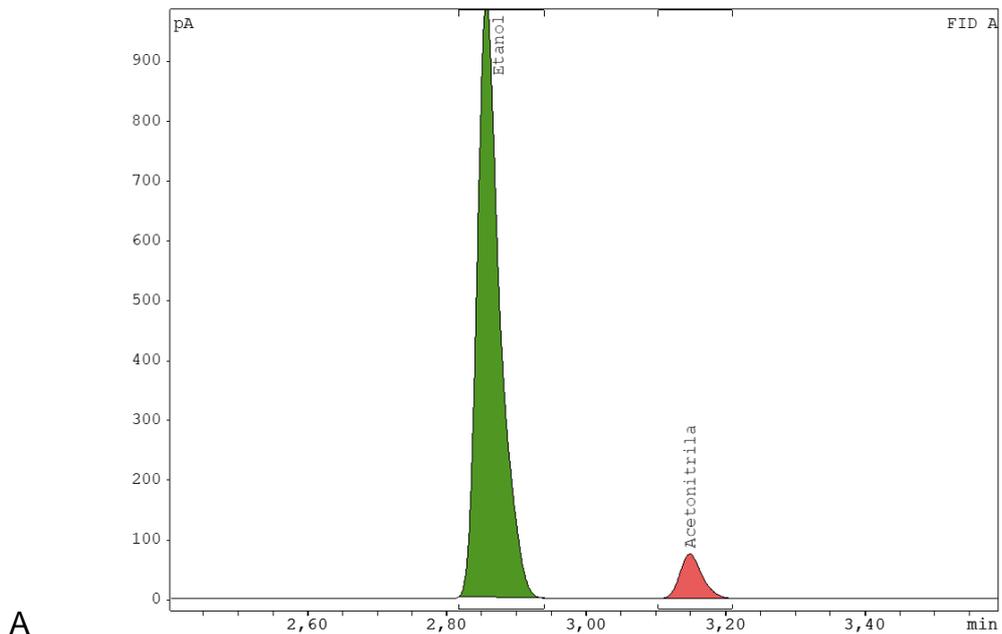
**Figura 21: Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear ajustado para a acetonitrila**



#### 4.2.2 Seletividade

Como preconizado pela RDC 166/2017 da ANVISA, tanto etanol quanto acetonitrila se mostraram em picos separados e bem definidos (figura 22).

**Figura 22: Gráfico de uma análise de solventes residuais por cromatografia a gás, mostrando boa separação (resolução) entre os picos.**



resolução calculada entre os picos foi 2,47. Já a simetria destes foi de 1,741 para etanol e 1,442 para acetonitrila. Isto representou a boa especificidade do método e que todos os analitos, mesmo juntos nas amostras, são mostrados separadamente em diferentes picos, com boa resolução e simetria (maior que 2 e do que 1, como preconizado pelo ICH) nos gráficos obtidos, não se sobrepondo, garantindo que o que foi quantificado através da área dos picos realmente foi apenas o analito de interesse.

#### 4.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

Uma vez observada a linearidade do método, podem ser calculados os valores de LD e LQ, utilizando os mesmos dados do ensaio anterior. A tabela 10 mostra os valores de LD e LQ calculados para etanol e acetonitrila, conforme fórmulas matemáticas já mostradas neste trabalho.

**Tabela 10: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do etanol e da acetonitrila.**

Parâmetro	Etanol	Acetonitril a
LD (µg/mL)	421,1	22,4
LQ (µg/mL)	1276,1	67,8

Os valores de LD e LQ sugerem que o método foi capaz de detectar e quantificar, com segurança, pequenas quantidades dos solventes residuais presentes nas amostras de <sup>18</sup>FLT. Isto porque os limites encontrados estão abaixo das concentrações limite (10.000 µg/mL para etanol e 400 µg/mL para acetonitrila) e rotineira dos solventes nas amostras.

#### 4.2.4 Precisão e exatidão

Como pode ser observado na tabela 11, referente aos ensaios de repetibilidade para o etanol, o maior desvio padrão relativo encontrado foi 3,6% para a concentração de 2.500 µg/ml, o qual não compromete a precisão do método,

segundo a resolução 166 da ANVISA (2017). Nestes mesmos experimentos, a exatidão média foi 101,8%, valor dentro dos limites estabelecidos.

**Tabela 11: Resultados da precisão, por meio da repetibilidade, e da exatidão para etanol.**

Conc. Teórica (µg/ml)	Conc. Prática (µg/mL)				Média	DPR (%)	Exatidão (%)
2500	2580,1	2582,9	2423,1	2528,7	3,6	99,39	
5000	5157,0	5155,6	4852,3	5055,0	3,5	103,30	
10000	10344,2	10514,8	10194,2	10351,1	1,6	102,64	

Para acetonitrila, no ensaio de precisão e exatidão, o maior DPR encontrado foi de 3,2% para a concentração de 400 µg/ml, em um experimento em que a exatidão média foi de 100,9% (tabela 12).

**Tabela 12: Resultados dos ensaios de precisão e exatidão para a acetonitrila.**

Conc. Teórica (µg/mL)	Conc. Prática (µg/mL)				Média	DPR (%)	Exatidão (%)
200	196,5	205,4	197,5	199,8	2,4	99,9	
400	408,0	407,3	385,5	400,3	3,2	100,0	
800	813,6	825,1	829,0	822,6	0,9	102,8	

Com base nos resultados obtidos e nos guias utilizados para validação de metodologias analíticas, pode-se concluir que o método apresentado possui boas precisão e exatidão, o que garante que os valores quantificados se aproximam à quantidade real dos analitos na amostra, já que, com soluções autênticas e de concentrações conhecidas, foi possível atingir os resultados esperados.

#### 4.2.5 Robustez

A variação nos tempos de retenção, nas áreas do pico dos analitos, dentre outros fenômenos, são fatores que indicam a falta de robustez do método cromatográfico. Variações grandes nos tempos de retenção e nas áreas dos picos também podem causar englobamento de um pico no outro, interpretação errônea de um analito, dentre outros, indicando que o método não se manteve robusto. Estas variações podem ser causadas por alterações na temperatura de corrida analítica, bem como no fluxo da fase móvel ou outros parâmetros da análise. É crucial, num processo de validação, conhecer quais parâmetros podem alterar o tempo de retenção dos analitos, bem como a robustez do método.

