

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

LOUISE MROSS HARTMANN

**DESENVOLVIMENTO DO RADIOFÁRMACO [<sup>18</sup>F]FLUMAZENIL PARA  
REALIZAÇÃO DE EXAMES PET/CT**

Porto Alegre

2013

LOUISE MROSS HARTMANN

**DESENVOLVIMENTO DO RADIOFÁRMACO [<sup>18</sup>F]FLUMAZENIL PARA  
REALIZAÇÃO DE EXAMES PET/CT**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Dr. João Alberto Osso Júnior

Porto Alegre

2013

## DADOS DE CATALOGAÇÃO

**H333d** Hartmann, Louise Mross

Desenvolvimento do radiofármaco [<sup>18</sup>F]flumazenil para realização de exames PET/CT / Louise Mross Hartmann. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

82 f.: il. tab. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa.

Co-orientador: Dr. João Alberto Osso Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

1. [18F]FLUMAZENIL. 2. PET/CT. 3. RECEPTOR GABAA. 4. EPILEPSIA. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Osso Júnior, João Alberto.

LOUISE MROSS HARTMANN

**DESENVOLVIMENTO DO RADIOFÁRMACO [<sup>18</sup>F]FLUMAZENIL PARA  
REALIZAÇÃO DE EXAMES PET/CT**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Lauro Wiechert Ana - USP

---

Dr. Fabio Luiz Navarro Marques - USP

---

Dr. André Luis Fernandes Palmira - PUCRS

---

Dr. Fabrício Simão (Suplente) - PUCRS

*"Bom mesmo é ir a luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão, perder com classe e  
vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a  
quem se atreve... A vida é muita para ser  
insignificante." (Charles Chaplin)*

## AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, Jacqueline e Fernando, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis. Graças à estas duas pessoas incríveis eu me tornei quem sou hoje. Tendo eles como exemplo, como amigos e conselheiros, junto forças para perseguir meus sonhos e objetivos. Não tenho palavras para agradecer! Amo muito vocês!

Não poderia deixar de mencionar a minha querida irmã, Anne, que sempre acreditou em mim. Queria que tu soubesse que és para mim um exemplo de superação e perseverança. Continue sendo esta pessoa maravilhosa! E nunca deixe de acreditar que isso é verdade. Te amo.

Agradeço a minha querida Professora Cristina Jeckel, que com muita sabedoria e paciência, me passou muito mais do que os seus conhecimentos farmacêuticos. Cris, queria que tu soubesse que és para mim um exemplo de pessoa e profissional, em quem eu me espelho para me tornar uma pessoa melhor. Muito obrigada!

Aos meus mestres, Dr. Jaderson Costa da Costa e Dr. João Alberto Osso. Agradeço por terem confiado em mim e no meu trabalho. Os seus ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Ao meu melhor amigo e colega de profissão, Marcos Alba, meu imenso muito obrigada! Não tenho palavras para te agradecer por tudo que fizeste por mim, trabalhando até tarde da noite e sacrificando seus fins de semana para que pudéssemos concluir este trabalho. Sem a tua ajuda eu jamais teria conseguido. Saibas que eu sempre vou estar aqui para te ajudar no que for preciso, não só como colega mas também como amiga. Um beijo grande!

Aos meus amigos e colegas do InsCer, Josi, Alice, Karina, Profa. Mara, Adri, Enfa. Cristina, João, Leonel, Marcos Barros e todos os outros. Este trabalho é de todos nós! Muito obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade que sempre demonstraram.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional. A todos que me acolheram com muito carinho, e que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis. Um beijo carinhoso!

## RESUMO

A Imagem Molecular é uma técnica que permite a visualização, caracterização e quantificação de processos bioquímicos a nível molecular e celular, em humanos e outros organismos vivos. Dentre as tecnologias disponíveis, destaca-se o PET (*Positron Emission Tomography* - Tomografia por Emissão de Pósitrons) que necessita da administração do radiotraçador ao organismo a ser estudado. Radiotraçadores ou radiofármacos são moléculas que possuem um elemento radioativo em sua composição. Atualmente, o radiofármaco mais utilizado em PET é o fludesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ ) ou [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Esta molécula é um análogo da glicose, que se acumula no interior da célula, permitindo a visualização do metabolismo da glicose. Entretanto, considerando que o cérebro utiliza basicamente a glicose como fonte de energia, este radiofármaco se acumula em altas taxas no cérebro normal, dificultando a visualização de processos patológicos. A fim de visualizar alterações patológicas mais específicas no cérebro, vários outros radiotraçadores podem ser utilizados, como por exemplo o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ). O flumazenil (FMZ) apresenta alta afinidade pelo local de ligação de benzodiazepínicos do receptor  $\text{GABA}_A$ , atuando como antagonista competitivo. Sabe-se que os receptores  $\text{GABA}_A$  possuem um papel chave no controle da excitabilidade neuronal e que deficiências na expressão destes receptores estão envolvidas em um grande número de patologias neurológicas e psiquiátricas, como epilepsia, ansiedade, depressão, esquizofrenia e etc. Com relação a epilepsia, acredita-se que exista uma diminuição da expressão dos receptores  $\text{GABA}_A$  no foco epileptogênico, região do cérebro geradora das crises epiléticas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a síntese do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), bem como sua purificação e as análises de controle de qualidade, visando produzir uma molécula que auxilie na localização do foco epileptogênico. O íon fluoreto ( $^{18}\text{F}^-$ ) foi produzido no ciclotron PET Trace 16 MeV da GE *Healthcare*, através da reação nuclear  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , decorrente da irradiação da água enriquecida com  $^{18}\text{O}$  pelos prótons acelerados. A síntese do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) foi realizada no módulo automatizado TRACERlab FX  $_{\text{F-N}}$  da GE *Healthcare*, através de uma reação de substituição nucleofílica aromática. As condições ideais de reação foram estabelecidas em 145°C durante 15 minutos, sendo que a massa do precursor foi de 6,2mg. A taxa de incorporação do  $^{18}\text{F}^-$  na molécula do flumazenil foi de 72±6% ( $n = 5$ ), verificado através da análise da mistura de reação. Na fase final o flumazenil

(<sup>18</sup>F) foi purificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cartucho de fase-reversa tC<sub>18</sub>, obtendo-se um produto com grau de pureza superior a 99%. A pureza e identidade radionuclídica foram avaliadas através de espectroscopia de raios gama e do tempo de meia-vida. A pureza radioquímica foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) e CLAE. Na análise da pureza química verificou-se a presença de kryptofix 2.2.2, através de teste colorimétrico, e solventes residuais (etanol e acetonitrila) por cromatografia gasosa (CG). O pH foi analisado utilizando fitas. Os resultados obtidos foram dentro dos limites estabelecidos pela farmacopéia levando em consideração o [<sup>18</sup>F]FDG. O tempo total de síntese foi de 80 minutos e o rendimento total foi de 9,3% (corrigido pelo decaimento). A estabilidade do radiofármaco foi analisada durante 8 horas, sendo que nenhuma impureza foi detectada neste período. O método desenvolvido mostrou ser viável para produção do flumazenil (<sup>18</sup>F), podendo este ser futuramente utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos. Os conhecimentos adquiridos com este trabalho permitirão o avanço desta tecnologia no país, e a pesquisa de novos radiotraçadores para a realização de exames PET/CT.

Palavras-chave: [<sup>18</sup>F]Flumazenil, PET/CT, receptor GABA<sub>A</sub> e epilepsia.



## ABSTRACT

Molecular Imaging is a technique that allows visualization, characterization and quantification of biochemical processes in a molecular and cellular level, in humans and other live organisms. Among all the technics available, it's possible to highlight PET (Positron Emission Tomography), which needs the administration of a radiotracer in the organism to be studied. Radiotracers or radiopharmaceuticals are molecules that possess a radioactive element in their composition. Nowadays, the most used PET radiopharmaceutical is fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ ) or [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. This molecule is a glucose analogue that accumulates inside the cell, allowing glucose metabolism visualization. However, considering the use of glucose by the brain as its main energy source, this radiopharmaceutical accumulates in high rates in the normal brain, making difficult to see pathological processes. In order to visualize more specific alterations in the brain, many others radiotracers can be used, for example flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ). Flumazenil (FMZ) shows high affinity for the benzodiazepine site in the GABA<sub>A</sub> receptor, acting as competitive antagonist. It's already known that GABA<sub>A</sub> receptors play a key role in neuronal excitability control, and expression deficiencies in these receptors are involved in many neurological and psychiatric disorders, such as epilepsy, anxiety, depression, schizophrenia, etc. Regarding epilepsy, it is believed that in the epileptogenic foci the GABA<sub>A</sub> receptor expression is reduced, the brain region where seizures start. For this reason, the aim of this work was to study flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) synthesis, as well as its purification and quality control analysis, in order to produce a molecule that can be used to localize the epileptogenic foci. The fluoride ion ( $^{18}\text{F}^-$ ) was produced using PET Trace 16 MeV cyclotron from GE Healthcare, through the nuclear reaction  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , through the irradiation of enriched  $^{18}\text{O}$  water with accelerated protons. The flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) synthesis was performed in the automated synthesis module TRACERlab FX<sub>F-N</sub> from GE Healthcare, by nucleophilic aromatic substitution reaction. The established ideal reaction conditions were 145°C for 15 minutes, and 6,2mg precursor mass. The  $^{18}\text{F}^-$  incorporation degree in the flumazenil molecule was 72±6% ( $n = 5$ ), verified by reaction mixture analysis. In the last step flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) was purified through high performance liquid chromatography (HPLC) and reserve-phase tC<sub>18</sub> cartridge, obtaining a product with a purity higher than 99%. The radionuclidic purity and identity were analyzed by gamma ray spectroscopy and half-life evaluation.

Radiochemical purity was verified using thin layer chromatography (TLC) and HPLC. The chemical purity tested the presence of kryptofix 2.2.2, through a colorimetric test, and residual solvents (ethanol and acetonitrile) through gas chromatography (GC). The pH was verified using strips. All the results complied with the pharmacopeia using [ $^{18}\text{F}$ ]FDG as reference. Synthesis time was 80 minutes including purification steps and the overall yield was 9.3% (decay corrected). The radiopharmaceutical stability was analyzed for 8 hours, and no impurities were detected in this period. The method developed showed to be viable to produce flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), which can be used in pre-clinical and clinical studies in the future. The knowledge acquired with this work will allow the improvement of this technology in the country, and the research of new radiotracers for PET/CT imaging.

Keywords: [ $^{18}\text{F}$ ]Flumazenil, PET/CT, GABA<sub>A</sub> receptor and epilepsy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Princípio de formação da imagem PET .....   | 18 |
| Figura 2. Foto do equipamento PET/CT .....  | 19 |
| Figura 3. Estrutura de um ciclotron mostrando o magneto, os "dees" e a fonte de íons .....  | 21 |
| Figura 4. Esquema da reação de fluorinação eletrofílica .....   | 22 |
| Figura 5. Esquema da reação de substituição nucleofílica. ....  | 23 |
| Figura 6. Estrutura química do Flumazenil.....  | 24 |
| Figura 7. Estrutura do receptor GABA <sub>A</sub> .....   | 28 |
| Figura 8. Foto do equipamento TRACERlab FX F-N .....  | 36 |
| Figura 9. Ciclotron PetTrace 16 MeV .....   | 37 |
| Figura 10. Esquema representativo da ativação do <sup>18</sup> F- utilizando o sistema carbonato de potássio/kryptofix 2.2.2..... | 38 |
| Figura 11. Diagrama do módulo de síntese TRACERlab FX FN.....   | 39 |
| Figura 12. TLC Scanner, Omini-Rad .....   | 42 |
| Figura 13. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Dionex .....  | 43 |
| Figura 14. Espectrômetro de raios gama .....  | 45 |
| Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE do padrão de flumazenil.....  | 47 |
| Figura 16. Cromatograma obtido por CCD do <sup>18</sup> F- livre.....   | 48 |
| Figura 17. Cromatograma obtido por CLAE do <sup>18</sup> F-.....  | 48 |
| Figura 18. Análise por CLAE da mistura de reação da série 3, detector de UV.....  | 50 |
| Figura 19. Análise por CLAE da mistura de reação da série 3, detector de radiação .....   | 51 |
| Figura 20. Purificação do radiofármaco através do CLAE (detector gama) .....  | 52 |
| Figura 21. Purificação do radiofármaco através do CLAE (detector UV) .....  | 53 |
| Figura 22. Cromatograma flumazenil ( <sup>18</sup> F) purificado (CCD) .....  | 56 |
| Figura 23. Cromatograma flumazenil ( <sup>18</sup> F) purificado (CLAE).....  | 57 |
| Figura 24. Cromatograma da análise do produto através de CG.....  | 59 |
| Figura 25. Espectro de energia obtido através do espectrômetro de raios gama. ....  | 59 |
| Figura 26. Cromatograma obtido 8 horas após a síntese (CLAE).....   | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Radioisótopos comumente utilizados para imagem. ....                                  | 17 |
| Tabela 2. Eficiência de eluição do cartucho QMA .....   | 46 |
| Tabela 3. Resultados da eficiência de marcação e da formação de impurezas não radioativas ..... | 49 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| AS                    | <i>Specific activity</i>                          |
| GABA                  | Ácido gama-aminobutírico                          |
| ANVISA                | Agência Nacional de Vigilância Sanitária          |
| BZD                   | Benzodiazepínico                                  |
| C.A.                  | <i>Carrier added</i>                              |
| CCD                   | Cromatografia em camada delgada                   |
| CG                    | Cromatografia gasosa                              |
| CLAE                  | Cromatografia líquida de alta eficiência          |
| CPS                   | Contagens por segundo                             |
| CT                    | <i>Computed Tomography</i>                        |
| DAE                   | Droga antiepiléptica                              |
| DMF                   | Dimetilformamida                                  |
| DMSO                  | Dimetilsulfóxido                                  |
| ELT                   | Epilepsia do lobo temporal                        |
| FDA                   | <i>Food and Drug Administration</i>               |
| FMZ                   | Flumazenil  |
| IM                    | Imagem Molecular                                  |
| N.C.A.                | <i>No carrier added</i>                           |
| PET                   | <i>Positron Emission Tomography</i>               |
| RMN                   | Ressonância Magnética Nuclear                     |
| SNC                   | Sistema Nervoso Central                           |
| SPE                   | <i>Solid phase extraction</i>                     |
| SPECT                 | <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> |
| UV                    | Ultravioleta                                      |
| [ <sup>18</sup> F]FDG | Fludesoxiglicose (18F)                            |

## SUMÁRIO

|                |   |           |
|----------------|---|-----------|
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>16</b> |
| 1.1            | MEDICINA NUCLEAR.....   | 16        |
| 1.2            | MEDICINA MOLECULAR .....  | 16        |
| 1.3            | PET .....   | 17        |
| 1.4            | RADIOISÓTOPOS .....   | 19        |
| <b>1.4.1</b>   | <b>Produção de <math>^{18}\text{F}</math> .....</b>   | <b>20</b> |
| 1.5            | SÍNTESE DE COMPOSTOS COM $^{18}\text{F}$ .....  | 22        |
| <b>1.5.1</b>   | <b>Substituição Nucleofílica .....</b>  | <b>23</b> |
| 1.6            | FLUMAZENIL.....   | 23        |
| 1.7            | RADIOFÁRMACOS PARA IMAGEM FUNCIONAL CEREBRAL .....  | 25        |
| 1.8            | GABA E RECEPTORES GABAérgicos.....  | 27        |
| 1.9            | EPILEPSIA.....  | 29        |
| <b>1.9.1</b>   | <b>Diagnóstico e Tratamento.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>1.9.2</b>   | <b>Receptor GABA x Epilepsia.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>2</b>       | <b>OBJETIVO .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3</b>       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1            | INFRAESTRUTURA.....   | 35        |
| 3.2            | LISTA DE REAGENTES E MATERAIS.....  | 35        |
| 3.3            | LISTA DE EQUIPAMENTOS .....   | 35        |
| 3.4            | SÍNTESE DO [ $^{18}\text{F}$ ]FLUMAZENIL .....  | 36        |
| 3.5            | PURIFICAÇÃO.....  | 38        |
| 3.6            | ELUIÇÃO DA COLUNA QMA PLUS LIGHT.....   | 40        |
| <b>3.7</b>     | <b>VARIÁVEIS DE MARCAÇÃO .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>3.7.1</b>   | <b>Massa do precursor.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>3.7.2</b>   | <b>Temperatura de aquecimento da mistura durante a etapa de substituição nucleofílica .....</b> | <b>40</b> |
| <b>3.7.3</b>   | <b>Tempo de aquecimento da etapa de substituição nucleofílica .....</b>                         | <b>41</b> |
| <b>3.7.4</b>   | <b>Atividade de <math>^{18}\text{F}^-</math> .....</b>  | <b>41</b> |
| 3.8            | CONTROLE DE QUALIDADE.....  | 41        |
| <b>3.8.1</b>   | <b>Pureza Radioquímica .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.8.1.1</b> | <b>Cromatografia em Camada Delgada .....</b>  | <b>41</b> |

|         |  |           |
|---------|--|-----------|
| 3.8.1.2 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....  | 42        |
| 3.8.2   | Pureza Química.....  | 43        |
| 3.8.2.1 | Atividade Específica.....  | 43        |
| 3.8.2.2 | Kryptofix 2.2.2.....   | 44        |
| 3.8.2.3 | Solventes Residuais.....   | 44        |
| 3.8.3   | Pureza e Identidade Radionuclídica.....  | 44        |
| 3.8.4   | pH.....  | 45        |
| 3.8.5   | Estabilidade .....   | 45        |
| 4       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>46</b> |
| 4.1     | ELUIÇÃO DO CARTUCHO QMA PLUS LIGHT .....   | 46        |
| 4.2     | AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE FLUMAZENIL NOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS .....                   | 47        |
| 4.3     | AVALIAÇÃO DO <sup>18</sup> F LIVRE NOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS.....                   | 47        |
| 4.4     | INFLUENCIA DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO E FORMAÇÃO DE IMPUREZAS ..... | 49        |
| 4.5     | <b>PURIFICAÇÃO DO PRODUTO .....</b>  | <b>52</b> |
| 4.6     | <b>RENDIMENTO .....</b>  | <b>54</b> |
| 4.7     | <b>CONTROLE DE QUALIDADE .....</b>   | <b>55</b> |
| 4.7.1   | Pureza Radioquímica .....  | 55        |
| 4.7.1.1 | Cromatografia em Camada Delgada .....  | 55        |
| 4.7.1.2 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....  | 57        |
| 4.7.2   | Pureza Química.....  | 57        |
| 4.7.2.1 | Atividade Específica.....  | 57        |
| 4.7.2.2 | Kryptofix 2.2.2.....   | 58        |
| 4.7.2.3 | Solventes Residuais.....   | 58        |
| 4.7.3   | Pureza e Identidade Radionuclídica.....  | 59        |
| 4.7.4   | pH.....  | 60        |
| 4.8     | <b>ESTUDO DE ESTABILIDADE .....</b>  | <b>60</b> |
| 5       | <b>CONCLUSÃO .....</b>   | <b>62</b> |
|         | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>64</b> |
|         | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>68</b> |
|         | <b>ANEXO A- Artigo Científico.....</b>   | <b>69</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MEDICINA NUCLEAR

A Medicina Nuclear tem sua origem no trabalho pioneiro do médico húngaro Hevesy, que em 1924 utilizou isótopos radioativos do chumbo como traçadores de estudos ósseos. Entretanto, foi com a descoberta dos elementos radioativos artificiais que aumentou o número de espécies possíveis de serem utilizados como traçadores. A invenção do ciclotron por E. Lawrence em 1932 tornou possível a produção de isótopos radioativos de vários elementos biológicos. O uso destes radiotraçadores produzidos artificialmente continuou com Hamilton e Stone, utilizando o sódio radioativo na clínica em 1937. Hertz, Roberts e Evans em 1938 utilizaram iodo radioativo para estudar a fisiologia da tireoide.