Para isso, foi analisada a interferência de pequenas mudanças na temperatura e no fluxo da fase móvel do método nos tempos de retenção e nas áreas do pico de etanol e acetonitrila. Vale ressaltar que as mudanças são pequenas devido ao fato de que, numa rotina, as alterações que vierem ocorrer na temperatura e no fluxo da fase móvel não são drásticas e, quando a são, o próprio aparelho as indica. Logo, na validação deve-se simular a rotina de análise. Medido o CV%, é possível determinar se o método foi robusto em todas as situações.

Na tabela 13 pode-se observar que pequenas alterações na temperatura ( $\pm 0,1$  °C) não causam coeficientes de correlação maiores do que 4,03% nas áreas dos picos ou nos tempos de retenção, indicando que o método se mantém robusto nessas condições.

**Tabela 13: Resultado dos ensaios para robustez observando a variação da temperatura (°C) nas áreas do pico e nos tempos de retenção dos analitos.**

Analito	59		60		61		CV% (Área)	CV% (TR)
	Área	TR	Área	TR	Área	TR		
Etanol	1994,1	2,86	2156,98	2,86	2111,41	2,86	4,03	0,00
	1							
Acetonitrila	144,86	3,16	155,75	3,15	152,43	3,15	3,70	0,18

Já quando avaliada a influência do fluxo da fase móvel nas áreas e tempos de retenção (tabela 14), vê-se novamente que o método se mantém robusto, sendo

3,28% o maior coeficiente de correlação encontrado, indicando influência da temperatura na área do pico de etanol. Ainda assim, este coeficiente não afeta a robustez do método.

**Tabela 14: Resultado dos ensaios para robustez observando a variação do fluxo da fase móvel (mL/min) nas áreas do pico e nos tempos de retenção dos analito.**

Analito	2,9		3,0		3,1		CV% (Área)	CV% (TR)
	Área	TR	Área	TR	Área	TR		
Etanol	2075,73	3,02	2139,86	2,93	2205,69	2,84	3,04	3,07
	2							
Acetonitrila	150,19	3,33	154,21	3,22	160,28	3,12	3,28	3,26

#### 4.3 ESTUDO DE PUREZA RADIOQUÍMICA DE <sup>18</sup>FLT FRENTE A DIFERENTES AGENTES

A pureza radioquímica do <sup>18</sup>FLT foi avaliada frente a variação de pH e de temperatura de armazenamento. Além disso, verificou-se a possível influência do emprego do ácido ascórbico, a 10 mg/mL, como agente estabilizante em adição ao etanol. Na tabela 15 podemos ver os resultados de pureza radioquímica, obtidos por CCD, para as amostras citadas.

Segundo a Farmacopeia Europeia, uma das impurezas relacionadas à síntese e degradação de <sup>18</sup>FLT, que pode ser detectada por CCD, é o próprio íon fluoreto. De fato, a autorradiólise dos radiofármacos pode levar à formação de fluoreto livre e mais diversos compostos, dependendo da natureza química do radiofármaco (FAWDRY, 2007).

Poder-se-ia pensar que a temperatura da câmara climática exacerbaria a degradação do <sup>18</sup>FLT, o que não foi verificado no nosso estudo. Quando analisada a influência do estresse térmico na pureza radioquímica do radiofármaco, podemos verificar na tabela 15 que, para ambas as condições, a pureza radioquímica se manteve constante, em relação à pureza obtida inicialmente, ao longo das oito horas de teste, em ambos os grupos analisados. De fato, em estudos envolvendo

temperaturas entre 5 e 40°C, já foi evidenciado que estas temperaturas não influenciam significativamente na pureza radioquímica do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ FDG (DANTAS et al, 2013).

**Tabela 15: Pureza radioquímica dos três lotes de  $^{18}\text{F}$ FLT por cromatografia em camada delgada (CCD).**

Tempo (h)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Ambiente	40 °C	pH 4.5	pH 5.5	Sem ácido ascórbico	Com ácido ascórbico
0	99,68	99,68	99,95	100	93,90	91,88
2	99,70	99,40	100	99,87	92,62	91,27
4	99,61	99,67	99,99	99,78	92,83	91,80
6	99,96	99,58	99,99	99,57	92,73	91,62
8	99,07	99,46	100	99,36	92,33	91,41

Segundo a literatura, outro fator que poderia levar à degradação do  $^{18}\text{F}$ FLT é o pH (SAHA, 1992). Entretanto, em nossas análises verificou-se que a correção do pH para um ponto a mais, ao longo do tempo de estudo do radiofármaco, não levou a diferenças significativas de pureza radioquímica entre a amostra original, contendo valor de pH 4.5, e a amostra corrigida (pH 5,5).

Uma forma de vencer a radiólise é o uso de estabilizantes redutores, que podem retardar a taxa de decomposição e melhorar a vida útil dos radiofármacos (FAWDRY et al., 2007). Dessa forma, também foi investigada a possível ação do ácido ascórbico, um agente estabilizante redutor, na pureza radioquímica do  $^{18}\text{F}$ FLT. Nos resultados deste estudo (tabela 15), verificou-se que, tanto amostra sem adição de ácido ascórbico como a com adição, mantiveram a pureza radioquímica durante todo o tempo de estudo.

Além de realizar as análises em CCD, para verificação da pureza radioquímica, também são necessárias as análises de solventes residuais, tanto para atender aos limites farmacopeicos, bem como para aferir se a concentração de etanol está adequada, assegurando sua capacidade estabilizante e evitando a autorradiólise do radiofármaco. Verificou-se que os teores de etanol e acetoneitrila se mantiveram, em todas condições estudadas, em acordo aos limites especificados.

Além disso, as condições estudadas não provocaram queda na concentração de etanol, o que poderia levar a desestabilização da molécula do radiofármaco. Vale ressaltar que o etanol utilizado na formulação é adicionado na etapa de eluição do produto, e apresenta papel de estabilizante ao radiofármaco (JACOBSON et al., 2009; FAWDRY, 2007).

Poderia-se pensar que, devido ao fato da eluição do  $^{18}\text{FLT}$  empregada neste trabalho ser manual, a quantidade final de etanol estaria reduzida, comprometendo a pureza radioquímica do produto. Porém, mesmo a eluição do produto sendo manual, observou-se que a concentração de etanol no produto foi próxima à encontrada na maioria dos protocolos existentes na literatura (entre 6 a 10% de etanol).

Em relação à pureza química dos grupos estudados neste tópico, não foi observada a formação de impurezas radiomarcadas, tampouco extrapolação da quantidade de impurezas não radiomarcadas acima do limite preconizado (0.1 mg/mL), quando as amostras foram analisadas por CLAE.

A partir dos resultados, concluiu-se que a pureza radioquímica de  $^{18}\text{FLT}$  se mantém e, média, até oito horas após a síntese, em todas condições estudadas.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- $^{18}\text{FLT}$  foi sintetizado Divisão de Produção Radiofármacos do CRCN-NE/CNEN, bem como foi realizado o controle da qualidade do produto. O rendimento radioquímico médio das sínteses foi  $3,97 \pm 1,31\%$ .
- As metodologias para controle da qualidade do radiofármaco foram estabelecidas e, quando necessário, validadas. Todos os critérios farmacopeicos, com base na monografia da Farmacopeia Europeia de  $^{18}\text{FLT}$  e outros compêndios oficiais foram alcançados.
- O processo de validação da Cromatografia a Gás atingiu os requisitos preconizados, o que garantiu a confiabilidade das concentrações de solventes residuais nas amostras.
- A pureza radioquímica do produto foi investigada frente a diversos fatores. Em todas, o nível de pureza se manteve estável ao longo de todo o estudo.
- Como perspectiva futura, deverá ser implementada a purificação automatizada de  $^{18}\text{FLT}$  e os processos de Boas Práticas de Fabricação, como preconizado pela ANVISA.

## REFERÊNCIAS

AVRIL, N. et al. Breast imaging with positron emission tomography and fluorine-18 fluorodeoxyglucose: use and limitations. **J Clin Onc.** v. 18(20), p. 495-502, 2000.

BADING, J. R.; SHIELDS, A. F. Imaging of cell proliferation: status and prospects. **Journal of nuclear medicine.** v. 49 Suppl 2, n. 6, p. 64S--80S, 2008.

BALLINGER, J. R. et al. The Radiopharmacy - A technologist's guide. **European Association of Nuclear Medicine.** p. 51, 2008.

BARTHEL, H. et al. 3'-Deoxy-3'-[18F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. **Cancer Research.** v. 63, n. 13, p. 3791–3798, 2003.

BASU, S. et al. Fundamentals of PET and PET/CT imaging. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 1228, n. 1, p. 1–18, 2011.

BEEN, L. B. et al. [18F]FLT-PET in oncology: Current status and opportunities. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.** 2004.

BERGER, K.L. et al. FDG PET Evaluation of Mucinous Neoplasms: Correlation of FDG Uptake with Histopathologic Features. **AJR.** v. 174, p. 1005-1008, 2000.

BRASIL – ANVISA (2003) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Publicada no Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA. Farmacopéia Brasileira. Diário Oficial da União. v. 1, p. 546, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução RDC nº. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de

métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BUCK, A. K. et al. Imaging proliferation in lung tumors with PET: F-18-FLT versus F-18-FDG. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 44, n. 9, p. 1426–1431, 2003.

BURGER, I. A. et al. Repeatability of FDG quantification in tumor imaging: Averaged SUVs are superior to SUVmax. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 39, n. 5, p. 666–670, 2012.

BROSSARD, D.; LEGROS, V.C.; MANCIET, S.C.; SOUVERAIN, S.F.; LAGARCE, F.; ODOU, P.; ROY, S.; SADEHIPOUR, F.; SOUTOU, V. Methodological guidelines for stability studies pharmaceutical preparations – Part 1: liquid preparations. 1<sup>o</sup> Edição, Paris: Société Française de Pharmacie Clinique, 2013.

CAIRNS, R.; HARRIS, I.; MAK, T. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer**. v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.

CEMBER, Herman; JOHNSON, Thomas E. Introduction to health physics. 4<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Companies, 2009.

CHEN et al. Imaging Proliferation in Brain Tumors with <sup>18</sup>F-FLT PET: Comparison with <sup>18</sup>F-FDG. **J Nucl Med**. v. 46, p. 945–952, 2005.

CHUNG, J. K. Sodium iodide symporter: Its role in nuclear medicine. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 43, n. 9, p. 1188–1200, 2002.

CLOWNEY, L. et al. Geometric parameters in nucleic acids: Nitrogenous bases. **Journal of the American Chemical Society**. v. 118, n. 3, p. 509–518, 1996.

DANTAS, N.M.; NASCIMENTO, J.E.; MAGALHÃES, N.S.S.; OLIVEIRA, M.L. Radiolysis of 2-[<sup>18</sup>F] Fluoro-2-deoxy-d-glucose ([<sup>18</sup>F]-FDG) and the role of ethanol, radioactive concentration and temperature of storage. **Applied Radioation and Isotopes**, v. 72, n. 158, 2013.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**. v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.

DE SAINT-HUBERT, M.; BREPOELS, L.; MOTTAGHY, F. M. Can evaluation of targeted therapy in oncology be improved by means of <sup>18</sup>F-FLT? **Journal of nuclear medicine**. v. 51, n. 10, p. 1499–500, 2010.

DITTMANN, H. et al. Early changes in [<sup>18</sup>F]FLT uptake after chemotherapy: An experimental study. **European Journal of Nuclear Medicine**. v. 29, n. 11, p. 1462–1469, 2002.

ELSINGA, P. H. Present and future of PET-radiopharmaceuticals. **Nuclear Medicine Review**. v. 15, n. SUPPL.C, p. 13–16, 2012.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, “[<sup>18</sup>F] Fludeoxyglucose Injection”. Concil of Europe. 7th Edition, Vol IV, General monograph 1325; 2013.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, “Alovudine[<sup>18</sup>F] Injection”.8th Edition, Vol I, General monograph 1045; 2013.