O primeiro ciclotron médico foi instalado em 1941 na Washington University, St. Louis, onde isótopos radioativos do fósforo, ferro, arsênio e enxofre foram produzidos. Com o desenvolvimento do processo de fissão durante a II Guerra Mundial, a maioria dos radioisótopos de interesse médico começaram a ser produzidos em reatores. Depois da guerra, o uso de material radioativo na medicina começou a se difundir e estabeleceu um novo campo chamado medicina atômica, que somente depois passou a ser conhecido como medicina nuclear (AIEA 2008; Vallabhajosula et al. 2011).

## 1.2 MEDICINA MOLECULAR

A era moderna da medicina nuclear ficou conhecida como medicina molecular. O objetivo das imagens moleculares é a visualização, caracterização e quantificação de processos bioquímicos a nível molecular e celular em humanos e outros organismos vivos. Dentre as técnicas existentes, inclui-se: PET, SPECT, RMN, entre outros. Através da visualização dos processos bioquímicos por trás de doenças em cada indivíduo, a imagem molecular (IM) torna possível a individualização do tratamento. A habilidade de identificar a presença ou ausência de um receptor específico ou modificações moleculares, por exemplo, é crucial para a seleção de pacientes para certas terapias. Além disso, a IM é de extrema importância no desenvolvimento de novas drogas, facilitando os estudos de biodistribuição de forma não invasiva, utilizando a droga radiomarcada.



Dentre as tecnologias de IM disponíveis, o PET (*Positron Emission Tomography* - Tomografia por Emissão de Pósitrons) e o SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography* – Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) necessitam da administração do radiofármaco ao organismo a ser estudado. Radiofármacos nada mais são que moléculas endógenas ou exógenas que possuem um elemento radioativo em sua composição, e que podem tanto localizar um certo tecido no corpo como seguir uma certa via metabólica. (Leitha 2009) Apesar de existir um grande número de radioisótopos utilizados em imagem, um número relativamente pequeno é empregado na grande maioria dos exames SPECT e PET. A tabela 1 lista os radioisótopos mais utilizados.

Tabela 1. Radioisótopos comumente utilizados para imagem.

| <b>SPECT</b>      | <b>T <math>\frac{1}{2}</math> (horas)</b> | <b>PET</b>       | <b>T <math>\frac{1}{2}</math> (minutos)</b> |
|-------------------|---|------------------|---|
| $^{99m}\text{Tc}$ | 6   | $^{11}\text{C}$  | 20  |
| $^{123}\text{I}$  | 13  | $^{18}\text{F}$  | 110   |
| $^{201}\text{Tl}$ | 73  | $^{68}\text{Ga}$ | 67  |
| $^{67}\text{Ga}$  | 78  | $^{13}\text{N}$  | 10  |

Fonte: Adaptado de International Atomic Energy Agency (2008).

### 1.3 PET

No início da década de 1970, Michael Phelps e colaboradores construíram o primeiro PET para estudos clínicos e demonstraram o potencial clínico dos traçadores emissores de pósitrons como [ $^{11}\text{C}$ ]glicose, [ $^{13}\text{N}$ ]amoníaco e [ $^{15}\text{O}$ ]água. O equipamento de imagem PET utiliza os radioisótopos emissores de pósitrons. Em função da meia-vida curta destes isótopos, é necessário que os radiotraçadores sejam preparados em um local muito próximo de onde o mesmo será utilizado. Uma vez no corpo do indivíduo, geralmente administrado via intravenosa, o isótopo emite um pósitron ( $\beta^+$ ) e um neutrino ( $\nu$ ), conforme a Figura 1. Os neutrinos praticamente não interagem com a matéria e, portanto, não são detectados pelo PET. Por outro lado, o pósitron emitido interage com um elétron, sua anti-matéria. Este fenômeno resulta em um evento de aniquilação, que produz dois fótons de 511 keV de energia, emitidos em direções opostas ( $180^\circ$ ) (Miller et al. 2008).

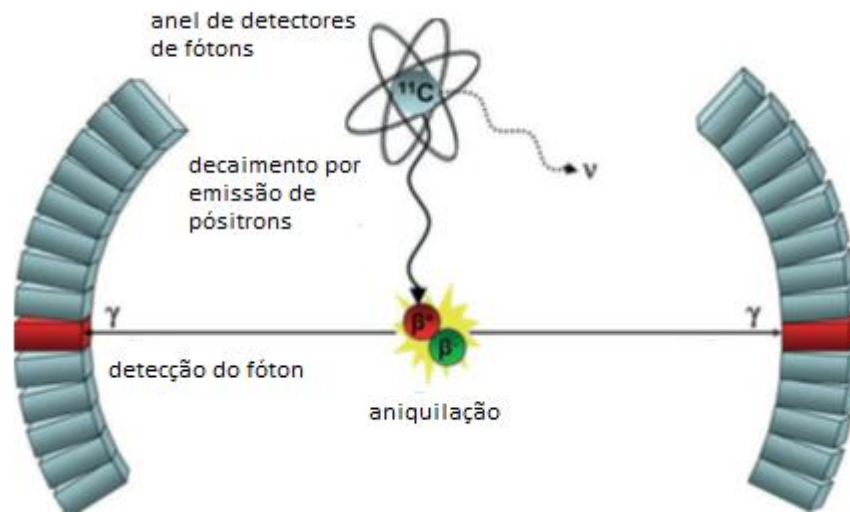


Figura 1. Princípio de formação da imagem PET (Miller et al. 2008).

O PET consiste em uma série de detectores de cintilação, distribuídos em volta do indivíduo em forma de anel. O equipamento utiliza o método de detecção por aniquilação coincidente, para obter a projeção das imagens da distribuição do radiotraçador. Para que se possa obter uma imagem quantitativa da captação e localização do radiotraçador em vários órgãos e/ou tecidos, várias correções são necessárias (atenuação, normalização e etc). Posteriormente, as imagens são processadas através de fórmulas matemáticas, para se obter imagens de cortes transversais em um determinado campo de visão. Um importante avanço na tecnologia destes equipamentos foi a integração do PET com o CT em um único equipamento. A combinação destas duas técnicas de imagem permite correlacionar as informações funcionais fornecidas pelo PET, com as informações anatômicas do CT. A figura 2 apresenta um sistema PET/CT (Miller et al. 2008; Khalil 2011).



Figura 2. Foto do equipamento PET/CT, InsCer.

O radiofármaco de PET mais utilizado atualmente é o fludesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ ) ou [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. O [ $^{18}\text{F}$ ]FDG é um análogo da glicose onde o grupo hidroxil do carbono 2 é substituído por um átomo de flúor. A molécula atravessa a membrana das células utilizando os mesmos transportadores (GLUT) que a glicose não radioativa. Uma vez no interior da célula, a molécula é fosforilada pela enzima hexoquinase em FDG-18F-6-fosfato. Entretanto, este metabólito não é reconhecido como substrato para a próxima enzima da cadeia, e não pode seguir na via glicolítica, acumulando-se no interior da célula tempo suficiente para a aquisição da imagem (Fowler et al. 2002).

#### 1.4 RADIOISÓTOPOS

A produção de radioisótopos consiste em converter os átomos estáveis de um elemento em átomos instáveis, podendo ser igual ou não ao elemento original. Esta conversão envolve a alteração do número de prótons e/ou nêutrons no núcleo (alvo). Se um nêutron é adicionado sem a emissão de partículas, o nuclídeo resultante terá as mesmas características químicas que o nuclídeo do alvo. Entretanto, se o núcleo do alvo for bombardeado com uma partícula carregada, um próton por exemplo, o núcleo resultante geralmente será de um elemento diferente, como é o caso de  $^{18}\text{F}$  (AIEA 2008).

A escolha do radioisótopo a ser utilizado é de extrema importância, e geralmente é determinado pelo estudo que se deseja conduzir. Apesar do  $^{18}\text{F}$  ser o radioisótopo

emissor de pósitron de maior preferência, nem sempre o mesmo pode ser utilizado em função da sua meia-vida física e das suas características químicas. Por exemplo, para a marcação de anticorpos monoclonais o  $^{18}\text{F}$  geralmente não é eficiente, pois a cinética biológica destas moléculas é extremamente lenta (2-4 dias). Nestes casos, se faz necessária a utilização de radioisótopos de meia-vida mais longa, como o  $^{124}\text{I}$  (meia-vida 4,18 dias). Além disso, o contrário também ocorre. Por exemplo, em estudos para verificação de fluxo sanguíneo, radioisótopos com meia-vida mais curta são preferíveis, como o  $^{15}\text{O}$  (meia-vida 2 minutos). Portanto, a meia-vida física do radioisótopo deve ser compatível com a meia-vida biológica do processo a ser estudado (Khalil 2011).

Comparando os mais diversos radioisótopos emissores de pósitrons, o  $^{18}\text{F}$  é o mais utilizado na rotina em função das suas propriedades químicas e físicas. Este radioisótopo pode ser produzido em grandes quantidades mesmo em ciclotrons de baixa energia. Sua meia-vida física (110 minutos) permite que sínteses complexas e com várias etapas sejam realizadas, possibilita que processos bioquímicos mais lentos sejam estudados, além da possibilidade de transportá-lo a locais distantes da sua produção. Além disso, o  $^{18}\text{F}$  possui energia  $\beta^+$  de 635 keV, o que confere uma alta resolução espacial às imagens e baixa dosimetria aos pacientes. Quanto às suas características químicas, várias reações para a introdução do  $^{18}\text{F}$  em moléculas orgânicas são conhecidas (Khalil 2011).

#### 1.4.1 Produção de $^{18}\text{F}$

O  $^{18}\text{F}$  é um radioisótopo de meia-vida curta, que pode ser produzido através de várias reações nucleares. A principal diferença entre estas reações é o material utilizado como alvo, líquido ou gasoso, o que determina a forma química que será obtida. De alvos gasosos, é produzido o  $[^{18}\text{F}]\text{flúor gasoso}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ ) eletrofílico com adição de carreador (c.a.). De alvos líquidos obtém-se o fluoreto nucleofílico sem adição de carreador (n.c.a.), em solução aquosa.

Em função da sua alta reatividade, o  $^{18}\text{F}$  eletrofílico fica aderido nas paredes do alvo, sendo imprescindível a adição de  $\text{F}_2$  não radioativo para remover o  $^{18}\text{F}$  n.c.a. Entretanto, este procedimento diminui drasticamente a atividade específica, que é uma das maiores desvantagens desta rota de produção. O método de

produção do  $^{18}\text{F}$  nucleofílico, utilizando a água enriquecida com  $^{18}\text{O}$  como alvo, é o método mais eficiente de se produzir esta forma química sem adição de carreador. Desta forma, a reação nuclear  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  se tornou mais usual, podendo-se utilizar cíclotrons de baixa energia.

O cíclotron é formado por três componentes principais: campo eletromagnético, um par de eletrodos de cobre em formato de semicírculo localizados entre os pólos de um imã, chamados de Dees, e uma fonte de íons capaz de gerar íons negativos de alta intensidade. Além disso, toda sua estrutura é mantida sob vácuo (maior que  $10^{-7}$  torr). Basicamente, após a ionização do gás hidrogênio na fonte de íons, os íons  $\text{H}^-$  são injetados em uma lacuna localizada entre os Dees. Quando uma radiofrequência de potencial alternado é aplicada aos Dees, os íons negativos irão acelerar em direção ao Dee de potencial positivo. Devido ao campo magnético ser perpendicular aos Dees e ao movimento das partículas, os íons negativos irão se movimentar de forma circular e ganharão energia, velocidade e raio à medida que os Dees alternam seu potencial de positivo para negativo, e vice-versa. Quando a energia cinética ideal das partículas aceleradas é alcançada, os íons carregados negativamente passam através de uma folha de carbono ultrafina (*stripper*), que extrai seus elétrons. Agora, carregados positivamente, os íons mudam de direção e atingem o alvo, que é então bombardeado transformando o  $^{18}\text{O}$  em  $^{18}\text{F}$ . A figura 3 mostra a estrutura do cíclotron (Vallabhajosula. 2009; Coenen et al. 2010).

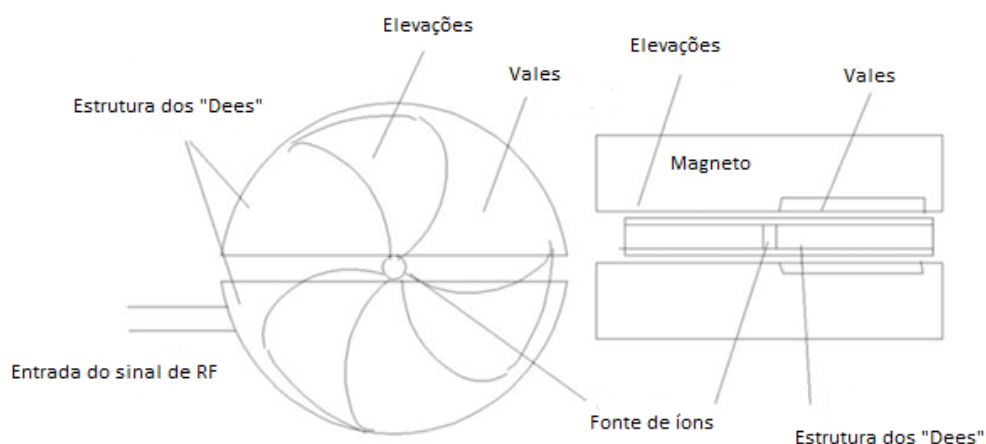


Figura 3. Estrutura de um cíclotron mostrando o magneto, os "dees" e a fonte de íons (IAEA 2008).

## 1.5 SÍNTESE DE COMPOSTOS COM $^{18}\text{F}$

No caso do  $^{18}\text{F}$ , geralmente o produto obtido do alvo está na forma de íons fluoreto ( $\text{F}^-$ ) ou na forma de gás ( $\text{F}_2$ ) dependendo do tipo de alvo irradiado, conforme mencionado anteriormente. Este radioisótopo pode ser introduzido em moléculas orgânicas de forma direta (substituição eletrofílica e substituição nucleofílica) ou indireta (fluorinação via grupos prostéticos e via synthons). Os métodos indiretos utilizam um grupo prostético ou um synthon marcado com o  $^{18}\text{F}$ , que, acoplado-se com uma segunda molécula, vão formar o produto. Obviamente, estes métodos de marcação implicam em síntese de pelo menos 2 etapas.

Os métodos mais utilizados são as reações diretas, eletrofílicas ou nucleofílicas. As reações eletrofílicas necessitam do flúor eletrofílico ( $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ ) para ocorrer. Apesar da baixa atividade específica obtida através desta rota de produção, alguns radiofármacos de grande interesse ainda são sintetizados por esta via, como é o caso do  $[^{18}\text{F}]\text{F-DOPA}$ . As reações de substituição nucleofílica são amplamente utilizadas na rotina. Moléculas precursoras com grupos de saída específicos foram desenvolvidas, e estão disponíveis comercialmente para serem utilizadas nos módulos de síntese automatizados. As figuras 4 e 5 apresentam esquemas das reações eletrofílicas e nucleofílicas, respectivamente (Coenen et al. 2010).

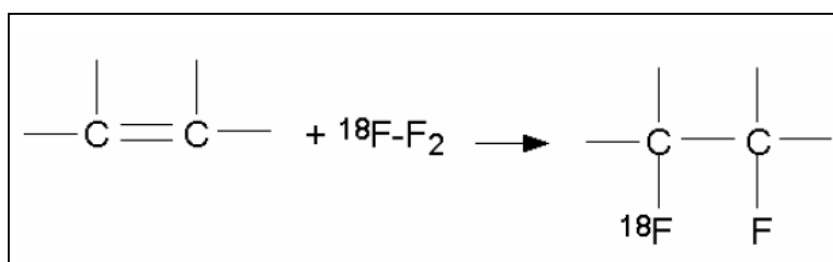


Figura 4. Esquema da reação de fluorinação eletrofílica (Yu 2006).

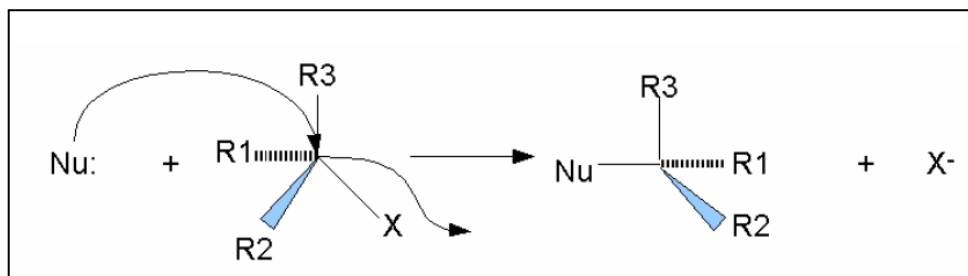


Figura 5. Esquema da reação de substituição nucleofílica. Nu: nucleófilo; X: grupo de saída (Yu 2006).

### 1.5.1 Substituição Nucleofílica

O método mais utilizado para a síntese de radiofármacos com alta atividade específica de  $^{18}\text{F}$  baseia-se nas reações de fluorinação nucleofílica. A fluorinação pode ser feita em compostos alifáticos ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) ou aromáticos ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ), sendo que os grupos de saída comuns para  $\text{S}_{\text{N}}2$  são Br, I e os ésteres sulfônicos como o triflato; e os mais comuns para  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  são o Flúor,  $\text{NO}_2$ , e  $\text{NMe}_3^+$ , com um pré-requisito para  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  a ativação através de grupos extratores de elétrons na posição *ortho* ou *para*, como  $\text{CF}_3$ ,  $\text{NO}_2$ , carbonil ou cianeto.

As condições clássicas para uma reação de fluorinação envolvem solventes polares apróticos (acetonitrila, DMF, DMSO) com tempos de reação que variam de 5 a 30 minutos a uma temperatura de 80 a 180°C. Na forma como o íon fluoreto é obtido no ciclotron, em solução aquosa, ele apresenta baixa reatividade e precisa ser ativado para aumentar sua nucleofilicidade. Portanto, a primeira etapa para a produção de um radiofármaco utilizando o flúor nucleofílico é separá-lo da fase aquosa. Geralmente se utilizam colunas de extração em fase sólida (SPE) onde o íon fluoreto é retido e quando eluído é ativado através da formação de um complexo com um metal ou com um íon carregado positivamente, podendo ser utilizados o Kryptofix 2.2.2 ou carbonato de tetrabutil ou tetrametil amônio em combinação com  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$  ou oxalato de potássio. Estas reações geralmente acontecem em meio básico ou neutro (Grunder et al. 2001; AIEA 2008; Coenen et al. 2010).