FAWDRY, R.M. 2007. Radiolysis of 2-[<sup>18</sup>F] fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and the role of reductant stabilisers. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, n. 11, p. 1193–1201, 26 june 2007.

FERREIRA, L. M. R. Cancer metabolism: The Warburg effect today. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 89, n. 3, p. 372–380, 2010.

FLEXNER, C.; VAN DER HORST, C.; JACOBSON, M.; POWDERLY, W.; DUNCANSON, F.; GANES, D.; BARDITCH-CROVO, P.; PETTY, B.; BARON, P.; ARMSTRONG, D. et al. Relationship between plasma concentrations of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials. **Journal of Infectious Diseases**. v. 170, n. 6, p. 1394-1403, 1994.

FUCHS, K. et al. In Vivo Imaging of Cell Proliferation Enables the Detection of the Extent of Experimental Rheumatoid Arthritis by 3'-Deoxy-3'-<sup>18</sup>F-Fluorothymidine and Small-Animal PET. **J Nucl Med**. v. 54, p. 151–159, 2013.

FUKUMORI, Neuza T. O. “Determinação de Endotoxina Bacteriana (Pirogênio) em Radiofármacos pelo Método de Formação em Gel”. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas, IPEN/CNEN, São Paulo, 2008. 77 p

GAMBHIR, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. **Nat Rev Cancer**. v. 2, n. 9, p. 683–693, 2002.

GRIERSON, J. R.; SHIELDS, A. F. Radiosynthesis of 3'-Deoxy-3'-<sup>18</sup>F-fluorothymidine: [<sup>18</sup>F]FLT for Imaging of Cellular Proliferation In Vivo. **Science**. v. 27, n. 99, p. 143–156, 2000.

GROVES, A. M. et al. Non-<sup>18</sup>F-FDG PET in clinical oncology. **Lancet Oncology**. v. 8, n. 9, p. 822–830, 2007.

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (vídeo digital). Disponível em: <<https://vimeo.com/70641457>>. Acesso em: 09/jan/2017.

HERRMANN, K. et al. Comparison of 3-deoxy-3-<sup>18</sup>F-fluorothymidine positron emission tomography (FLT PET) and FDG PET/CT for the detection and characterization of pancreatic tumours. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. v. 39, n. 5, p. 846–851, 2012.

HUNG, J. C. Comparison of Various Requirements of the Quality Assurance Procedures for <sup>18</sup>F-FDG Injection. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 43, p. 1495-1506, 2002.

HUNG, J. C. Comparison of various requirements of the quality assurance procedures for (<sup>18</sup>F)-FDG injection. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**. v. 43, n. 11, p. 1495–1506, 2002.

IAEA. Cyclotron produced radionuclides: Principles and practice. Vienna, 2008.

IAEA. Cyclotron produced radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods. Vienna, 2009.

IAEA. Cyclotron Produced Radionuclides: Guidance on Facility Design and Production of [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglucose (FDG). IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series, n. 3, p. 153, 2012.

ICH- Internacional Conference on Harmonisation. Guidance for Industry Q2B. Test on Validation of Analytical Procedures. Nov., 1996

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: 2016. 126 p. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em 15 fev. 2017.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: 2018. 130 p. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 24 mai. 2018.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2. ed. 1997. v. 66.

JACOBSON, M. S.; DANKWART, H. R.; MAHONEY, D. W. Radiolysis of 2-[<sup>18</sup>F] fluoro-2-deoxy-D-glucose ([<sup>18</sup>F] FDG) and the role of ethanol and radioactive concentration. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 67, p. 990-995, 2009.

JIMENEZ, R.; ROCO, E.; CAMPOS, A.; CORDERO, R.; LIARTE, T.; BENITEZ, S.; BAJEN, L.; FERRAN, S.; PUCHAL, A.; GAMEZ, C. Influence of radioactive concentration and storage on radiochemical purity of <sup>18</sup>F-FDG. *Revista Española de Medicina Nuclear*, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2006.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KARWATH, P.; SARTOR, J.; GRIES, W.; WODARSKI, C.; DITTMAR, C.; BIRSACK, H. J.; GUHLKE, S. Steam Sterilization and Automatic Dispensing of [18F] fludeoxyglucose (FDG) for injection. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, p. 577–586, 2005.

KIM, B. et al. Localized Form of Bronchioloalveolar Carcinoma: FDG PET Findings. **AJR**. v. 170, p. 935-939, 1998.

KINAHAN, P. E. et al. Attenuation correction for a combined 3D PET/CT scanner. **Medical Physics Med. Phys. Med. Phys. Phys.** v. 25, n. 10, p. 82509–3179, 1998.

KLATT, E.C. The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. Disponível em < <http://library.med.utah.edu/WebPath/NEOHTML/NEOPL101.html>>. Acesso em: 23, fev., 2017.

KONG, Wei; ENGEL, Karen; WANG, Joanne. “Mammalian Nucleoside Transporters”. **Current Drug Metabolism**. v. 5, p 63 – 84, 2004.

KOSTAKOGLU, L.; AGRESS, H.; GOLDSMITH, S. J. Clinical role of FDG PET in evaluation of cancer patients. **Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc.** v. 23, n. 2, p. 315–40, 2003.

KOWALSKY, R. J.; FALEN, S. W. **Radiation detection and measurement**. In: LANDIS, N. T. (Ed.) *Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine*. Universidade de Michigan: American Pharmacists Association, 2004. p. 39-70.

LANGEN P, ETZOLD Z, HINTSCHE R, et al “3′deoxy-3′fluorothymidine, a new selective inhibitor of DNA synthesis” **Acta Biol Med Ger.** v. 23, p. 759–66, 1969.

LIND, P. et al. Advantages and limitations of FDG PET in the follow-up of breast cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. v.31(1), p. 126-134, 2004.

LIU, C.-J. et al. High  $^{18}\text{F}$ -fluorothymidine uptake for invasive thymoma. **Clinical nuclear medicine**. v. 37, n. 10, p. 991–992, 2012.

MACHULLA, H.J., et al “Simplified labeling approach for synthesizing 3'-deoxy-3'-fluorothymidine ([ $^{18}\text{F}$ ]FLT)” **J. Radioanal. Nucl. Chem**. Vol 243(3). 2000. p 843–6.

MARTIN, S. J. et al. A new precursor for the radiosynthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]FLT. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 29, n. 2, p. 263–273, 2002.

MARTINEZ, T.; LEIVA, L. Formulation of  $^{18}\text{F}$ -FDG: pH Adjustment of Buffered Solution. **J Nucl Med Technol**. v. 40, p. 48-49, 2012.

MENEZES, L. J. et al. Vascular inflammation imaging with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT: when to image? **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**. v. 50, n. 6, p. 854–7, 2009.

MOLTHOFF, C. F. M. et al. Monitoring response to radiotherapy in human squamous cell cancer bearing nude mice: Comparison of 2-deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-d- glucose (FDG) and 3-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-3-deoxythymidine (FLT). **Molecular Imaging and Biology**. v. 9, n. 6, p. 340–347, 2007.

MONTRAVERS, F. et al. Evaluation of FDG Uptake by Renal Malignancies (Primary Tumor or Metastases) Using a Coincidence Detection  $\gamma$ -Camera. **The Journal of Nuclear Medicine**. v. 41(1), p. 78-84, 2000.

MUIJS, C. T. et al.  $^{18}\text{F}$ -FLT-PET for detection of rectal cancer. **Radiotherapy and Oncology**. v. 98, n. 3, p. 357–359, 2011.

MURAKAMI, H. **Norwegian wood**. 1<sup>a</sup> ed. Japão: Civilization, 2004.

NASCIMENTO, Leonardo T. Constantino. Síntese, controle de qualidade e ensaios de eficácia e toxicidade in vitro do radiofármaco [18F]Fluortimidina (18FLT). 2014. 129 p.

NESTLE, U. et al. Comparison of different methods for delineation of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-positive tissue for target volume definition in radiotherapy of patients with non-Small cell lung cancer. **The Journal of Nuclear Medicine**. v. 46, n. 8, p. 1342–1348, 2005.

NOYES, H. P.; BONNER, W. A.; TOMLIN, J. On the origin of biological chirality via natural beta-decay. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**. v. 8, n. 1, p. 21–23, 1977.

OH, S. J. et al. Fully automated synthesis system of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine. **Nuclear medicine and biology**. v. 31, p. 803–809, 2004.

OLLINGER, J. M.; FESSLER, J. A. Positron emission tomography. **IEEE Signal Processing Magazine**. v. 14, n. 1, p. 43–55, 1997.

PAPROSKI, R. J. et al. Biodistribution and uptake of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine in ENT1-knockout mice and in an ENT1-knockdown tumor model. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**. v. 51, p. 1447–1455, 2010.

PASCALI, C. et al. Simple preparation and purification of ethanol-free solutions of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine by means of disposable solid-phase extraction cartridges. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 39, n. 4, p. 540–550, 2012.

PHELPS, M. E. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97, n. 16, p. 9226–9233, 2000.

PIERCE, B. **Genética: Um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

POZZO, Lorena. Tomografia por emissão de pósitrons com sistemas PET/SPECT: um estudo da viabilidade de quantificação. 2005. 216 págs.

RAICHLE, M. E. Positron Emission Tomography. **Ann. Rev. Neuro.** v. 6, p. 1650–1653, 1983.

ROBILOTTA, C. C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Pan AM J Public Health.** v. 20, n. 2–3, p. 134–142, 2006.

RUEGER, M. A. et al. [18F]FLT PET for Non-Invasive Monitoring of Early Response to Gene Therapy in Experimental Gliomas. **Molecular imaging and biology.** v. 13, n. June 2010, p. 547–557, 2011.

SAHA, GB. Quality control of radiopharmaceuticals. In: Saha GB, ed. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag; 1992:143-167.

SAHA, G. B. “Fundamentals of nuclear pharmacy”. Springer, 1998. p. 34-170.

SAHA, G. B. “Basics of PET imaging physics, chemistry, and regulations” 1<sup>a</sup> ed. Cleveland/EUA, Springer. 2005. p 19-36.

SCOTT, P.J.H.; HOCKLEY, B.G. “Radiochemical Syntheses-Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography”. New Jersey/EUA, John Wiley and Sons. Vol 1. 2012. p 3-14.

SHIELDS, A. F. et al. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. **Nature Medicine.** v. 4, n. 11, p. 1334–1336, 1998.

SHIELDS, A. F. PET Imaging with <sup>18</sup>F-FLT and Thymidine Analogs : Promise and Pitfalls. **The Journal of Nuclear Medicine.** v. 44, n. 9, p. 1432–1434, 2003.

SHIELDS, A. F. et al. A simplified analysis of [18F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine metabolism and retention. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**. v. 32, n. 11, p. 1269–1275, 2005.

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: Is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. **Oral Oncology**. v. 38, n. 5, p. 407–415, 2002.

SMYCZEK-GARGYA, B. et al. PET with [18F]fluorothymidine for imaging of primary breast cancer: a pilot study. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**. v. 31, n. 5, p. 720–4, 2004.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**. v. 21, n. 2, p. 201–230, 2004.

TANG, G., WANG, M., TANG, X., GAN, M., LUO, L. Fully automated one-pot synthesis of [18F]fluoromisonidazole. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 32. p. 553–558, 2005.

TENG, B.; WANG, S.; FU, Z.; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L. Semiautomatic synthesis of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine using three precursors. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 64, p. 187–193, 2006.

TURNER, James E. Atoms, radiation and radiation protection. 3. ed. Weinheim: Wiley, 2007.

TEWSON, T. J.; KROHN, K. A. PET radiopharmaceuticals: State-of-the-art and future prospects. **Seminars in Nuclear Medicine**. v. 28, n. 3, p. 221–234, 1998.

THEOBALD, T. Sampson's Textbook of Radiopharmacy. 4. ed. London: PHARMACEUTICAL Press, 2011

U. S. P. C. C. United States Pharmacopeia, The National Formulary 2012: USP 35 NF 30. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 2012.