### 1.6 FLUMAZENIL

Em 1981 no *Hoffman LaRoche Laboratories*, Hunkeler e seus colaboradores introduziram o composto RO 15-1788 (flumazenil), 1,4-imidazodiazepina. O

flumazenil (FMZ) apresenta alta afinidade pelo local de ligação de benzodiazepínicos do receptor  $GABA_A$ , atuando como antagonista competitivo. Por ser lipofílico, atravessa a Barreira Hematoencefálica e penetra rapidamente no Sistema Nervoso Central, cerca de 5 a 8 minutos após a administração intravenosa. Este fármaco se liga moderadamente as proteínas plasmáticas, e seu volume de distribuição é de 0,63 a 1,06 L/kg. A meia-vida de eliminação plasmática varia de 0,7 a 1,3 horas. Doses administradas via oral são rápida e totalmente absorvidas, atingindo o pico de concentração após 20 a 90 minutos, entretanto a biodisponibilidade é reduzida em decorrência do metabolismo de primeira passagem no fígado. A figura 6 mostra a estrutura química do flumazenil (Votey et al. 1991).

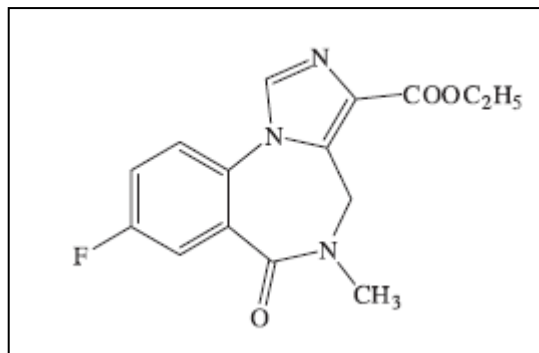


Figura 6. Estrutura química do Flumazenil.

O FMZ bloqueia a ação dos benzodiazepínicos, mas não antagoniza os efeitos de outros sedativos-hipnóticos, como os opióides, etanol ou dos anestésicos gerais sobre o SNC. O flumazenil foi aprovado para uso na reversão dos efeitos depressores das doses excessivas de benzodiazepínicos sobre o SNC, bem como para acelerar a recuperação após o uso desses agentes em procedimentos anestésicos e diagnósticos. Quando administrado por via intravenosa, o flumazenil atua rapidamente, porém, apresenta meia-vida curta (0,7 a 1,3 horas) devido à rápida depuração hepática (Katzung 2007).

Flumazenil marcado com o radioisótopo  $^{11}C$  foi o primeiro radiotraçador desenvolvido para realizar imagens do sistema GABAérgico através de Tomografia por Emissão de Pósitrons. (Maziere et al. 1984; Persson et al. 1985) Em 1991, Moerlien e Perlmutter reportaram a síntese do análogo do flumazenil o 5-(2'-[ $^{18}F$ ]Fluoroethyl)flumazenil ([ $^{18}F$ ]FEF). O estudo deste radiofármaco em macacos mostrou a sua rápida localização em regiões do cérebro com alta densidade de



receptores GABA. Em 2001, Gründer et al. realizaram o primeiro estudo em humanos saudáveis utilizando este radiotraçador. O estudo concluiu que o [ $^{18}\text{F}$ ]FEF era um radioligante em potencial para quantificação de receptores benzodiazepínicos, entretanto o flumazenil ( $^{11}\text{C}$ ) apresentava algumas vantagens, como uma maior afinidade pelo receptor e metabolismo mais lento (Moerlein et al. 1992; Grunder et al. 2001).

Em 2003, Ryzhikov et al. reportaram a síntese do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), utilizando como precursor o flumazenil vendido comercialmente. Em 2005, o mesmo grupo relatou a síntese do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) utilizando como precursor o nitromazenil, possibilitando a produção de um radiofármaco com alta atividade específica. Neste estudo, os autores avaliaram a distribuição do radiofármaco em macacos *Cynomolgus*. Após a injeção intravenosa, houve uma rápida acumulação da radioatividade no cérebro, sendo que o pico aconteceu em torno de 10 minutos após a injeção. A distribuição da radioatividade, verificada na imagem obtida por PET, foi consistente com a distribuição conhecida de receptores GABA no cérebro. Os níveis de radioatividade no córtex frontal, occipital e temporal foram mais elevados, enquanto que no cerebelo e no corpo caloso foram diminuídos (Ryzhikov et al. 2004; Ryzhikov et al. 2005).

## 1.7 RADIOFÁRMACOS PARA IMAGEM FUNCIONAL CEREBRAL

Todos os compostos radiomarcados ou substâncias usadas para fins diagnóstico ou para terapia são definidos como medicamentos radioativos ou radiofármacos pelo *Food and Drug Administration*, órgão americano responsável por assegurar a segurança e eficácia de medicamentos e artigos para a saúde nos Estados Unidos da América. Radiofármacos para diagnóstico são administrados em quantidades ínfimas ( $<100\mu\text{g}$ ) e, geralmente, não induzem nenhuma resposta fisiológica ou efeito farmacológico nos pacientes (Vallabhajosula. 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão brasileiro que regulamenta a produção de medicamentos no país, dentre outras atividades, estabelece que radiofármacos são “preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para uso, contêm um ou mais radionuclídeos” (ANVISA 2009).

Mudanças na atividade elétrica dos neurônios (excitação e inibição) tem sido indiretamente atribuídas a alterações no fluxo sanguíneo cerebral regional ou mudanças localizadas do metabolismo de glicose. Estes parâmetros já estão bem definidos no cérebro humano normal e em algumas doenças neurológicas. Entretanto, a função cerebral está diretamente relacionada a sinalização neural e a transmissão da atividade elétrica através das sinapses químicas e elétricas. A fim de tornar as terapias cada vez mais específicas para cada indivíduo, torna-se indispensável a utilização de técnicas não invasivas de imagem, que podem acessar de forma quantitativa o status funcional e as anormalidades associadas com neurotransmissores e neurorreceptores, por trás de doenças neurológicas específicas.

No geral, existem 4 classes principais de radiofármacos utilizados para exames cerebrais: avaliação do fluxo sanguíneo, metabolismo de glicose, neurotransmissão e acúmulo de placas  $\beta$ -amilóides. Novos compostos alvo-específico, tanto para diagnóstico quanto para acompanhamento de resposta terapêutica, estão em desenvolvimento e sob avaliação clínica.

Os radiofármacos utilizados para mapear neurorreceptores no cérebro devem apresentar uma série de características, dentre elas:

- Alta seletividade, concentrando sua radioatividade no receptor.
- Lipofilicidade adequada para atravessar a barreira hematoencefálica de forma rápida e fácil.
- Estabilidade metabólica, com baixo acúmulo de metabólitos ativos.
- Rápida saída dos sítios de ligação não-específicos.
- Rápida eliminação sanguínea.
- Ausência de efeitos clínicos em doses de saturação dos receptores.
- Processo de síntese economicamente viável.

A interação de um ligante com seu receptor exhibe duas propriedades que são comumente utilizadas para a caracterização do receptor, que são especificidade molecular e saturabilidade. A especificidade molecular descreve o comportamento da interação do ligante com seu receptor em termos de afinidade e habilidade em reconhecer a molécula em particular, enquanto que a saturabilidade está

relacionada à densidade do receptor. O tecido cerebral contém concentração de receptores de aproximadamente 10-12 mol/g e, se um ligante é liberado em excesso, os receptores são saturados. Portanto, concentrações muito baixas de ligantes devem ser injetadas, o que implica na preparação de radiofármacos com alta atividade específica.

Atividade específica é um parâmetro importante a se avaliar quando se deseja realizar imagem de receptores. SA é a quantidade de radioatividade por unidade de massa do radiofármaco, usualmente expresso por GBq (mCi)/ $\mu\text{mol}^{-1}$ . Quando o radiofármaco está presente de forma natural no corpo, como a glicose, a AS não se torna um parâmetro importante. As sínteses que utilizam o  $^{11}\text{C}$  como radioisótopo, são mais difíceis de se obter alta atividade específica, uma vez que o isótopo 12 do carbono é extremamente abundante na natureza em comparação com o isótopo 11. Nestes casos, deve-se ter cuidado extremo nos materiais que se utiliza, a fim de minimizar ao máximo a contaminação com  $^{12}\text{C}$  (Grallert et al. 2003; International Atomic Energy Agency 2008).

## 1.8 GABA E RECEPTORES GABAérgicos

A atividade do Sistema Nervoso Central depende basicamente das funções de excitação e inibição. O principal neurotransmissor inibitório do SNC é o Ácido gama-aminobutírico, que ativa os receptores resultando em hiperpolarização. Estima-se que pelo menos um terço de todos os neurônios do SNC utilizam GABA como seu neurotransmissor primário. A maioria desses neurônios GABAérgicos são interneurônios e, portanto, são capazes de alterar a excitabilidade de circuitos em determinadas regiões cerebrais. O GABA exerce seu efeito inibitório agindo em duas classes de receptores, que se distinguem por suas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas. Os receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> são ligantes dependentes, formam canais iônicos e medeiam a inibição rápida. Os receptores GABA<sub>B</sub> são metabotrópicos, acoplados à proteína G e ativados indiretamente por um segundo mensageiro, medeiam a inibição lenta e prolongada. Os receptores GABA<sub>A</sub> são alvos de diversas drogas anticonvulsivantes, ansiolíticas, agentes sedativo-hipnóticos como benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides, álcool e certas classes de anestésicos (Johnston 2005).

Os receptores GABA<sub>A</sub> fazem parte de uma grande família denominada Cys-loop. Os membros desta família são glicoproteínas heteropentaméricas, compostas por subunidades homólogas, que reconhecem especificamente uma a outra e reúnem-se ao redor de um canal iônico permeável ao cloro e, a uma extensão menor, a íons bicarbonato. Cada subunidade do receptor é composta por uma larga região extracelular NH<sub>2</sub>-terminal, sendo o sitio de ação de várias drogas, seguido por quatro  $\alpha$ -hélices transmembrana (TM 1-4), e um COOH terminal. Cada subunidade do receptor contém um grande domínio intracelular (ICD), entre TM3 e TM4, que medeia a maioria das interações entre proteínas e é alvo de várias modificações pós-translacionais. A figura 7 representa a estrutura do receptor GABA<sub>A</sub> (Olsen et al. 2008; Vithlani et al. 2011).

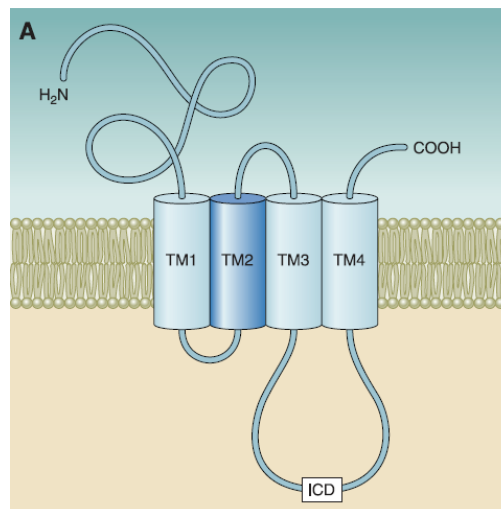


Figura 7. Estrutura do receptor GABA<sub>A</sub> (Vithlani et al. 2011).

A hiperpolarização da membrana mediada pelo receptor GABA<sub>A</sub> é atribuída à ativação direta do canal iônico e do influxo de íons cloro. Após uma breve exposição a altas concentrações de GABA (liberado pelas vesículas pré-sinápticas), a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> localizados na membrana sináptica modifica transitoriamente o potencial de membrana contra o limiar necessário para a geração do potencial de ação, sendo este processo conhecido como inibição “fásica”. Em contrapartida, baixas concentrações de GABA<sub>A</sub> no espaço extracelular podem ativar receptores extra sinápticos, gerando um estado inibitório persistente, conhecido como “tônico”. Considerando o papel crítico dos receptores GABA<sub>A</sub> no controle da excitabilidade neuronal e no comportamento animal, é de fundamental importância o entendimento

dos mecanismos utilizados pelos neurônios para regular sua função (Vithlani et al. 2011).

## 1.9 EPILEPSIA

Epilepsia é uma condição neurológica grave que atinge cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos em países em desenvolvimento. (Engel 2001) Esta doença se apresenta como uma síndrome de aspectos heterogêneos, caracterizada por crises convulsivas recorrentes. Suas causas podem ser identificadas como tumores, traumas, disfunções metabólicas, infecções, doenças vasculares ou uma predisposição genética. Muitas vezes as causas podem não ser definidas, sendo esta forma de epilepsia denominada idiopática (Rogawski et al. 1990; McNamara 1994).

As crises convulsivas são geradas por descargas paroxísticas anormais de neurônios cerebrais que afetam a excitabilidade cortical. Estas crises podem ser generalizadas, envolvendo todo o córtex de ambos hemisférios, ou parciais, atingindo somente uma área determinada do córtex (McNamara 1994).

As alterações comportamentais de uma crise vão depender do tipo de neurônios que estão envolvidos. Nas crises generalizadas todos os neurônios corticais estão envolvidos, sendo assim, o comportamento do indivíduo é totalmente modificado, havendo perda de consciência. As crises parciais geralmente originam-se em uma área sensorial, e podem ocorrer sensações sinalizadoras denominadas de *áurea* e *déjà vu*. Estas crises muitas vezes envolvem o córtex do lobo temporal, incluindo hipocampo e amígdala, prejudicando a memória e a consciência do paciente. Além disso, as crises parciais podem se difundir e tornar-se generalizadas (McNamara 1994; Costa da Costa et al. 1998).

### 1.9.1 Diagnóstico e Tratamento

A principal ferramenta para o diagnóstico de epilepsia é o histórico médico do paciente, reunindo todas as informações possíveis sobre as crises e o que ocorre antes delas começarem. A partir deste ponto é necessário definir se estes episódios são realmente epiléticos. O médico também deve executar uma avaliação física, principalmente do sistema nervoso, análise do sangue e outros fluidos corporais.

Uma segunda bateria de exames inclui o eletroencefalograma (EEG), equipamento que registra ondas cerebrais através de eletrodos colocados na cabeça do paciente. O EEG é importante para estabelecer o diagnóstico de epilepsia, ajudar no diagnóstico diferencial entre epilepsias generalizadas e parciais, e pode revelar padrões característicos que apontam para determinada síndrome epilética, além de fornecer informações prognósticas (Guerreiro 2000).

Equipamentos de imagem como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Tomografia Computadorizada (CT), Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) e Tomografia por Emissão de Póstrons (PET), também podem ser utilizados.

Para a maioria dos pacientes diagnosticados com epilepsia, as drogas antiepiléticas (DAE) conseguem controlar as crises. Entretanto, estima-se que em torno de 30% dos pacientes não respondam bem ao tratamento com DAEs, sendo que a metade destes pacientes são candidatos a cirurgia. Além da cirurgia como opção de tratamento, para remoção da área do cérebro onde se iniciam as crises (zona ou foco epileptogênico), outras terapias estão disponíveis, como a estimulação do nervo vago e a dieta cetogênica.

A cirurgia para tratamento da epilepsia é de grande complexidade e alto custo, ficando restrita aos grandes centros que dispõem de uma equipe especializada. O objetivo da cirurgia resectiva é a remoção completa da zona epileptogênica, que é a região cerebral responsável pela geração de crises epiléticas, sendo que este objetivo deve ser alcançado com a preservação da área eloquente. A seleção dos pacientes e a avaliação pré-cirúrgica constitui parte essencial para o sucesso da operação, podendo ser utilizadas diversas ferramentas de diagnóstico, como análise da semiologia da crise (vídeo-EEG), registros eletrofisiológicos, neuroimagem e testes funcionais para definir a localização e os limites da zona epileptogênica (Debets et al. 1997).

As epilepsias passíveis de tratamento cirúrgico podem ser divididas em dois grandes grupos: epilepsias parciais ou focais (lesionais e não lesionais) e generalizadas ou difusas. Para o primeiro grupo, as cirurgias disponíveis são as ressecções focais (não lesionais) e as lesionectomias (lesionais), sendo a esclerose

mesial temporal a principal patologia. Existe ainda o sub grupo das epilepsias parciais associadas à lesões extensas afetando exclusiva ou inicialmente um dos hemisférios cerebrais, neste caso, a alternativa é a hemisferectomia ou calosotomia. No grupo das epilepsias generalizadas, a única alternativa cirúrgica é a calosotomia, indicada no tratamento das encefalopatias epiléticas difusas com crises frequentes e de elevada morbidade.

A avaliação pré-cirúrgica não invasiva nas epilepsias parciais geralmente depende de duas investigações, vídeo-EEG no período ictal, que tem por objetivo monitorar a semiologia da crise, e a ressonância magnética nuclear de alta qualidade. Em 60% dos casos de epilepsia do lobo temporal (ELT) a maioria dos pacientes estará livre de crises após a cirurgia, se a RMN mostrar esclerose hipocampal. Infelizmente, em cerca de 15%-30% dos pacientes com ETL, a RMN é normal. Além disso, para os pacientes com epilepsia extratemporal (ETLE) que apresentam lesões focais na RMN, estas anormalidades nem sempre são o foco epileptogênico. Por estes motivos, várias técnicas de neuroimagem funcional tem sido propostas para complementar o EEG invasivo e a RMN com o objetivo de confirmar o local de início das crises, especialmente quando a RMN é normal ou quando as anormalidades são multifocais.

O estudo de neuroimagem funcional mais utilizado em pacientes com epilepsia é o PET com fludesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ ). Na maioria dos pacientes com ELT, o PET com [ $^{18}\text{F}$ ]FDG revela um padrão muito difuso do hipometabolismo da glicose no período interictal na região do foco epileptogênico (Goethals et al. 2003). Esta técnica, pode não revelar a região epileptogênica, e as anormalidades verificadas podem se estender além da zona de início das crises. Da mesma forma ocorre para a tomografia por emissão de fóton único (SPECT), que avalia a perfusão cerebral, utilizando como marcador o radiofármaco  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD (dicloridrato de etilenodicitestina dietiléster). Assim como para o metabolismo da glicose, a perfusão cerebral no período ictal está aumentada e no período interictal diminuída (la Fougere et al. 2009). Em função destas limitações, para a localização mais precisa do foco epileptogênico, se faz necessário o uso de radiotraçadores mais específicos.

O flumazenil marcado com  $^{11}\text{C}$  é extensamente utilizado, e de fato apresenta uma relevância clínica em diversas patologias, particularmente na epilepsia

(Andersson et al. 2013). Estudos PET utilizando este radiofármaco, tem demonstrado mudanças focais corticais (geralmente diminuição, mas algumas vezes aumento) da captação do flumazenil em pacientes com epilepsia tanto de origem neocortical quanto mesial temporal, incluindo pacientes com RMN normal. Utilizando eletroencefalografia intracranial e comparando com os achados do PET, alguns autores sugerem que de fato a região onde existe uma redução da captação do flumazenil marcado, é a zona de início das crises (Muzik et al. 2000; Juhasz et al. 2001; Hammers et al. 2003). Odano et al. demonstraram que o padrão de ligação do flumazenil ( $^{11}\text{C}$ ) e do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) é muito similar, suportando a hipótese de que o radiofármaco marcado com  $^{11}\text{C}$  pode ser substituído pelo radiofármaco marcado com  $^{18}\text{F}$ .