VANDER HEIDEN, M.; CANTLEY, L.; THOMPSON, C. Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. **Science**. v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

VESSELLE, H. et al. In Vivo Validation of 3' deoxy-3' - [18 F] fluorothymidine ([ 18 F ] FLT) as a Proliferation Imaging Tracer in Humans : Correlation of [ 18F ] FLT Uptake by Positron Emission Tomography with Ki-67 Immunohistochemistry and Flow Cytometry in Human Lung. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 43, p. 1688–98, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Media Panamericana, 2006.

WAGNER, M. et al. 3-[18 F]Fluoro-3-Deoxythymidine ([18 F]-FLT) as Positron Emission Tomography Tracer for Imaging Proliferation in a Murine B-Cell Lymphoma Model and in the Human Disease. **Cancer Research**. v. 63, n. 27, p. 2681–2687, 2003.

WELCH, M.J.; REDVANLY, C.S. “Handbook of Radiopharmaceuticals Radiochemistry and Applications” Wiley & Sons. 2003. Cap 2;8;9. p 71-86; 283-298; 307-322

YAMAMOTO, Y. et al. Comparison of 18F-FLT PET and 18F-FDG PET for preoperative staging in non-small cell lung cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. v. 35, n. 2, p. 236–245, 2008.

YAMANE, T. et al. 18F-FLT PET performs better than 18F-FDG PET in differentiating malignant uterine corpus tumors from benign leiomyoma. **Annals of Nuclear Medicine**. v. 26, n. 6, p. 478–484, 2012.

YU, S. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**. v. 2, n. 4, 2006.

YUN, M. et al. High radiochemical yield synthesis of 3-deoxy-3-[18F]fluorothymidine using (5-O-dimethoxytrityl-2-deoxy-3-O-nosyl--D-threo pentofuranosyl)thymine and

its 3-N-BOC-protected analogue as a labeling precursor. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 30, n. 2, p. 151–157, 2003.

ZANETTE, Camila. Estudo da produção do radiofármaco FLT-18F em sistema automatizado: contribuição para validação do processo. 2013. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo.

ZHANG, C. C. et al. [18F]FLT-PET imaging does not always “Light up” proliferating tumor cells. **Clinical Cancer Research**. v. 18, n. 5, p. 1303–1312, 2012.

ZHAO, Y.; BUTLER, E. B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell death & disease**. v. 4, n. 3, p. e532, 2013.

**APÊNDICE A - SCRIPT PARA SÍNTESE DE <sup>18</sup>FLT EM MÓDULO SYNTHERA<sup>®</sup>,  
VERSAO 1.**

1,0,ID,KitIn,1,C-468h,21,  
 2,0,SA,Prs,300,\_,\_,reset,  
 3,0,SD,V15,0,\_,\_,reset,  
 4,0,SD,V16,0,\_,\_,reset,  
 5,0,SD,V17,0,\_,\_,reset,  
 6,0,SD,V01,0,\_,\_,  
 7,0,SD,V02,0,\_,\_,  
 8,0,SD,V03,0,\_,\_,  
 9,0,SD,V04,0,\_,\_,  
 10,0,SD,V05,0,\_,\_,  
 11,0,SD,V06,0,\_,\_,  
 12,0,SD,V07,0,\_,\_,  
 13,2,SD,V08,0,\_,\_,  
 30,0,SD,V01,1,\_,\_,CHECK V1,  
 37,0,WD,iV1a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV1b,0,\_,\_,  
 51,0,SD,V01,0,\_,\_,  
 59,0,WD,iV1a,0,\_,\_,  
 67,0,WD,iV1b,1,\_,\_,  
 30,0,SD,V02,1,\_,\_,CHECK V2,  
 37,0,WD,iV2a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV2b,0,\_,\_,  
 51,0,SD,V02,0,\_,\_,  
 59,0,WD,iV2a,0,\_,\_,  
 67,0,WD,iV2b,1,\_,\_,  
 30,0,SD,V03,1,\_,\_,CHECK V3,  
 37,0,WD,iV3a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV3b,0,\_,\_,  
 51,0,SD,V03,0,\_,\_,  
 59,0,WD,iV3a,0,\_,\_,  
 67,0,WD,iV3b,1,\_,\_,  
 30,0,SD,V04,1,\_,\_,CHECK V4,  
 37,0,WD,iV4a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV4b,0,\_,\_,  
 51,0,SD,V04,0,\_,\_,  
 59,0,WD,iV4a,0,\_,\_,  
 67,0,WD,iV4b,1,\_,\_,  
 30,0,SD,V06,1,\_,\_,CHECK V6,  
 37,0,WD,iV6a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV6b,0,\_,\_,  
 51,0,SD,V06,0,\_,\_,  
 59,0,WD,iV6a,0,\_,\_,  
 67,0,WD,iV6b,1,\_,\_,  
 30,0,SD,V07,1,\_,\_,CHECK V7,  
 37,0,WD,iV7a,1,\_,\_,  
 44,0,WD,iV7b,0,\_,\_,

51,0,SD,V07,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV7a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV7b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V08,1,\_,\_ CHECK V8,  
37,0,WD,iV8a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV8b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V08,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV8a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV8b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V01,1,\_,\_ CHECK V1,  
37,0,WD,iV1a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV1b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V01,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV1a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV1b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V02,1,\_,\_ CHECK V2,  
37,0,WD,iV2a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV2b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V02,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV2a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV2b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V03,1,\_,\_ CHECK V3,  
37,0,WD,iV3a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV3b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V03,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV3a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV3b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V04,1,\_,\_ CHECK V4,  
37,0,WD,iV4a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV4b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V04,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV4a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV4b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V06,1,\_,\_ CHECK V6,  
37,0,WD,iV6a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV6b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V06,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV6a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV6b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V07,1,\_,\_ CHECK V7,  
37,0,WD,iV7a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV7b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V07,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV7a,0,\_,\_,  
67,0,WD,iV7b,1,\_,\_,  
30,0,SD,V08,1,\_,\_ CHECK V8,  
37,0,WD,iV8a,1,\_,\_,  
44,0,WD,iV8b,0,\_,\_,  
51,0,SD,V08,0,\_,\_,  
59,0,WD,iV8a,0,\_,\_,