O uso do  $^{11}\text{C}$  na prática é limitado em função da sua meia-vida curta, sendo indispensável a presença de um ciclotron no mesmo local onde será feito o exame, e múltiplas sínteses do radiofármaco caso vários indivíduos forem examinados. Por possuir uma meia-vida mais longa, a utilização do  $^{18}\text{F}$  é mais viável na prática clínica. Além disso, este radioisótopo possui uma menor energia  $\beta^+$ , o que confere uma melhor resolução à imagem, podendo facilitar a detecção de pequenas lesões, como o foco epileptogênico. Por estes motivos, o desenvolvimento de radiofármacos marcados com  $^{18}\text{F}$  é mais promissor quando comparados com aqueles compostos marcados com  $^{11}\text{C}$ .

### **1.9.2 Receptor GABA x Epilepsia**

Várias evidências sugerem que a mudança no número de receptores  $\text{GABA}_A$  pós-sinápticos, representa um dos principais mecanismos por trás da plasticidade funcional das sinapses GABAérgicas. Além disso, tem sido demonstrado que deficiências na expressão de receptores  $\text{GABA}_A$  estão envolvidas em um grande número de patologias neurológicas e psiquiátricas, como epilepsia, ansiedade, depressão, esquizofrenia e etc.

Todas estas descobertas trouxeram a possibilidade de que falhas nestes neurônios poderiam ser a causa da epilepsia. Evidências relevantes para esta hipótese, mostraram uma perda de neurônios GABAérgicos ou terminais nervosos no foco epiléptico cortical (Ribak 1983; 1985). Em modelos animais, uma diminuição



significativa (30-50%) de neurônios GABAérgicos ou terminais nervosos, foi observada na amígdala de ratos, associada a uma perda equivalente de GABA (Loscher et al. 1987; Callahan et al. 1991). Existem também relatos de diminuição da neurotransmissão GABAérgica, baseado em medidas neuroquímicas realizadas em material do lobo temporal removido através de cirurgia (Rougier et al. 1986).

During et al. concluíram de seus experimentos que existe uma redução na população (ou eficiência) de proteínas transportadoras de GABA na membrana de células neuronais (e/ou células da glia) tanto em tecido epiléptico humano quanto de ratos. Acredita-se que esta diminuição nos transportadores de GABA conduza a uma diminuição da liberação de GABA induzida por glutamato (During et al. 1995).

Outra hipótese relevante seria que mutações poderiam afetar a sinalização GABAérgica. Dentre todas as mutações genéticas, várias mutações em subunidades do receptor GABA<sub>A</sub> foram recentemente identificadas. Estas mutações podem estar envolvidas em um grande número de epilepsias idiopáticas, convulsões febris, e em alguns casos de epilepsia sintomática, como a epilepsia mioclônica severa da infância. A deleção de genes do receptor GABA<sub>A</sub> também foi relacionada com a Síndrome de Angelman. Além disso, mutações em proteínas que controlam a homeostase do cloro, que indiretamente define as consequências funcionais da sinalização do GABA<sub>A</sub>, também foram identificadas (Korey, 2010).

## 2 OBJETIVO

O objetivo da presente pesquisa é desenvolver a síntese, a purificação e os métodos de controle de qualidade do radiofármaco flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ).

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as variáveis de marcação:
  - Atividade de flúor-18.
  - Temperatura de marcação.
  - Massa do precursor (flumazenil).
- Estabelecer os métodos de purificação do produto final.
- Desenvolvimento de metodologia analítica para o controle de qualidade.
- Avaliar a estabilidade da marcação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 INFRAESTRUTURA

Para a realização deste trabalho foi utilizada a infraestrutura dos laboratórios de pesquisa do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

#### 3.2 LISTA DE REAGENTES E MATERIAIS

- Kryptofix 2.2.2 (para síntese), Merck.
- Kryptofix 2.2.2 padrão, USP.
- Carbonato de potássio anidro, Synth.
- Acetonitrila anidra, Merck.
- Água milli Q.
- Flumazenil,  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich.
- Etanol absoluto, Merck.
- Acetato de etila, Synth.
- Ácido fosfórico, Synth.
- Dimetilsulfóxido anidro (DMSO), Merck.
- Iodo sólido, Synth.
- Água enriquecida ( $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ ), CMR.
- Placas de sílica gel 60 em suporte de alumínio (TLC-Silica Gel 60), Merck.
- Cartucho QMA light, Sep-Pack.

#### 3.3 LISTA DE EQUIPAMENTOS

- Cíclotron PET Trace 16 MeV GE Healthcare.
- TRACERlab FX F-N, GE Healthcare.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex, equipado com detector UV/visível (modelo VWD) e radioatividade, bomba ICS-5000 SP (gradiente).
- Scanner de placas cromatográficas com detector de radiação, EZ-SCAN Carroll & Ramsey Associates.
- Analisador Multicanal com detector de iodeto de sódio, Canberra.
- Curiômetro, Capintec CRC 25.

- Cromatógrafo gasoso Bruker 430-GC, equipado com detector de ionização de chama (FID).

### 3.4 SÍNTESE DO FLUMAZENIL ( $^{18}\text{F}$ )

A síntese do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) foi realizada através do módulo de síntese TRACERlab FX F-N (figura 8). Um módulo de síntese é um equipamento desenvolvido para acelerar a produção de um radiofármaco, diminuindo a exposição do operador à radiação e transformando um processo complexo em uma série de operações simples, controladas através de um *software*. O TRACERlab FX F-N, foi criado especialmente para a síntese de radiofármacos marcados com  $^{18}\text{F}$  através de substituição nucleofílica.



Figura 8. Foto do equipamento TRACERlab FX F-N (InsCer, 2013).

Inicialmente, o radioisótopo  $^{18}\text{F}$  é produzido no ciclotron PET Trace 16 MeV da GE *Healthcare* (figura 9). O  $^{18}\text{F}$  foi obtido na forma de fluoreto ( $^{18}\text{F}^-$ ) através da reação nuclear  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , decorrente da irradiação da água enriquecida com 98% de  $^{18}\text{O}$  ( $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ ) pelos prótons acelerados de energia de 16 MeV. Nos casos onde a atividade necessária de fluoreto foi pequena (por volta de 1,85 GBq/50mCi), utilizou-se água enriquecida diluída a 20% para diminuir custos. O porta alvo utilizado é constituído de nióbio, e o volume de água enriquecida foi estipulado em 2,5mL. A corrente aplicada ao alvo variou entre 20-40  $\mu\text{A}$ . O tempo de irradiação

variou de acordo com a atividade de  $^{18}\text{F}^-$  necessária. Ao final da irradiação, a água contendo o  $^{18}\text{F}^-$  é transferida para a célula quente, onde se encontra o equipamento de síntese, através de fluxo de gás hélio.



Figura 9. Cíclotron PetTrace 16 MeV (InsCer, 2012).

A primeira etapa após a irradiação é a separação do  $^{18}\text{F}^-$  da água proveniente do cíclotron por extração de fase sólida (SPE), utilizando uma coluna QMA light, previamente ativada com 5 mL de solução de carbonato de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e 10 mL de água Milli Q. A retirada dos íons  $^{18}\text{F}^-$  da coluna (eluição) foi feita através da solução contendo: kryptofix 2.2.2, carbonato de potássio, acetonitrila e água Milli Q. A concentração desta solução foi estabelecida em experimentos realizados separadamente, conforme o item 3.6.

Após a eluição da coluna QMA light, a solução obtida contendo o  $^{18}\text{F}^-$  é transferida para o frasco reator (onde ocorre a reação), e a mistura é aquecida por 7 minutos a  $60^\circ\text{C}$  e por mais 5 minutos a  $120^\circ\text{C}$  sob fluxo de gás hélio. Nesta etapa ocorre a evaporação dos solventes, através da formação de mistura azeotrópica da acetonitrila com a água. Desta forma, o  $^{18}\text{F}^-$  fica na sua forma livre, podendo atuar como nucleófilo. A figura 10 apresenta um desenho esquemático da reação descrita anteriormente.

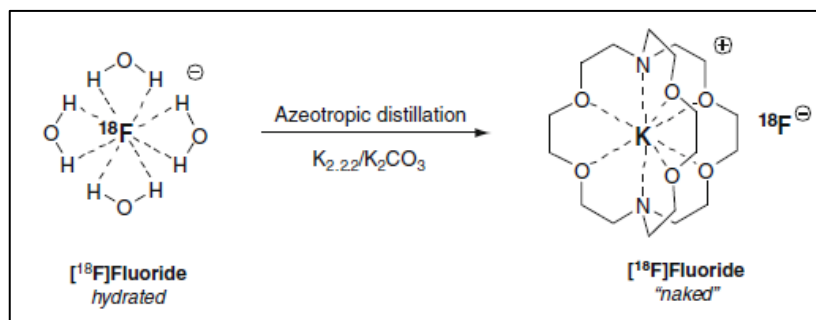


Figura 10. Esquema representativo da ativação do  $^{18}\text{F}$ - utilizando o sistema carbonato de potássio/kryptofix 2.2.2. (Khalil M. 2011).

A água residual é coletada em frasco. Em função da alta tendência dos íons fluoreto em formar pontes de hidrogênio, as reações envolvendo este íon devem ocorrer sem a presença de água e sob condições apróticas. Por este motivo, estas reações geralmente ocorrem na presença de solventes orgânicos dipolares apróticos.

Na próxima etapa da síntese, o precursor (flumazenil) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) é adicionado ao reator (massas diferentes foram testadas). A reação de substituição do isótopo  $^{19}\text{F}$  presente na molécula pelo isótopo  $^{18}\text{F}$  ocorre a temperatura determinada, durante o tempo também estabelecido neste trabalho sob fluxo de gás hélio. Geralmente, as reações de substituição nucleofílica aromáticas ocorrem a temperaturas superiores a  $110^{\circ}\text{C}$ , por este motivo se utiliza DMSO como solvente, cujo ponto de ebulição é  $190^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a mistura de reação é resfriada até atingir  $40^{\circ}\text{C}$  e diluída com 3mL de fase móvel (ácido fosfórico  $0,01\text{ mol L}^{-1}$  e acetonitrila 70:30 v:v).

### 3.5 PURIFICAÇÃO

Uma vez estabelecidas as condições ideais de marcação, através da análise da mistura de reação, a purificação foi realizada por CLAE.

Primeiramente, o produto marcado passa pela coluna de cromatografia líquida acoplada ao módulo de síntese, monitorado através dos detectores de ultravioleta (UV) e radiação. Desta forma, é possível separar somente a fração de interesse (molécula marcada), e o restante é descartado. Utilizou-se a coluna de fase-reversa Macherey-Nagel Nucleosil C18 250x16 mm como fase estacionária, e como fase móvel a mistura de ácido fosfórico  $0,01\text{ mol L}^{-1}$  e acetonitrila 70:30 (v:v). Foi

estabelecido o fluxo de 8 mL/min e  $\lambda=254\text{nm}$ . Para a determinação do tempo de retenção do produto marcado, injetou-se previamente o padrão de flumazenil na concentração de 75  $\mu\text{g/mL}$  sob as mesmas condições citadas anteriormente.

Como na fração coletada ainda existe a presença de acetonitrila e ácido fosfórico presentes na fase móvel, foi necessário utilizar um cartucho de fase-reversa  $\text{tC}_{18}$  para remover estes solventes. Para tornar a solução mais aquosa e evitar que a acetonitrila arraste o flumazenil (que deve ficar retido no cartucho) o produto marcado foi diluído com 40mL de água Milli Q. Após passar toda a mistura pelo cartucho, o mesmo foi lavado com 10mL de água Milli Q para remover qualquer traço de solvente que possa ter permanecido. Em seguida, o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) foi eluído com 1mL de etanol e diluído com 10mL de água. A figura 11 apresenta a tela do software de controle do equipamento.

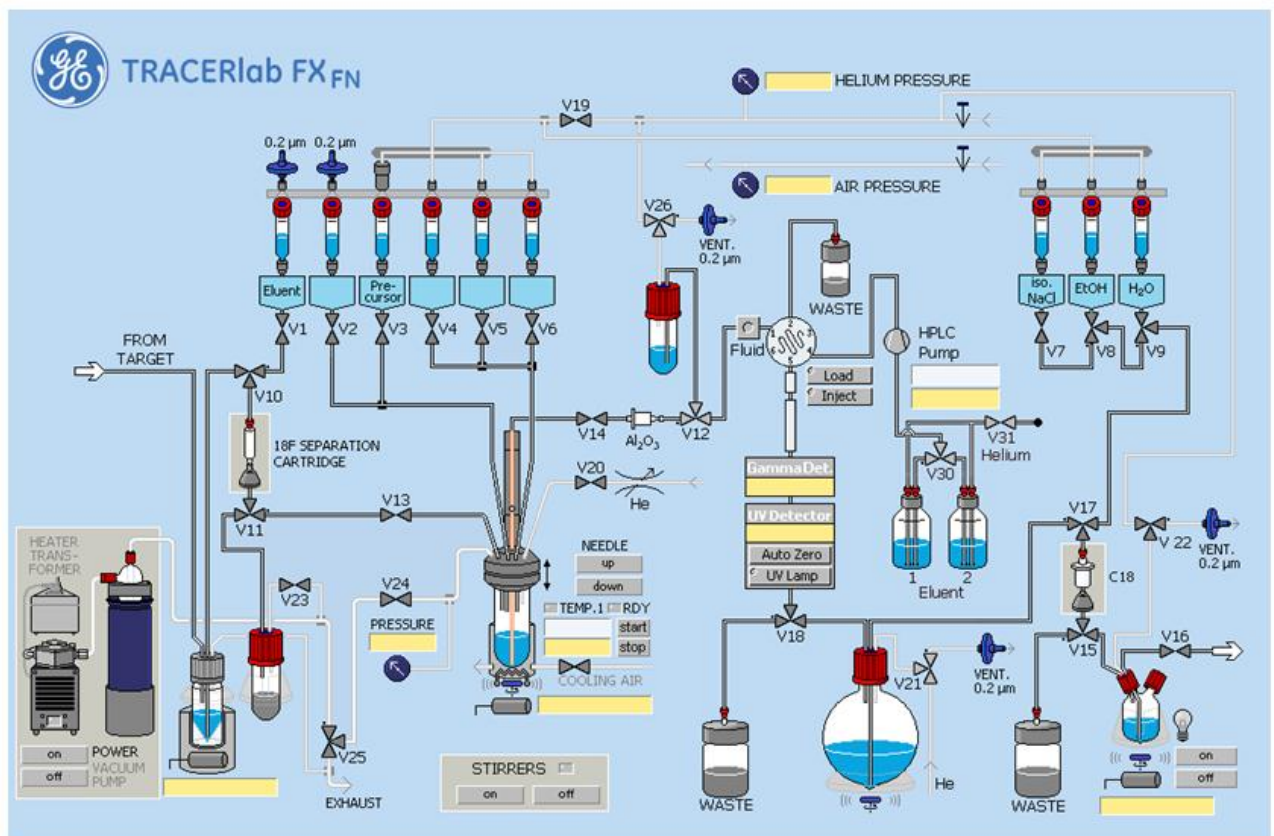


Figura 11. Diagrama do módulo de síntese TRACERlab FX FN.

### 3.6 ELUIÇÃO DA COLUNA QMA PLUS LIGHT

A eficiência de eluição da coluna Sep-Pack Accel Plus QMA light, foi testada utilizando-se 02 diferentes concentrações de solução eluente:

- Solução A:
  - Kryptofix 2.2.2: 2,35mg (6,24 $\mu$ mol)
  - K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 0,48mg (3,45 $\mu$ mol)
  - Água Milli Q: 0,5mL
  - Acetonitrila: 1mL
- Solução B:
  - Kryptofix 2.2.2: 7,7mg (20,68 $\mu$ mol)
  - K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 1,44mg (10,43 $\mu$ mol)
  - Água Milli Q: 0,5mL
  - Acetonitrila: 1mL

Os experimentos foram realizados utilizando-se o módulo de síntese, onde a atividade inicial de <sup>18</sup>F<sup>-</sup> é medida através de um detector do tipo Geiger-Muller, devidamente calibrado, acoplado ao equipamento. A atividade de <sup>18</sup>F<sup>-</sup> utilizada para testar a solução A e B foi de 250mCi / 9,25GBq.

A concentração da solução A foi a mesma utilizada por Ryzhikov et al. (2004) e a solução B foi aproximadamente três vezes a concentração da solução A. Optou-se por não utilizar concentrações superiores às da solução B pois sabe-se que o precursor flumazenil é sensível a meios muito básicos, podendo ser degradado. Além disso, também conforme Ryzhikov et al. (2004) parece ser importante manter a equivalência molar entre o flumazenil e o complexo [K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K2.2.2].

### 3.7 VARIÁVEIS DE MARCAÇÃO

#### 3.7.1 Massa do precursor

A massa do precursor testada foi de 6,27mg e 2,09mg.

#### 3.7.2 Temperatura de aquecimento da mistura durante a etapa de substituição nucleofílica



A fim de otimizar a produção do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), três diferentes temperaturas de reação foram estudadas: 130°C, 145°C e 160°C.

### 3.7.3 Tempo de aquecimento da etapa de substituição nucleofílica

O tempo de aquecimento foi determinado com base nos resultados obtidos por Ryzhikov et al. (2004), que definiu 15 minutos como tempo ideal.

### 3.7.4 Atividade de $^{18}\text{F}^-$

Para os primeiros experimentos foram utilizadas atividades baixas, em função da necessidade de abrir a *hot cell* para retirada manual da mistura de reação para análise. A atividade variou entre 1,2 e 2,5GBq (34,2 e 69,4mCi). Após serem estabelecidas as condições ideais de marcação, a síntese foi realizada com atividades mais altas de  $^{18}\text{F}^-$ .

## 3.8 CONTROLE DE QUALIDADE

Os testes de controle de qualidade foram estabelecidos com base nos requisitos descritos na Farmacopéia Americana para o radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]FDG e no trabalho de Ryzhikov et al. (2004).

### 3.8.1 Pureza Radioquímica

A pureza radioquímica pode ser definida como a fração da radioatividade total que está presente no produto final na forma radioquímica desejada. Geralmente, as técnicas utilizadas são cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para o [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, a Farmacopéia Americana, exige que a pureza radioquímica seja  $\geq 90\%$  (USP 2012).

#### 3.8.1.1 Cromatografia em Camada Delgada

Para avaliar a pureza radioquímica foi realizado CCD utilizando como fase estacionária placa de Sílica Gel 60 de 10x2cm, sendo que a distância de corrida (distância entre o ponto de aplicação e a linha de front) é de 8 cm. Como fase móvel (solvente) utilizou-se uma mistura de acetato de etila/etanol/água (80/15/5 v/v). Cerca de 1 $\mu\text{L}$  de amostra foi aplicada na placa com auxílio de uma pipeta automática. Em seguida, a placa foi colocada na cuba saturada com o solvente e, ao

final da corrida, foi avaliada por meio do *TLC scanner* (figura 12). O padrão foi revelado com cristais de iodo.

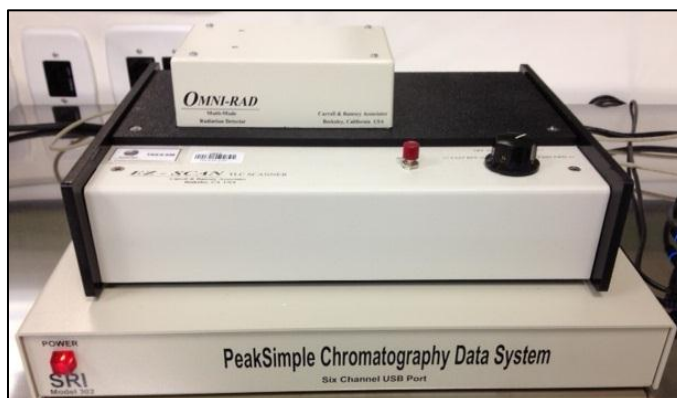


Figura 12. TLC Scanner, Omini-Rad (InsCer, 2013).

### 3.8.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Outra técnica utilizada para a determinação da pureza radioquímica foi cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o equipamento Dionex (figura 13) com detector UV/Visível e detector de radioatividade. Para este sistema, foi empregada uma coluna Agilent Pursuit C18 300x3,9x10 mm como fase estacionária, solução de ácido fosfórico 0,01 mol L<sup>-1</sup> e acetonitrila (70/30 v/v) como fase móvel, sendo que o fluxo foi estabelecido em 1,3 mL/min e o comprimento de onda no ultravioleta de 254 nm. O perfil do padrão de flumazenil foi definido neste mesmo sistema cromatográfico.

O comportamento do fluoreto produzido no ciclotron também foi avaliado em ambos métodos cromatográficos, CCD e CLAE, através dos detectores de radiação.

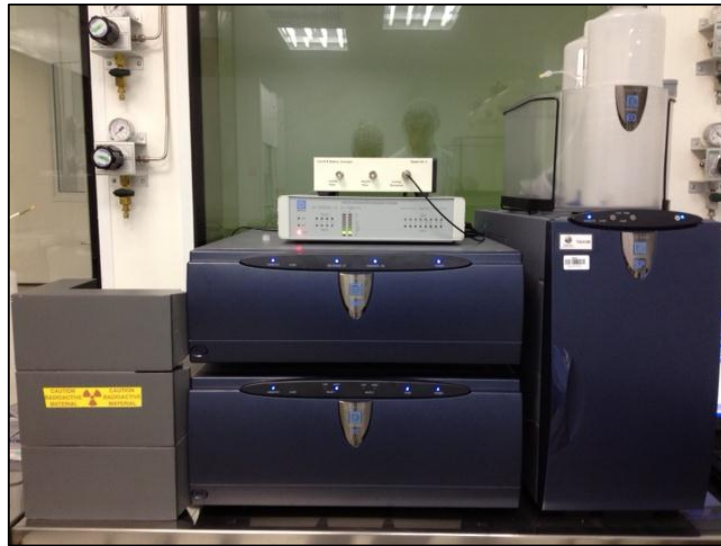


Figura 13. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Dionex (InsCer, 2013).

### 3.8.2 Pureza Química

#### 3.8.2.1 Atividade Específica

Atividade específica de uma amostra radioativa é definida como a quantidade de radioatividade por número de moles. Vários elementos possuem mais de um isótopo, sendo que alguns são estáveis, como é o caso do flúor ( $^{19}\text{F}$  é o isótopo estável). Quando isótopos estáveis de um elemento estão presentes junto com o isótopo radioativo, então os isótopos estáveis são chamados de carreador.

Para o cálculo da atividade específica do produto final, foi feita uma curva de calibração utilizando CLAE, para possibilitar a quantificação da massa de flumazenil presente na amostra. Para todos os pontos a injeção foi realizada em triplicata. Segue abaixo as concentrações utilizadas:

- Ponto 1: 0,01008mg/mL
- Ponto 2: 0,05103mg/mL
- Ponto 3: 0,10148mg/mL
- Ponto 4: 0,2025mg/mL
- Ponto 5: 0,405mg/mL

O resultado será a razão entre a atividade radioativa e o número de moles do produto não radioativo em 1mL de solução. Como não existe monografia oficial do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), não existe um valor de referência estabelecido para atividade específica.

### **3.8.2.2 Kryptofix 2.2.2.**

A presença de kryptofix 2.2.2 foi verificada utilizando o método conhecido como *spot test*, descrito na monografia do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG da Farmacopéia Européia. O kryptofix 2.2.2 é um reagentes utilizado na síntese, extremamente tóxico, podendo provocar convulsões. Neste método, a solução amostra e a solução padrão de kryptofix 2.2.2 na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (limite permissível) foram aplicadas na placa de sílica gel e reveladas em cuba cromatográfica saturada com iodo sólido. A mancha obtida para amostra deve ser menos intensa que a mancha da solução padrão (Europe 2008).

### **3.8.2.3 Solventes Residuais**

O produto final foi testado para a presença de acetonitrila e etanol através da técnica de Cromatografia Gasosa (CG). O teste é um ensaio limite, onde é feita a comparação da amostra com um padrão de concentração conhecida para cada solvente. Foi utilizada a solução padrão contendo 0,01% de acetonitrila e 0,1% de etanol. A solução padrão foi injetada sempre antes das análises. Segundo a Farmacopéia Americana, o limite de etanol é 0,5% (5000 ppm) e de acetonitrila é 0,04% (410 ppm) (USP 2012).

Para a verificação da presença destes solventes orgânicos foi utilizado o cromatógrafo Bruker 430-GC equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada a coluna Bruker FourFactor Capillary, VF-200ms, 30m x 0,32mm, sendo que o fluxo do gás de transporte foi de 2mL/min e a temperatura do detector ajustada para 200°C. O volume de injeção foi de 1 $\mu\text{L}$ .

### **3.8.3 Pureza e Identidade Radionuclídica**

A pureza radionuclídica foi avaliada por um espectrômetro de raios gama com detector de iodeto de sódio (NaI), pela determinação da energia dos fótons gama (figura 14). Como a energia de 0,511 MeV e o de 1,022 MeV é uma característica

comum aos isótopos emissores de pósitrons, o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) também foi verificado com auxílio de um curiômetro.

O critério de aceitação segue as exigências da Farmacopéia America USP 35. O  $t_{1/2}$  deve estar entre 105-115 minutos. Não menos de 99,5% dos picos observados no espectro devem corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV ou os picos de espalhamento Compton do  $^{18}\text{F}$  (USP 2012).



Figura 14. Espectrômetro de raios gama (InsCer, 2013).

#### 3.8.4 pH

O pH foi determinado com auxílio de fitas reativas na faixa de 0-14. O pH do produto final deve estar entre 4,5 e 7,5 para que possa ser administrado via intravenosa.

#### 3.8.5 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada através da determinação da pureza radioquímica, utilizando-se a técnica CLAE. Avaliou-se no tempo 0, 4 e 8 horas após a síntese. Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A discussão será apresentada após cada resultado obtido procurando facilitar o desenvolvimento desta dissertação.

### 4.1 ELUIÇÃO DO CARTUCHO QMA PLUS LIGHT

Conforme o descrito no item 4.5, após a produção do  $^{18}\text{F}$  no ciclotron, a água contendo este radioisótopo passa pelo cartucho QMA, onde o mesmo fica adsorvido. Em seguida, o  $^{18}\text{F}^-$  precisa ser eluído. Para tal, duas concentrações diferentes da solução eluente, composta por kryptofix 2.2.2,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetonitrila e água Milli Q, foram testadas. O kryptofix 2.2.2. tem sido utilizado nas sínteses que envolvem  $^{18}\text{F}^-$  desde o desenvolvimento do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Este éter coroa é muito eficiente em solvatar cátions, neste caso o  $\text{K}^+$ , deixando o  $^{18}\text{F}^-$  livre para atuar como nucleófilo.

A tabela 3 resume a eficiência de eluição da coluna QMA light com as diferentes concentrações utilizadas.

Tabela 2. Eficiência de eluição do cartucho QMA

| <b>Solução</b> | <b>Atividade inicial</b> | <b>Atividade eluída</b> | <b>Eficiência de eluição (%)</b> |
|----------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| A ( $n = 1$ )  | 250mCi / 9250MBq         | 50mCi / 1850MBq         | 20,0                             |
| B ( $n = 1$ )  | 250mCi / 9250MBq         | 197mCi / 7289MBq        | 78,8                             |

O primeiro teste realizado utilizou a concentração de kryptofix (2,35mg / 6,24 $\mu\text{mol}$ ) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,44mg / 3,45 $\mu\text{mol}$ ) proposta por Ryzhikov et al. (2004). Entretanto, a eficiência de eluição foi de apenas 20%, o que provavelmente deve-se a diferença entre os cartuchos utilizados. Neste trabalho, foi utilizado o cartucho QMA Plus Light (Waters) contendo resina de troca aniônica, que possui 130mg do polímero de cloreto de amônio quaternário em seu interior, com capacidade de extração de íons de 230 $\mu\text{eq/g}$ . Já o cartucho utilizado por Ryzhikov et al. (2004) foi desenvolvida no próprio laboratório, possuindo em torno de 15-20mg de resina. Com uma quantidade menor de resina, menos carbonato é necessário para remover o  $^{18}\text{F}^-$  do cartucho. Por este motivo foi preciso aumentar a concentração da solução eluente para este estudo. Como consequência, a quantidade de flumazenil também precisou ser aumentada em função da degradação deste composto em meio básico, conforme mencionado anteriormente.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE FLUMAZENIL NOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

Antes da realização das sínteses, o perfil do padrão de flumazenil foi avaliado nos sistemas cromatográficos definidos para CCD e CLAE.

Na cromatografia em camada delgada o flumazenil (apolar) é arrastado pelo solvente, sendo que seu fator de retenção é de aproximadamente  $R_f = 0,6$  (sistema cromatográfico descrito no item 3.8.1.1.).

Na cromatografia líquida de alta eficiência, o tempo de retenção do flumazenil foi de 4,7 minutos, no sistema cromatográfico descrito no item 3.8.1.2. A figura 15 mostra o cromatograma obtido com a injeção do flumazenil.

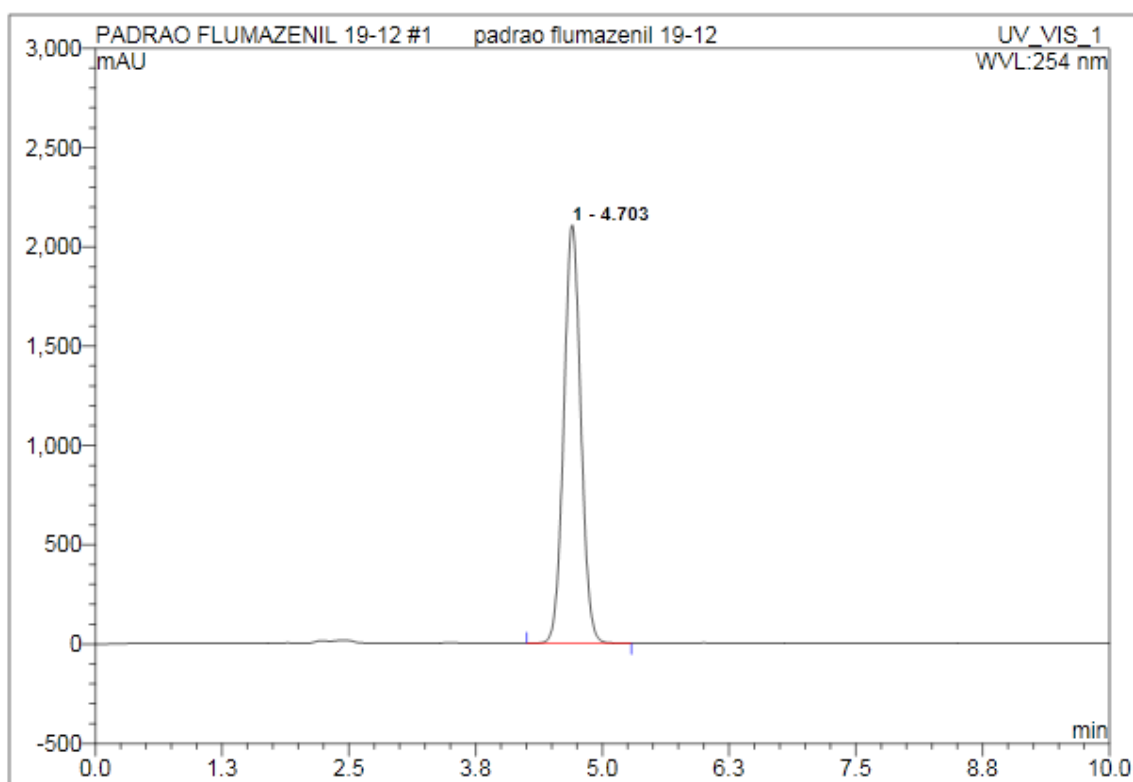


Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE do padrão de flumazenil.

## 4.3 AVALIAÇÃO DO $^{18}\text{F}$ LIVRE NOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

Na CCD o  $^{18}\text{F}^-$  (polar) fica na origem da placa (ponto de aplicação da amostra), não sendo arrastado pelo solvente. Seu fator de retenção é  $R_f = 0$ , conforme mostra

a figura 16. No CLAE, o  $^{18}\text{F}^-$  apresentou tempo de retenção de aproximadamente 2,3 minutos, conforme mostra o cromatograma da figura 17.

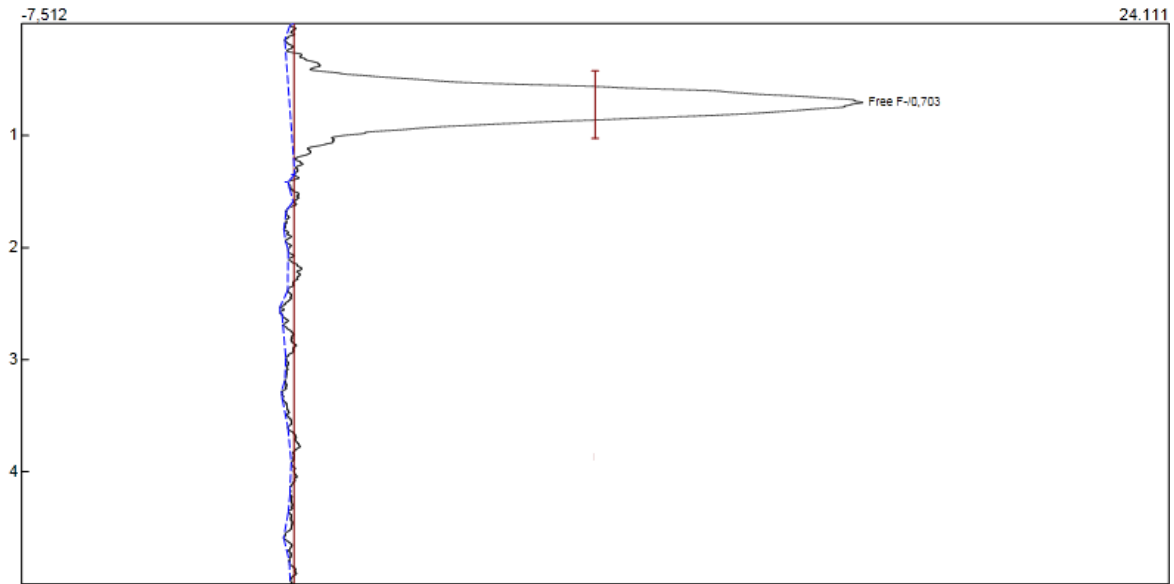


Figura 16. Cromatograma obtido por CCD do  $^{18}\text{F}^-$  livre.

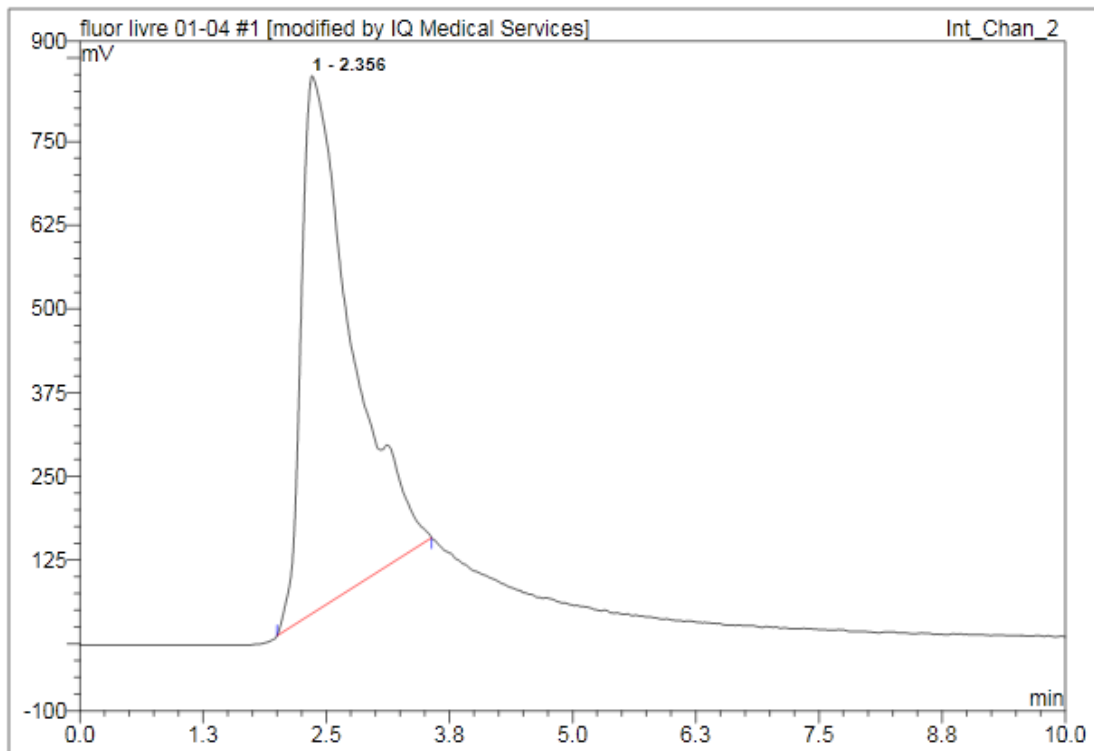


Figura 17. Cromatograma obtido por CLAE do  $^{18}\text{F}^-$ .



Comparando o Rf do fluoreto e do flumazenil nos dois métodos cromatográficos, percebe-se que os sistemas escolhidos estão adequados para esta análise, uma vez que é possível separar os dois componentes.

#### 4.4 INFLUENCIA DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO E FORMAÇÃO DE IMPUREZAS

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos a partir da análise da mistura de reação, ou seja, antes das etapas de purificação do produto. Foi utilizada a solução eluente de  $^{18}\text{F}^-$  considerada mais eficiente (solução B), e 6,27mg (20,68 $\mu\text{mol}$ ) de precursor para todos os experimentos. Segundo Ryzhikov et al. (2004), a equivalência molar entre o complexo  $[\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2]$  e o flumazenil é importante para assegurar a alta taxa de incorporação do radioisótopo na molécula, pois quanto maior a quantidade de  $[\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2]$ , maior a taxa de degradação do flumazenil o que diminui o rendimento. Por este motivo, foi necessário aumentar a massa do precursor em três vezes com relação ao trabalho de Ryzhikov et al.