67,0,WD,iV8b,1,\_,\_,  
 75,0,SD,Pmp,1,\_,reset,  
 76,0,SA,Tmp,65,\_,pre-heat,  
 77,0,SD,V16,1,\_,purge,  
 78,30,SA,Prs,75,\_,purge,  
 79,0,SD,V16,0,\_,end purge,  
 80,0,SA,Prs,0,\_,vac test,  
 81,0,WA,Prs,1,12,PUMPING,  
 82,10,SA,Prs,300,\_,TESTING,  
 83,0,WA,Prs,0,9,VAC TEST,  
 84,0,SD,V16,1,\_,Pressure,  
 85,0,WA,Prs,205,222,Waiting,  
 86,10,SD,V16,0,\_,Testing,  
 87,0,WA,Prs,200,222,PRES TEST,  
 88,0,SD,V16,1,\_,Purge tubes,  
 89,0,SD,V06,1,\_,Tube 1,  
 90,30,SD,V01,1,\_,Tube 1,  
 91,0,WA,Prs,1,205,Test Tube 1,  
 92,0,SD,V06,0,\_,Tube 1,  
 93,0,SD,V01,0,\_,Tube 1,  
 94,3,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 95,0,WA,Prs,1,190,Test Tube 2,  
 96,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 97,1,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 98,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 99,1,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 100,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 101,1,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 102,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 103,1,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 104,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 105,1,SD,V02,1,\_,Tube 2,  
 106,1,SD,V02,0,\_,Tube 2,  
 107,3,SD,V03,1,\_,Tube 3,  
 108,0,WA,Prs,1,200,Test Tube 3,  
 109,0,SD,V03,0,\_,Tube3,  
 110,3,SD,V04,1,\_,Tube 4,  
 111,0,WA,Prs,1,200,Test Tube 4,  
 112,0,SD,V04,0,\_,Tube 4,  
 113,0,SD,V16,0,\_,Done ,  
 114,0,SD,V15,1,\_,Flow test,  
 115,15,SA,Prs,0,\_,Flow Test,  
 116,0,WA,Prs,25,35,FLOW TEST,  
 117,0,SA,Prs,300,\_,Done ,  
 118,0,SD,V15,0,\_,Done ,  
 119,0,SD,Pmp,0,\_,pump off,  
 120,0,WA,Tmp,60,70,TEMP TEST,  
 121,0,SD,Snd,1,\_,beep,  
 122,0,SD,Snd,0,\_,beep,  
 123,0,SD,Snd,1,\_,beep,

124,0,SD,Snd,0,\_,\_,beep,  
125,0,SD,Snd,1,\_,\_,beep,  
126,0,SD,Snd,0,\_,\_,beep,  
127,0,WD,GrnBtn,0,\_,\_,READY,  
128,0,SD,V16,1,\_,\_,  
129,0,SD,V08,1,\_,\_,Purge,  
130,0,SD,V07,1,\_,\_,purge,  
131,0,SD,Pmp,1,\_,\_,  
132,0,SD,V05,1,\_,\_,F18,  
133,60,SD,V17,1,\_,\_,F18,  
134,0,SD,V17,0,\_,\_,F18,  
135,0,SD,V16,0,\_,\_,stop purge,  
136,0,SD,V08,0,\_,\_,stop Purge,  
137,2,SD,V07,0,\_,\_,stop purge,  
138,1,SD,V06,1,\_,\_,  
139,0,SD,V05,0,\_,\_,  
140,0,SD,V15,0,\_,\_,Krypto,  
141,1,SD,V16,1,\_,\_,Krypto,  
142,2,SD,Htr,1,\_,\_,  
143,5,SD,V01,1,\_,\_,pressurize vial,  
144,1,SD,V16,0,\_,\_,Krypto,  
145,25,SA,Prs,90,\_,\_,Krypto,  
146,10,SA,Prs,60,\_,\_,Krypto,  
147,10,SA,Prs,30,\_,\_,Krypto,  
148,10,SD,V05,1,\_,\_,Krypto,  
149,0,SD,V05,0,\_,\_,Krypto,  
150,0,SD,V01,0,\_,\_,Krypto,  
151,0,SD,V06,0,\_,\_,  
152,0,SA,Tmp,110,\_,\_,EVAP TEMP,  
153,0,SA,Prs,0,\_,\_,EVAP PRES,  
154,300,SD,V15,1,\_,\_,EVAPORATION,  
152,0,SA,Tmp,95,\_,\_,DRY TEMP,  
155,45,SD,V15,0,\_,\_,DRY,  
189,0,SA,Tmp,100,\_,\_,PURGE TEMP,  
156,2,SD,V16,1,\_,\_,purge,  
157,2,SD,V16,0,\_,\_,purge,  
158,2,SD,V16,1,\_,\_,purge,  
159,2,SD,V16,0,\_,\_,purge,  
160,2,SD,V16,1,\_,\_,purge,  
161,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
162,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
163,45,SD,V16,0,\_,\_,PURGE2,  
164,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
165,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
166,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
167,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
168,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
169,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
170,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
163,45,SD,V16,0,\_,\_,PURGE3,