Tabela 3. Resultados da eficiência de marcação e da formação de impurezas não radioativas

| Experimento | Atividade $^{18}\text{F}$ |       | Temperatura de marcação (°C) | Eficiência de marcação (%) | Impurezas não radioativas (%) |
|-------------|---------------------------|-------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
|             | mCi                       | GBq   |                              |                            |                               |
| 1           | 59,0                      | 2,183 | 130                          | 36,81                      | 36,89                         |
| 2           | 42,3                      | 1,565 | 130                          | 36,98                      | 40,93                         |
| 3           | 43,8                      | 1,620 | 145                          | 72,97                      | 38,50                         |
| 4           | 35,6                      | 1,317 | 145                          | 69,91                      | 42,29                         |
| 5           | 34,2                      | 1,265 | 145                          | 75,93                      | 33,70                         |
| 6           | 122,2                     | 4,514 | 145                          | 77,92                      | 37,97                         |
| 7           | 487,2                     | 18,01 | 145                          | 61,82                      | 44,26                         |
| 8           | 63,9                      | 2,364 | 160                          | 71,09                      | 37,19                         |
| 9           | 69,4                      | 2,567 | 160                          | 71,13                      | 41,32                         |

Analisando os dados, percebe-se que a 145°C e a 160°C a taxa de incorporação do fluoreto na molécula é muito parecida (72 $\pm$ 6% série 3-7; 70 $\pm$ 3% série 8-9) quando comparado a temperatura de 130°C (36,8 $\pm$ 0,3% série 1-2). Quanto a formação de impurezas não radioativas, as três temperaturas testadas apresentaram resultados muito similares (39 $\pm$ 3% série 1-2; 39 $\pm$ 4% série 3-7; 39 $\pm$ 3%

série 8-9). Como não foi constatada uma diferença significativa entre as temperaturas 145°C e 160°C, optou-se por padronizar 145°C com o objetivo de reduzir o tempo de síntese, pois a solução precisa atingir esta temperatura e depois ser resfriada novamente.

Verificando os cromatogramas resultantes da análise das misturas de reação (tabela 3) por CLAE, verificou-se a formação de um subproduto principal. Conforme o exemplo ilustrado na figura 18 (análise da série 3), o tempo de retenção deste composto é 2,5 minutos, sendo que o mesmo também é marcado pelo fluoreto, como pode-se perceber no cromatograma da figura 19 (pico número 2). Ryzhikov et al. (2004) já haviam mencionado que uma possível rota de decomposição pode ser a hidrólise do grupo éster ( $\text{OCOC}_2\text{H}_5$ ) na molécula de flumazenil.

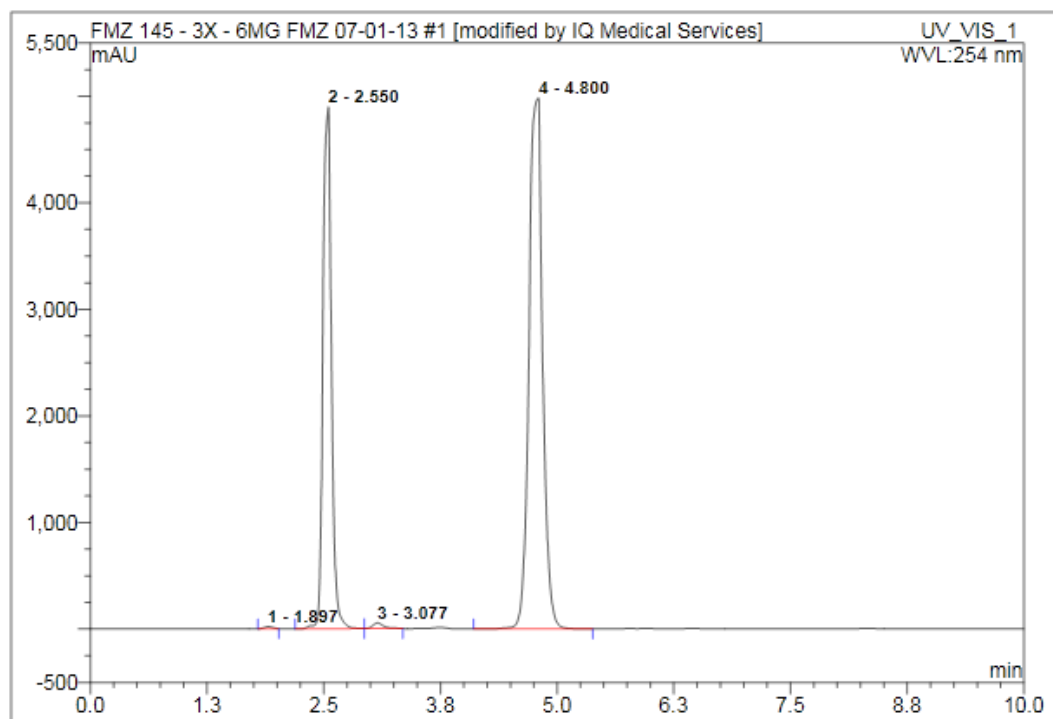


Figura 18. Análise por CLAE da mistura de reação da série 3, detector de UV.

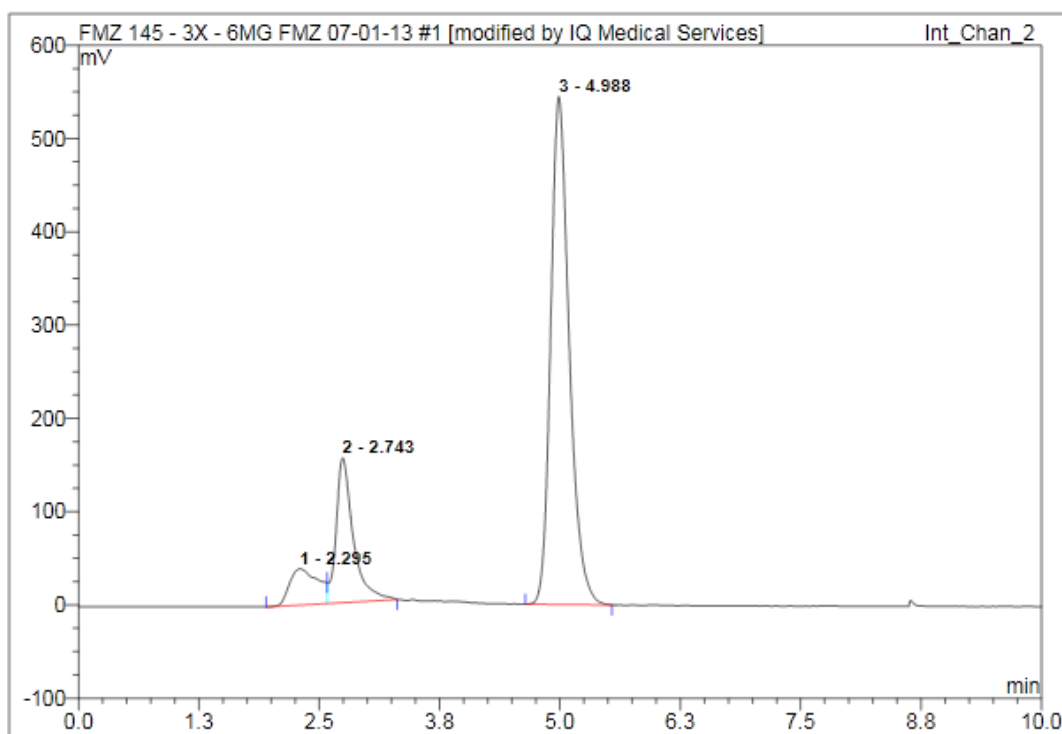


Figura 19. Análise por CLAE da mistura de reação da série 3, detector de radiação.

Apesar de não ser possível separar completamente o pico número 2 do pico número 1, sabe-se que o número 1 é flúor livre, e não algum outro subproduto marcado, após a verificação do seu tempo de retenção (figura 17) através da injeção do composto puro. Além disso, não é possível detectá-lo através do detector de UV, mais um indício de que de fato é  $^{18}\text{F}$  livre, na forma de fluoreto, que não absorve no comprimento de onda utilizado (254nm).

Após a escolha da temperatura, foi feita uma síntese com 2,07mg de flumazenil, ou seja,  $\frac{1}{3}$  da quantidade inicial, mantendo-se a concentração da solução eluente de  $^{18}\text{F}^-$ . Este teste foi realizado para verificar a possibilidade de diminuir o custo da síntese, visto que o precursor é o reagente mais caro. Entretanto, a taxa de degradação do flumazenil foi de 79,84% ( $n = 1$ ). Percebe-se claramente que o precursor é degradado em excesso de base (carbonato), conforme o mencionado por Ryzhikov et al. (2004). Alguns autores sugerem a substituição do carbonato por oxalato, como uma alternativa viável para os compostos sensíveis ao meio básico (Khalil 2011).

Ryzhikov et al. (2004) mencionaram em seu trabalho que a radiofluorinação realizada a  $130^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos, com uma razão equimolar entre

[K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K2.2.2] e o flumazenil, assegura a obtenção de rendimentos reprodutíveis (62±8%), e a formação de subprodutos não maior que 3-4%.

Yoon et al. (2003) descreveram a síntese do 2'-[<sup>18</sup>F]fluoroflumazenil (FFMZ) utilizando como precursor variações do flumazenil realizadas em etapas prévias. A eficiência de marcação encontrada foi de 68% e a pureza radioquímica 98%. Entretanto, a necessidade de preparar o precursor previamente torna o processo mais caro e demorado. Além disso, Dedeurwaerdere et al. (2009) demonstraram através de um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar, que o flumazenil (<sup>18</sup>F) é um radiofármaco superior ao 2'-[<sup>18</sup>F]fluoroflumazenil, pois apresenta menos ligações não específicas em função do metabolismo mais lento e da menor formação de metabólitos.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO

A fração correspondente ao flumazenil (<sup>18</sup>F) foi coletada aproximadamente do minuto 14,5 até o minuto 16, apresentando uma pequena variação entre corridas por se tratar de um método manual, baseado na visualização do pico pelo operador. As figuras 20 e 21 mostram um exemplo dos cromatogramas obtidos durante a purificação.

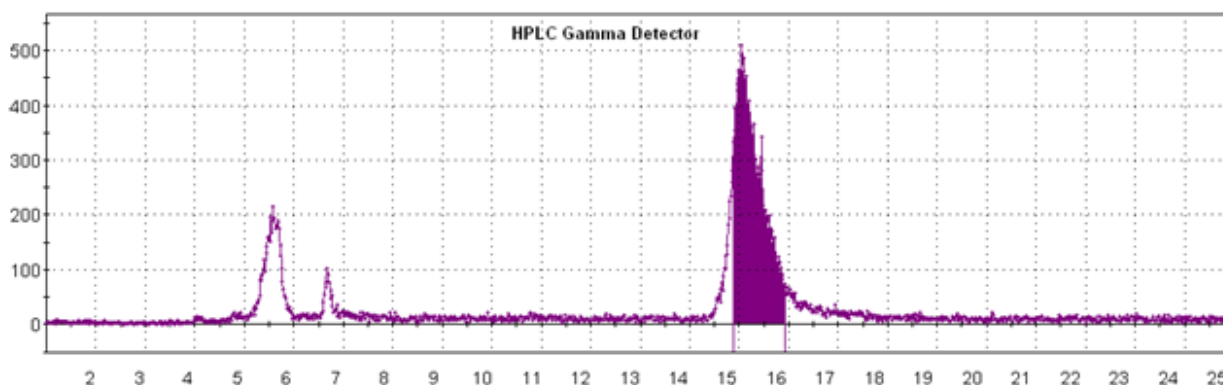


Figura 20. Purificação do radiofármaco através do CLAE (detector gama). Nota: eixo X, tempo em minutos; eixo Y, CPS.

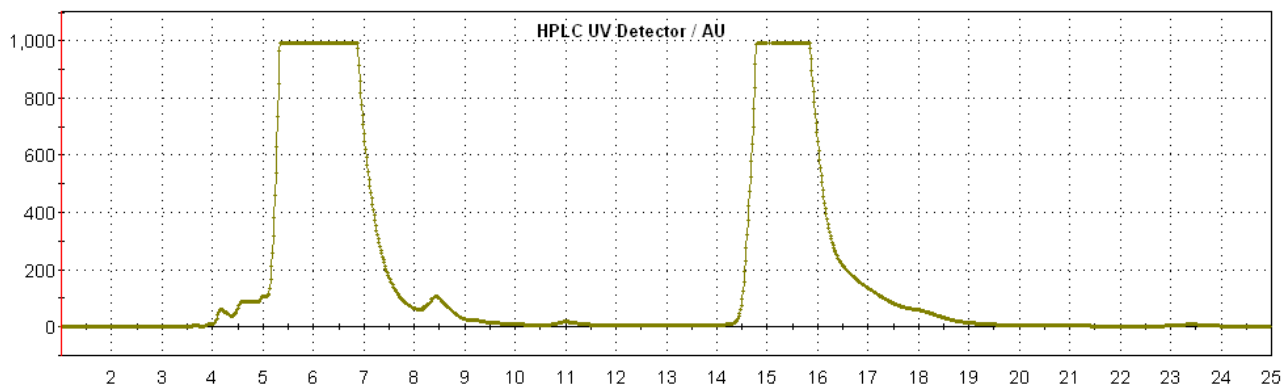


Figura 21. Purificação do radiofármaco através do CLAE (detector UV). Nota: eixo X, tempo em minutos; eixo Y, unidades de absorbância.

Desta forma se obteve o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) purificado, mas ainda com a presença de solventes oriundos da fase móvel, que foram removidos através do cartucho  $\text{tC}_{18}$ . Entretanto, a quantidade de etanol utilizada para eluir o  $\text{tC}_{18}$  permaneceu no produto final, sendo cerca de 20 vezes maior que o permitido pela Farmacopéia Americana para soluções injetáveis (limite de etanol 0,5%).

Para diminuir a concentração de etanol no produto final, foi realizada uma adaptação no módulo de síntese, possibilitando a aplicação de vácuo no frasco de coleta do produto. Uma mangueira de silicone ligada à bomba de vácuo, foi acoplada a uma das entradas do frasco. A bomba foi colocada ao lado do módulo de síntese, dentro da *hot cell*, e acionada pelo lado de fora da mesma para diminuir a exposição dos operadores à radiação durante o processo. O etanol foi então evaporado com aplicação de vácuo e leve fluxo de gás hélio durante aproximadamente 5 minutos. Este procedimento simples permitiu que a quantidade de etanol fosse reduzida a níveis aceitáveis. O tempo total de síntese foi de 80 minutos.

Neste trabalho, o produto sintetizado não foi aplicado em seres vivos, por isso, nenhum método de esterilização foi utilizado. Quando este radiofármaco for produzido para administração intravenosa, a água Milli Q deverá ser substituída por solução salina 0,9%, e para a esterilização poderá ser utilizado um filtro Millipore  $0,22\mu\text{m}$  ao final do processo.

Ryzhikov et al. (2004) não utilizaram CLAE para purificação do produto, apenas o cartucho  $\text{tC}_{18}$ , eluindo o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) com cloreto de metileno. Ainda assim, nas

condições ideais de síntese definidas pelos autores, foram encontrados de 3-4% de subprodutos radioativos.

#### 4.6 RENDIMENTO

Vários aspectos podem influenciar no rendimento da síntese. O que se mostrou mais evidente neste estudo, foi a perda do produto sintetizado durante as etapas de purificação e o emprego de altas atividades. Analisando a mistura de reação concluiu-se que a eficiência de marcação é bastante elevada ( $72 \pm 6\%$ ,  $145^\circ\text{C}$ ), sugerindo que esta reação é de fato favorecida. Apesar disso, existe uma grande perda do produto após a purificação, especialmente quando atividades altas foram utilizadas. Por exemplo, com atividade inicial de  $70,3\text{GBq}$  ( $1,9\text{Ci}$ ), o rendimento não corrigido foi de  $5,7\%$  e corrigido foi de  $9,3\%$ . Em contrapartida, iniciando a síntese com atividade bem mais baixa,  $2,641\text{GBq}$  ( $71,4\text{mCi}$ ), o rendimento não corrigido foi de  $11,34\%$  e corrigido  $19,17\%$ . Uma explicação possível para estes resultados é a radiólise. Bayly e Evans (2006) em sua revisão, reportaram que radiólise é um fenômeno onde radiação de alta energia degrada os compostos. Quando a radiação é emitida de um radionuclídeo que está presente em um radiotraçador (radiofármaco), e quebra as ligações químicas desta mesma molécula, então este processo é conhecido como autoradiólise. As radiações de alta energia podem gerar radicais livres na água, como peróxido de hidrogênio e radicais livres de peridroxil, que por sua vez podem danificar as moléculas. Este fenômeno é extremamente dependente da concentração radioativa do produto; quanto maior a concentração, maiores os efeitos da radiólise (Fawdry 2007; Jacobson et al. 2009). Por aspectos técnicos relativo aos equipamentos utilizados para a execução deste trabalho e por motivos de radioproteção, não foi possível analisar o produto bruto (antes da purificação) nos casos onde altas atividades foram utilizadas. Somente com a análise do produto purificado, não é possível afirmar se a degradação da molécula foi maior nestes casos.

Conforme mencionado anteriormente, as etapas de purificação parecem ter um grande impacto no rendimento. A diluição da fração coletada com água, para torná-la mais aquosa e evitar que o flumazenil seja arrastado pela acetonitrila, é um parâmetro de extrema importância. À medida que esta mistura passa pelo cartucho  $\text{tC}_{18}$ , se o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) não ficar retido, todo composto sintetizado será descartado

junto com a solução. Como todo resíduo gerado durante o processo é armazenado no mesmo local, não foi possível verificar se o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) estava sendo descartado. Outra possibilidade é que, como o volume que passa pelo cartucho  $\text{tC}_{18}$  é muito grande, cerca de 56mL (40mL água mais a fração coletada), e o cartucho é pequeno, o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) pode estar sendo arrastado à medida que a solução passa. Este fenômeno pode estar ocorrendo mesmo sem a influência da acetonitrila. Uma forma de contornar este problema é utilizar um cartucho maior, ou colocar dois cartuchos em série.

No trabalho de Ryzhikov et al., o rendimento obtido corrigido para o decaimento foi de  $47\pm 3\%$  ( $n = 5$ ), sendo que a atividade inicial de fluoreto variou de 0,37 a 7,4GBq (10 a 200mCi), e o tempo de síntese foi de 45 minutos. A principal diferença entre o presente trabalho e o mencionado anteriormente foi o método de purificação. Conforme a discussão anterior, grande parte do produto é perdido durante as etapas de purificação, por isso a diferença no rendimento obtido.

## 4.7 CONTROLE DE QUALIDADE

### 4.7.1 Pureza Radioquímica

#### 4.7.1.1 Cromatografia em Camada Delgada

A figura 22 apresenta o cromatograma obtido pela análise do produto por CCD, utilizando o sistema cromatográfico descrito anteriormente.

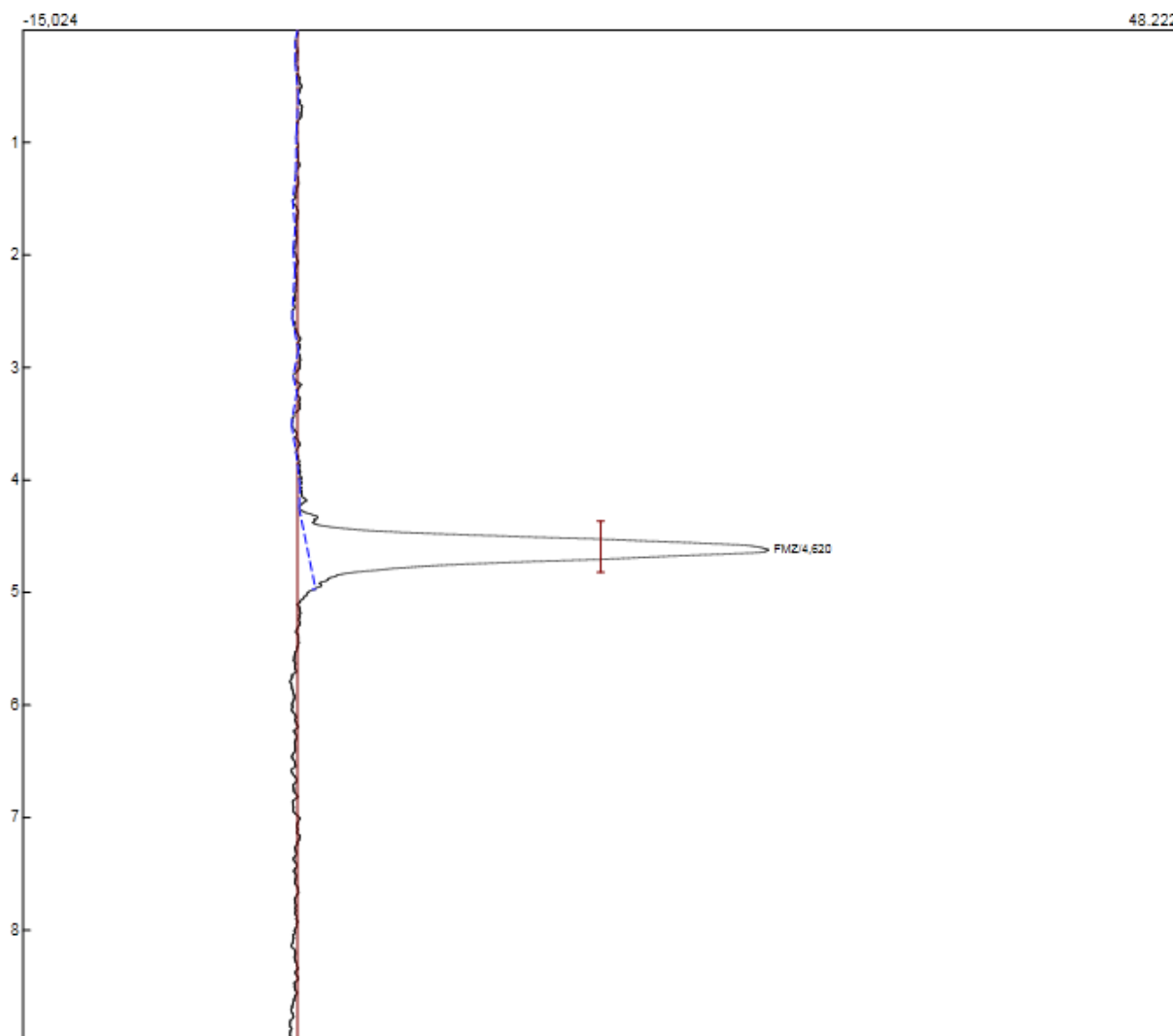


Figura 22. Cromatograma flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) purificado (CCD). Nota: Número de contagens 48.222.

A distribuição da radioatividade da placa foi verificada com auxílio de um *scanner* acoplado a um detector de radiação. A velocidade de escaneamento é de 2 cm por minuto. Na figura 22, o eixo do Y representa a distância em centímetros e o eixo do X o número de contagens da placa. Para cálculo do fator de retenção utilizou-se a fórmula  $R_f = a/b$ , sendo que “a” é a distância percorrida pela amostra e “b” é a distância percorrida pelo solvente (fase móvel). Neste caso, a distância percorrida pela solvente é 8 cm e a distância percorrida pela amostra 4,62 cm. Portanto, o fator de retenção encontrado foi  $R_f = 0,577$ , similar ao encontrado por Ryzhikov et al. ( $R_f=0,75$ ) utilizando o mesmo sistema cromatográfico. Esta pequena diferença pode ser em função de variações na análise, como solventes utilizados e as condições do laboratório. Pode-se afirmar que este produto é de fato flumazenil comparando com o valor de  $R_f$  obtido com a solução padrão,  $R_f = 0,6$ .



#### 4.7.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A figura 23 apresenta o cromatograma obtido pela análise do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) através de cromatografia líquida, utilizando o sistema cromatográfico descrito anteriormente.

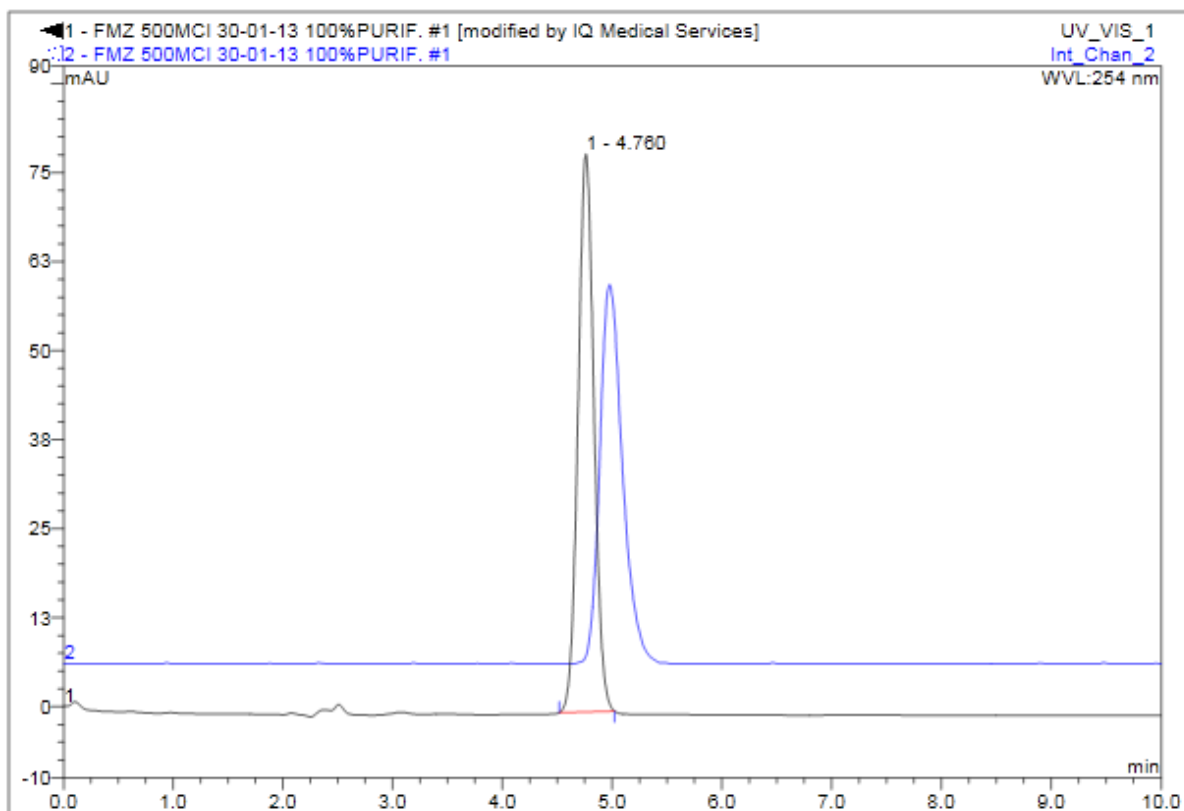


Figura 23. Cromatograma flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) purificado (CLAE).

Na figura 23, a linha azul representa o detector de radiação e a linha preta o detector de UV. Os picos não estão exatamente sobrepostos, ou seja, não são detectados exatamente ao mesmo tempo, pois como os detectores são dispostos em sequência, a amostra passa primeiro pelo detector UV e depois pelo detector de radiação. Apesar disso, pode-se afirmar que este composto é o flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ), quando comparando com o tempo de retenção do padrão.

Todas as amostras analisadas apresentaram grau de pureza superior a 99%.

#### 4.7.2 Pureza Química

##### 4.7.2.1 Atividade Específica

Para a síntese do radiofármaco iniciada com 2,22GBq (60mCi) de  $^{18}\text{F}^-$ , a SA obtida foi 0,04662GBq/ $\mu\text{mol}$  (1,276mCi/ $\mu\text{mol}$ ) e para a síntese iniciada com 92,5GBq (2500mCi), a SA obtida foi de 0,997GBq/ $\mu\text{mol}$  (26,95mCi/ $\mu\text{mol}$ ). O coeficiente de correlação foi de  $r = 0,9998$ , o que demonstra a linearidade da curva.

Conforme o esperado, a atividade específica encontrada foi extremamente baixa. Isto deve-se ao fato de que na molécula do flumazenil, existe a presença do carreador, pois um átomo de  $^{19}\text{F}$  está presente na molécula. Este átomo estável é substituído pelo  $^{18}\text{F}$  (instável) durante a síntese. Entretanto, a substituição não ocorre em 100% das moléculas de flumazenil. Além disso, as duas moléculas são quimicamente iguais, impossibilitando a separação ao final da síntese.

#### **4.7.2.2 Kryptofix 2.2.2**

Para todas as amostras analisadas verificou-se que a quantidade de kryptofix estava dentro dos limites estabelecidos (<50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **4.7.2.3 Solventes Residuais**

Após a adaptação feita no módulo de síntese para a remoção do etanol, foi possível diminuir a concentração de etanol para 0,57%. Por se tratar de um solvente de classe 3, com baixo potencial de toxicidade em humanos, a quantidade presente na forma farmacêutica final pode ser maior que o estabelecido se existir uma justificativa para tal. Diversos centros produtores de radiofármacos no mundo utilizam 10% como concentração máxima permitida, uma vez que muitos destes radiofármacos são lipofílicos e facilmente se aderem as paredes dos frascos, rolhas de borracha e filtros. Serdons et al. (2004) concluiu que a concentração de etanol na solução final deve ser no máximo 10%, apropriadamente diluído em solução salina 0,9%, quando o volume de injeção do radiofármaco não for superior a 20mL, o que ocorre na grande maioria dos casos (Serdons et al. 2008).

A concentração de acetonitrila para todas as amostras foi abaixo do limite preconizado pela farmacopéia de 0,04%. A figura 24 apresenta o cromatograma de uma das análises realizadas. A concentração de etanol encontrada na amostra foi de 0,57% e para acetonitrila 0,0021%.

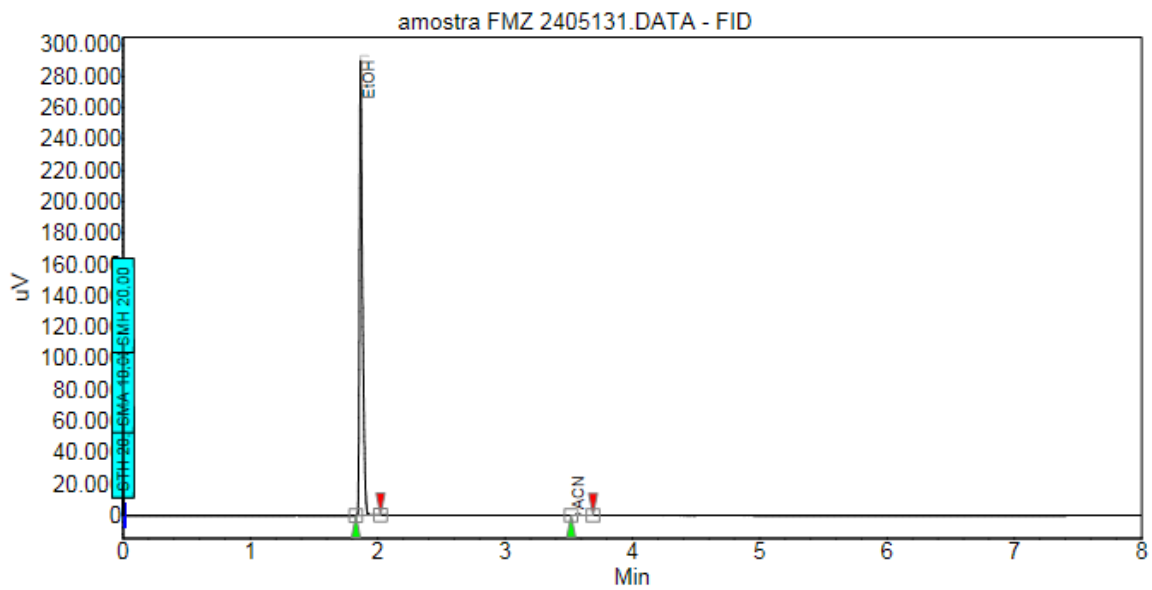


Figura 24. Cromatograma da análise do produto através de CG.

#### 4.7.3 Pureza e Identidade Radionuclídica

Neste trabalho não foi possível analisar de forma quantitativa a presença das impurezas radionuclídicas no produto final, pois o equipamento utilizado possui um detector de Iodeto de Sódio, que não é o mais apropriado para este tipo de análise. Desta forma, é possível dizer apenas que mais de 99,5% das emissões observadas no espectro são provenientes de picos de energia característicos do elemento  $^{18}\text{F}$  (0,511 MeV e 1,022 MeV). A figura 25 mostra o espectro obtido utilizando o espectrômetro de raios gama. No eixo do Y é possível observar o número de contagens e no eixo do X a energia.

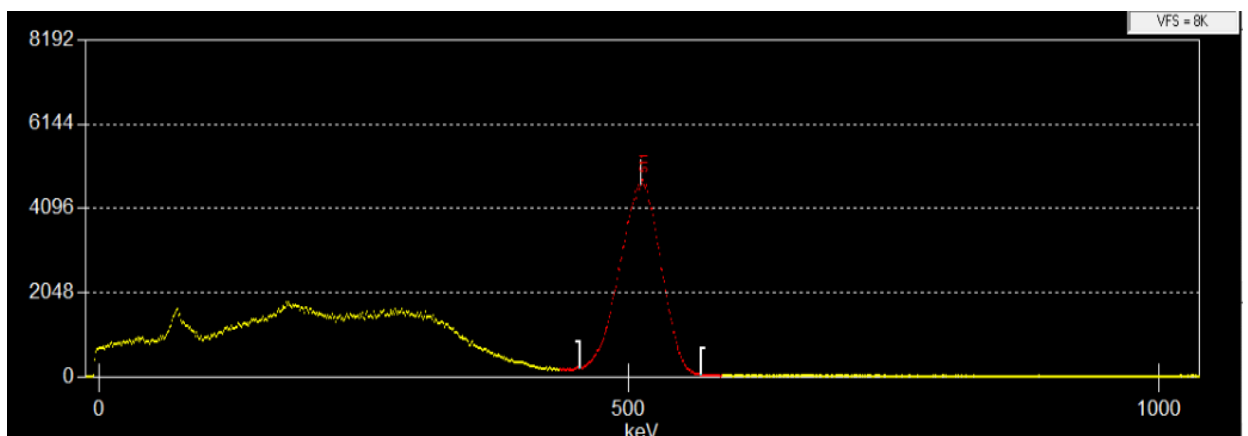


Figura 25. Espectro de energia obtido através do espectrômetro de raios gama.

Como a energia é uma característica comum a todos os emissores de pósitrons, também avaliamos neste trabalho a meia-vida física do radioisótopo. Para cada amostra, foram realizadas três medições da atividade, com intervalo de 10 minutos, utilizando um curiômetro Capintec CRC 25, previamente calibrado. Todos os resultados encontrados estavam dentro do limite preconizado (105 e 115 minutos).

Durante o processo de produção do radioisótopo no ciclotron, vários contaminantes podem ser formados, muitos deles provenientes do porta alvo e da folha de Havar. O porta alvo é a cavidade onde a água enriquecida é colocada para ser bombardeada pelos prótons. Para permitir a entrada destes prótons, a cavidade é coberta por uma folha metálica ultrafina. O material mais utilizado para confeccionar esta folha metálica é chamado de Havar, uma liga metálica que durante longas irradiações pode ocasionar a formação de contaminantes solúveis em água, podendo afetar a reatividade do flúor-18, interferindo na síntese dos Radiofármacos. Já o porta alvo é constituído de nióbio, material de escolha em função das suas propriedades químicas favoráveis.

Diversos trabalhos publicados quantificaram as impurezas radionuclídicas e químicas encontradas na água enriquecida após o bombardeamento. O trabalho realizado por Avila-Rodriguez et. al. (2008) encontrou na água enriquecida após o bombardeamento as seguintes impurezas radionuclídicas:  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{56}\text{Co}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{57}\text{Ni}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{95}\text{Tc}$ ,  $^{96}\text{Tc}$ ,  $^{181}\text{Re}$ ,  $^{93\text{m}}\text{Mo}$ , utilizando porta alvo de nióbio e folha de Havar. Apesar de existir a preocupação com a possível presença destes contaminantes no produto final, ou a interferência no rendimento da síntese, sabe-se que grande parte deles fica retido no cartucho QMA ou é descartado junto com a água proveniente do alvo (Avila-Rodriguez et al. 2008).

#### **4.7.4 pH**

Para todas as amostras o pH, medido através de fitas reativas com escala de 0-14, foi de 5,5.

#### **4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE**

A síntese do radiofármaco para a condução do estudo da estabilidade da marcação, foi realizada com atividade inicial de 74GBq (2Ci) de  $^{18}\text{F}^-$ , justamente para avaliar os possíveis efeitos da radiólise que foram discutidos no item 4.7 deste trabalho.

Como o produto não apresentou degradação 8 horas após a síntese, conclui-se que o mesmo permanece estável durante este período. Entretanto, o aumento significativo da concentração radioativa e da atividade específica, caso atividades mais altas fossem empregadas, pode estimular os efeitos da radiólise. Para o radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]FDG alguns autores sugerem a adição de etanol como estabilizante (Fawdry 2007; Jacobson et al. 2009). A figura 26 mostra o cromatograma obtido com a injeção do radiofármaco 8 horas após a síntese.