164,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
165,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
166,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
167,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
168,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
169,2,SD,V16,0,\_,\_,purge  
170,2,SD,V16,1,\_,\_,purge  
187,45,SD,V16,0,\_,\_,last DRY,  
189,0,SA,Tmp,100,\_,\_,SET REACT TEMP,  
192,10,SD,V02,1,\_,\_,n BOC,  
193,2,SD,V15,1,\_,\_,n BOC,  
194,5,SD,V15,0,\_,\_,n BOC,  
195,2,SD,V02,0,\_,\_,n BOC,  
197,1,SD,V15,1,\_,\_,PRESSURIZE,  
198,1,SD,Pmp,0,\_,\_,PUMP OFF,  
199,2,SA,Prs,100,\_,\_,PRESSURIZE,  
200,0,SD,V15,0,\_,\_,PRESSURIZE,  
201,300,SA,Prs,300,\_,\_,SEAL OFF,  
203,4,SD,V16,1,\_,\_,PRESSURIZE,  
159,5,SD,V03,1,\_,\_,PRESSURIZE V3,  
160,1,SD,V03,0,\_,\_,PRESSURIZE V3,  
161,1,SD,V16,0,\_,\_,  
162,0,SD,Pmp,1,\_,\_,PUMP ON,  
163,1,SA,Prs,0,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
164,10,SD,V15,1,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
165,2,SA,Prs,100,\_,\_,PRESSURIZE,  
166,0,SD,V15,0,\_,\_,  
167,6,SD,V03,1,\_,\_,HCl,  
168,6,SA,Prs,80,\_,\_,HCl,  
169,2,SD,V03,0,\_,\_,HCl,  
170,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
171,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
172,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
173,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
174,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
175,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
176,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
177,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
178,3,SA,Prs,100,\_,\_,MIX W AIR,  
179,2,SD,V16,1,\_,\_,MIX,  
180,2,SD,V16,0,\_,\_,MIX,  
181,2,SD,V16,1,\_,\_,MIX,  
182,2,SD,V16,0,\_,\_,MIX,  
183,2,SD,V16,1,\_,\_,MIX,  
184,2,SD,V16,0,\_,\_,MIX,  
185,1,SD,V15,1,\_,\_,PRESSURIZE,  
186,1,SD,Pmp,0,\_,\_,PUMP OFF,  
187,2,SA,Prs,100,\_,\_,PRESSURIZE,  
188,0,SD,V15,0,\_,\_,PRESSURIZE,  
189,1,SA,Prs,300,\_,\_,SEAL REACTOR,

190,300,SD,Htr,1,\_,\_,HYDROLYSIS,  
191,1,SD,Htr,0,\_,\_,END OF HYDROLYSIS,  
192,3,SD,V15,1,\_,\_,PRESSURIZE,  
193,4,SD,V04,1,\_,\_,PRESSURIZE V4 Hidroxido 1M,  
194,1,SD,V04,0,\_,\_,PRESSURIZE V4 Hidroxido 1M,  
195,1,SD,V15,0,\_,\_,  
196,5,SA,Tmp,15,\_,\_,  
197,0,SD,V15,1,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
198,10,SA,Prs,150,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
199,10,SD,Pmp,1,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
200,10,SA,Prs,0,\_,\_,FLUSH / COOLDOWN,  
201,20,SD,V04,1,\_,\_,adicao hidroxido 1M,  
202,0,SD,V04,0,\_,\_,adicao hidroxido 1M,  
203,5,SA,Prs,80,\_,\_,MIX W AIR,  
204,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
205,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
206,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
207,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
208,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
209,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
210,1,SD,V07,1,\_,\_,MIX W AIR,  
211,0,SD,V07,0,\_,\_,MIX W AIR,  
212,1,SD,Pmp,0,\_,\_,PUMP OFF,  
213,6,SA,Prs,100,\_,\_,EQUALIZE PRESSURE,  
214,3,SD,V15,0,\_,\_,EQUALIZE PRESSURE,  
215,0,WA,Prs,90,110,EQUALIZE PRESSURE,  
216,0,SD,Snd,1,\_,\_,FICA ESPERTO!,  
216,0,SD,Snd,0,\_,\_,Pronto para envio parcial,  
217,1,SD,V08,0,\_,\_,Enviando para purificacao,  
218,1,SD,V07,1,\_,\_,Enviando para purificacao,  
219,0,SA,Prs,110,\_,\_,Enviando para purificacao,  
220,20,SD,V15,1,\_,\_,Enviando para purificacao,  
221,10,SA,Prs,150,\_,\_,Enviando para purificacao,  
222,30,SA,Prs,180,\_,\_,Enviando para purificacao,  
223,1,SD,V15,0,\_,\_,Fim da TRANSFERENCIA,  
224,0,SD,Pmp,0,\_,\_,PUMP OFF,  
225,0,SA,Prs,300,\_,\_,RESET,  
226,0,SD,V08,0,\_,\_,RESET,  
227,0,SD,V07,0,\_,\_,RESET,  
228,0,SD,V06,0,\_,\_,RESET,  
229,0,SD,V05,0,\_,\_,RESET,  
230,0,SD,V04,0,\_,\_,RESET,  
231,0,SD,V03,0,\_,\_,RESET,  
232,0,SD,V02,0,\_,\_,RESET,  
233,0,SD,V01,0,\_,\_,RESET,  
234,0,SD,V16,0,\_,\_,RESET,  
235,1,SD,Snd,1,\_,\_,ACABOU!,  
235,0,SD,Snd,0,\_,\_,ACABOU!,  
236,0,SD,V15,0,\_,\_,END OF SYNTHESIS.

## APENDICE B – SCRIPT PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA EM PROGRAMA R®, VERSÃO 3.4.3.

```
library(car)
```

```
filename_ = 'C:/Users/Raquel/Desktop/R/acetoneitrila.csv'
```

```
conc = c("2500", "3750", "5000", "7500", "10000")
```

```
dataframe_ = read.csv(filename_)
```

```
dataframevalues1 = data.matrix(dataframe_, rownames.force=NA)[,1]
```

```
dataframevalues2 = data.matrix(dataframe_, rownames.force=NA)[,2]
```

```
dataframevalues3 = data.matrix(dataframe_, rownames.force=NA)[,3]
```

```
dataframevalues4 = data.matrix(dataframe_, rownames.force=NA)[,4]
```

```
dataframevalues5 = data.matrix(dataframe_, rownames.force=NA)[,5]
```

```
Area =  
c(dataframevalues1,dataframevalues2,dataframevalues3,dataframevalues4,dataframevalues5)
```

```
Concentracao <-  
c(rep(conc[1],3),rep(conc[2],3),rep(conc[3],3),rep(conc[4],3),rep(conc[5],3))
```

```
my.dataframe_ <- data.frame(Area, Concentracao)
```

```
res.aov <- aov(Area ~ Concentracao, data = my.dataframe_)
```

```
summary(res.aov)
```

```
plot(res.aov, 1)
```

```
leveneTest(Area ~ Concentracao, data = my.dataframe_)
```

```
aov_residuals <- residuals(object = res.aov)
```

```
shapiro.test(x = aov_residuals)
```

```
mylm <- lm(Area~Concentracao, data=my.dataframe_)
```

```
myanova <- anova(mylm)
cbind(myanova, 'CriticalValue' = qf(1-.05, myanova[1,1], myanova[2,1]))
```