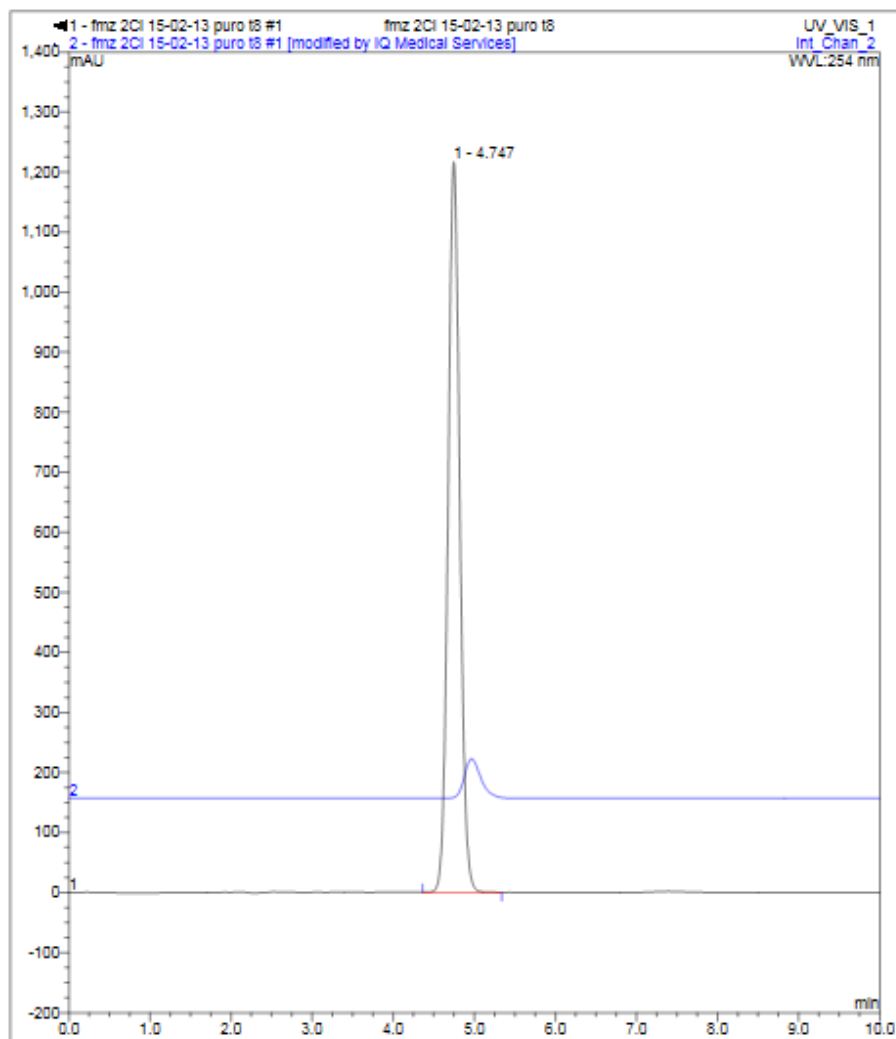


Figura 26. Cromatograma obtido 8 horas após a síntese (CLAE). Nota: linha preta representa o detector de UV e a linha azul o detector de radiação.

## 5 CONCLUSÃO

O procedimento para a produção do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) no módulo de síntese TRACERlab FX<sub>FN</sub> mostrou ser um método viável, viabilizando a produção em grande escala. As condições ideais de marcação foram: temperatura de aquecimento 145°C, tempo de aquecimento 15 minutos, massa do precursor 6,27mg e equivalência molar [ $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2$ ] e o flumazenil, o que resultou em uma taxa de incorporação do fluoreto na molécula de 72±6%. Nas condições descritas anteriormente, e realizando a purificação por CLAE e cartucho de fase reversa  $\text{tC}_{18}$ , foi possível obter um produto com grau de pureza superior a 99%.

A metodologia analítica para o controle de qualidade do flumazenil ( $^{18}\text{F}$ ) foi estabelecida de acordo com os compêndios oficiais, e a estabilidade da marcação foi analisada durante 8 horas. Os resultados obtidos concluem que o produto permanece estável, podendo ser utilizado até 8 horas após a síntese. Este é um importante resultado caso, no futuro, este radiofármaco seja enviado para outros locais do país. Ainda assim, um estudo de estabilidade de 12 horas poderá ser realizado.

Evidentemente que algumas mudanças podem ser feitas para aumentar o rendimento e diminuir o tempo de produção, como por exemplo, utilizar somente a  $\text{tC}_{18}$  como método de purificação. Outro ponto importante e que dificilmente possa ser resolvido utilizando o flumazenil como precursor, é a baixa atividade específica resultante, o que poderá trazer impacto negativo nas imagens com o PET/CT. Para solucionar este problema, a troca do precursor flumazenil por nitromazenil parece ser uma ótima opção. A metodologia aqui estabelecida poderá ser utilizada com mínimas alterações, sendo que a utilização do CLAE para purificação passará a ser indispensável.

A revisão da literatura evidencia que o flumazenil marcado com o radioisótopo  $^{11}\text{C}$  continua sendo o radiotraçador mais utilizado para imagem do receptor  $\text{GABA}_A$ . Entretanto, no Brasil existem poucos locais que dispõem de toda a estrutura necessária para produzir e realizar exames de PET/CT com este radioisótopo, que possui uma meia-vida de 20 minutos. Por isso, utilizando o  $^{18}\text{F}$ , existe a possibilidade

de beneficiar um maior número de pacientes, produzindo o radiofármaco em um local e distribuindo para outros.

Sugestões de continuidade do trabalho:

- Testar a purificação do produto somente utilizando o cartucho tC<sub>18</sub>.
- Verificar a atividade específica do radiofármaco.
- Verificar a biodistribuição do radiofármaco em animais sadios.
- Realizar estudos *in vivo* utilizando MicroPET em animais sadios e epiléticos.
- Estudar uma nova síntese utilizando nitromazenil como precursor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIEA, International Atomic Energy Agency. **Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice** (2008). Viena, Austria: 19; 24; 34.

Andersson, J. D., et al. "PET radioligands targeting the brain GABAA/benzodiazepine receptor complex." **Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals** (2013) 56(3-4): 196-206.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 64, Dispõe sobre o Registro de Radiofármacos** (2009). Brasília.

Avila-Rodriguez, M. A., et al. "A quantitative and comparative study of radionuclidic and chemical impurities in water samples irradiated in a niobium target with Havar vs. niobium-sputtered Havar as entrance foils." **Appl Radiat Isot** (2008) 66(12): 1775-1780.

Bradford, H. F. "Glutamate, GABA and epilepsy." **Prog Neurobiol** (1995) 47(6): 477-511.

Callahan, P. M., et al. "Decrease of GABA-immunoreactive neurons in the amygdala after electrical kindling in the rat." **Brain research** (1991) 555(2): 335-339.

Coenen, H. H., et al. "Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [18F]FDG for use in oncology and neurosciences." **Nuclear medicine and biology** (2010) 37(7): 727-740.

Costa da Costa, Jaderson, et al. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos** (1998). São Paulo, Lemos Editorial.

Debets, R. M., et al. "Is 11C-flumazenil PET superior to 18FDG PET and 123I-iodozepam SPECT in presurgical evaluation of temporal lobe epilepsy?" **J Neurol Neurosurg Psychiatry** (1997) 62(2): 141-150.

Dedeurwaerdere, S., et al. "In-vivo imaging characteristics of two fluorinated flumazenil radiotracers in the rat." **Eur J Nucl Med Mol Imaging** (2009) 36(6): 958-965.

During, M. J., et al. "Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy." **Nature** (1995) 376(6536): 174-177.

Engel, J., Jr. "A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology." **Epilepsia** (2001) 42(6): 796-803.

Europe, Council of. **European Pharmacopoeia** (2008). Strasbourg.

Fawdry, R. M. "Radiolysis of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and the role of reductant stabilisers." **Appl Radiat Isot** (2007) 65(11): 1193-1201.

Fowler, J. S., et al. "Initial and subsequent approach for the synthesis of 18FDG." **Semin Nucl Med** (2002) 32(1): 6-12.



Goethals, I., et al. "Is central benzodiazepine receptor imaging useful for the identification of epileptogenic foci in localization-related epilepsies?" **Eur J Nucl Med Mol Imaging** (2003) 30(2): 325-328.

Grunder, G., et al. "[18F]Fluoroethylflumazenil: a novel tracer for PET imaging of human benzodiazepine receptors." **Eur J Nucl Med** (2001) 28(10): 1463-1470.

Guerreiro, Carlos A. M. **Epilepsia** (2000). São Paulo, Lemos Editorial

Hammers, A., et al. "Grey and white matter flumazenil binding in neocortical epilepsy with normal MRI. A PET study of 44 patients." **Brain** (2003) 126(Pt 6): 1300-1318.

Jacobson, M. S., et al. "Radiolysis of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose ([18F]FDG) and the role of ethanol and radioactive concentration." **Appl Radiat Isot** (2009) 67(6): 990-995.

Johnston, G. A. "GABA(A) receptor channel pharmacology." **Curr Pharm Des** (2005) 11(15): 1867-1885.

Juhasz, C., et al. "Relationship of flumazenil and glucose PET abnormalities to neocortical epilepsy surgery outcome." **Neurology** (2001) 56(12): 1650-1658.

Katzung, Bertran G. **Farmacologia Básica e Clínica** (2007). São Paulo.

Khalil, Magday M. *Basic Sciences Os Nuclear Medicine* (2011).

la Fougere, C., et al. "PET and SPECT in epilepsy: a critical review." **Epilepsy & behavior : E&B** (2009) 15(1): 50-55.

Leitha, T. "Nuclear medicine: proof of principle for targeted drugs in diagnosis and therapy." **Curr Pharm Des** (2009) 15(2): 173-187.

Loscher, W., et al. "Further evidence for abnormal GABAergic circuits in amygdala-kindled rats." **Brain research** (1987) 420(2): 385-390.

Maziere, M., et al. "Synthesis of ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-[11C]methyl-6-oxo-4H-imidazo [1,5-a] [1,4]benzodiazepine-3-carboxylate (RO 15.1788-11C): a specific radioligand for the in vivo study of central benzodiazepine receptors by positron emission tomography." **Int J Appl Radiat Isot** (1984) 35(10): 973-976.

McNamara, J. O. "Cellular and molecular basis of epilepsy." **J Neurosci** (1994) 14(6): 3413-3425.

Miller, P. W., et al. "Synthesis of 11C, 18F, 15O, and 13N radiolabels for positron emission tomography." **Angew Chem Int Ed Engl** (2008) 47(47): 8998-9033.

Moerlein, S. M., et al. "Binding of 5-(2'-[18F]fluoroethyl)flumazenil to central benzodiazepine receptors measured in living baboon by positron emission tomography." **Eur J Pharmacol** (1992) 218(1): 109-115.

Muzik, O., et al. "Intracranial EEG versus flumazenil and glucose PET in children with extratemporal lobe epilepsy." **Neurology** (2000) 54(1): 171-179.

Odano, I., et al. "[18F]flumazenil binding to central benzodiazepine receptor studies by PET--quantitative analysis and comparisons with [11C]flumazenil." **Neuroimage** (2009) 45(3): 891-902.

Olsen, R. W., et al. "International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update." **Pharmacol Rev** (2008) 60(3): 243-260.

Persson, A., et al. "Imaging of [11C]-labelled Ro 15-1788 binding to benzodiazepine receptors in the human brain by positron emission tomography." **J Psychiatr Res** (1985) 19(4): 609-622.

Ribak, C. E. "Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci." **Brain research** (1985) 326(2): 251-260.

Ribak, C. E. "Morphological, biochemical, and immunocytochemical changes of the cortical, GABAergic system in epileptic foci." **Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease** (1983) 61: 109-130.

Rogawski, M. A., et al. "Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds." **Pharmacol Rev** (1990) 42(3): 223-286.

Rosenow, F., et al. "Presurgical evaluation of epilepsy." **Brain** (2001) 124(Pt 9): 1683-1700.

Rougier, A., et al. "[Amino acids in human epileptogenic foci]." **Neuro-Chirurgie** (1986) 32(4): 365-368.

Ryzhikov, N. N., et al. "Preparation of [18F]Flumazenil, a Potential Radioligand for PET Imaging of Central Benzodiazepine Receptors, by Isotope Exchange." **Radiochemistry** (2004) 46(3): 290-294.

Ryzhikov, N. N., et al. "Preparation of highly specific radioactivity [18F]flumazenil and its evaluation in cynomolgus monkey by positron emission tomography." **Nucl Med Biol** (2005) 32(2): 109-116.

Serdons, K., et al. "The presence of ethanol in radiopharmaceutical injections." **J Nucl Med** (2008) 49(12): 2071.

USP, United States Pharmacopeial Convention. **The United States Pharmacopeia 35** (2012). Rockville, MD.

Vallabhajosula, S., et al. "A broad overview of positron emission tomography radiopharmaceuticals and clinical applications: what is new?" **Semin Nucl Med** (2011) 41(4): 246-264.

Vallabhajosula., Shankar. **Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT** (2009). New York, Springer.

Vithlani, M., et al. "The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses." **Physiol Rev** (2011) 91(3): 1009-1022.

Vivash, L., et al. "<sup>18</sup>F-Flumazenil: A gamma-Aminobutyric Acid A-Specific PET Radiotracer for the Localization of Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy." **J Nucl Med** (2013) 54(8): 1270-1277.

Votey, S. R., et al. "Flumazenil: a new benzodiazepine antagonist." **Ann Emerg Med** (1991) 20(2): 181-188.

Yoon, Y. H., et al. "Novel one-pot one-step synthesis of 2'-[(<sup>18</sup>F]fluoroflumazenil (FFMZ) for benzodiazepine receptor imaging." **Nucl Med Biol** (2003) 30(5): 521-527.

## **ANEXOS**

**ANEXO A** – Artigo científico submetido para a revista *Applied Radiation and Isotopes*

Elsevier Editorial System(tm) for Applied Radiation and Isotopes  
Manuscript Draft

Manuscript Number: ARI-D-13-00831

Title: Fully automated radiosynthesis of [18F]flumazenil using an adapted GE TRACERlab FX F-N synthesizer

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Synthesis of Labelled Compounds

Keywords: [18F]flumazenil; GABAA receptor; Nucleophilic [18F]fluorination, Epilepsy

Corresponding Author: Ph.D Jaderson C DaCosta, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Programa de Pós-Graduacao em Medicina e Ciencias da Saúde, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

First Author: Louise Mross Hartmann, MSc

Order of Authors: Louise Mross Hartmann, MSc; Marcos Vinícius F Alba, Bachelor; Alice Viero, Bachelor; Cristina M Moriguchi-Jeckel, PhD; J. A. Osso Jr., PhD; Jaderson C DaCosta, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Recent studies showed that [11C]flumazenil (Ro-151788) is still the most applied radioligand for GABAA receptor. Flumazenil acts as an antagonist and binds to BZD site in GABAA receptors. However, the use of [11C]flumazenil is limited by its short half-life. The aim of this study was to synthesize [18F]flumazenil via classical [18F]fluoride aromatic nucleophilic reaction in a fully automated module, in order to produce this radiopharmaceutical in large scale, allowing regional distribution.

**Fully automated radiosynthesis of [<sup>18</sup>F]flumazenil using an adapted GE  
TRACERlab FX<sub>F-N</sub> synthesizer**

Louise Mross Hartmann<sup>a,b</sup>, Marcos Vinícius Fortes Alba<sup>a</sup>, Alice Viero<sup>c</sup>, Cristina Maria Moriguchi Jeckel<sup>a,c</sup>, João Alberto Osso Júnior<sup>d</sup>, Jaderson Costa DaCosta<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brazil

\*Corresponding author:

- Jaderson Costa da Costa, MD, PhD.

Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6690, Prédio 63, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90.610-000.

Phone/Fax: +55 51 3320 3250

e-mail: [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)

**Abstract**

Recent studies showed that [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil (Ro-151788) is still the most applied radioligand for GABA<sub>A</sub> receptor. Flumazenil acts as an antagonist and binds to BZD site in GABA<sub>A</sub> receptors. However, the use of [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil is limited by its short half-life. The aim of this study was to synthesize [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil via classical [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride aromatic nucleophilic reaction in a fully automated module, in order to produce this radiopharmaceutical in large scale, allowing regional distribution.

*Keywords:* [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil; GABA<sub>A</sub> receptor; Nucleophilic [ $^{18}\text{F}$ ]fluorination, Epilepsy

## 1. Introduction

The use of positron emission tomography (PET) in clinic routine is increasing year after year. Despite the availability of many radiotracers, [ $^{18}\text{F}$ ]fluorodeoxyglucose ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG) is currently the most widely used radiopharmaceutical in PET (Vallabhajosula et al. 2011). Together with oncology, neurology is the main application of PET technology. The activity of the brain is controlled mainly by two opposing synaptic effects: excitation by the more widely distributed excitatory neurotransmitter, glutamic acid, and by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) the most important inhibitory amino acid. The GABA type A receptor is a pentameric structure that acts as a chloride ion channel, and contains binding sites for  $\gamma$ -aminobutyric acid, neurosteroids, barbiturates, and benzodiazepines (BZD). The GABA<sub>A</sub> receptor, also known as central benzodiazepine receptor, is directly and indirectly involved in many disorders of brain function, such as depression, schizophrenia, anxiety disorders, epilepsy, etc (Bradford 1995; Johnston 2005; Vithlani et al. 2011). Development of specific positron emission tomography (PET) radioligands for the GABA<sub>A</sub>/BZD receptor complex has contributed to today's knowledge about its function as well as the role the receptor and GABA neurotransmitter system plays in many diseases.

Recent studies showed that [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil (Ro-151788) is still the most applied radioligand for GABA<sub>A</sub> receptor (Andersson et al. 2013). Flumazenil acts as an antagonist and binds to BZD site in GABA<sub>A</sub> receptors (Votey et al. 1991). However, the use of [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil is limited by its short half-life. Regarding the application of PET using labeled flumazenil in epileptic patients, a recent study with thirty-one individuals with drug resistance temporal lobe epilepsy, investigated the use of this technic to localize the epileptogenic zone, which is the area of the cortex that is indispensable for the generation of epileptic seizures (Rosenow et al. 2001). The



results demonstrated that this radiopharmaceutical has a potential to become a useful clinical tool in the pre-surgical evaluation, providing information complementary to [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, that measures regional glucose metabolism, showing a more restricted region of abnormality (Vivash et al. 2013). The aim of this study was to synthesize [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil via classical [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride aromatic nucleophilic reaction in a fully automated module, according to GMP rules, in order to produce this radiopharmaceutical in large scale, allowing regional distribution.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. General

All chemicals and solvents were purchased from commercial sources in analytical grade and used without further purification. Enriched  $\text{O}_{18}$  water was purchased from CMR (Moscow, Russia). Flumazenil (CAS 78755-81-4) was obtained from Formil Química (Jandira, SP, Brazil). Acetonitrile (SeccoSolv®), dimethylsulfoxide (SeccoSolv®), Kryptofix 2.2.2 (for synthesis), ethanol, potassium carbonate and acetone were supplied by Merck (Porto Alegre, RS, Brazil). Other solvents, phosphoric acid, ethyl acetate and solid iodine were purchased from Labsynth (Diadema, SP, Brazil). QMA Plus Light and  $\text{tC}_{18}$  cartridges were obtained from Waters (Barueri, SP, Brazil).

For the fully automated synthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil, a GE TRACERlab FX  $\text{F-N}$  module was used. Fluorine was produced using a cyclotron PET Trace 16MeV from GE Healthcare (Brain Institute, Porto Alegre, RS, Brazil). The reaction mixture obtained was purified in a semi-preparative HPLC system, which is part of TRACERlab FX  $\text{F-N}$  module, consisting of Sykam S-1122 pump, a Knauer K-2001 UV detector (240nm)

in series with a  $\beta^+$  -flow detector, on a reverse-phase column (Macherey-Nagel Nucleosil C18 250x16 mm). Chemical and radiochemical purity was performed in a Dionex HPLC system equipped with UV/Vis detector ( $\lambda=240\text{nm}$ ) in series with a radiation detector on Agilent Pursuit C18 analytical column (300x3.9mm; 10  $\mu\text{m}$ ). Residual solvents were verified using a Bruker 430-GC equipped with ionization flame detector (FID), Bruker FourFactor Capillary, VF-200ms, 30m x 0.32mm column and gas flow of 2mL/min.

### *2.2. TRACERlab FX<sub>FN</sub> set-up*

First, the module was completely clean with ultrapure water and dried with acetone before each synthesis, according to manufacture instructions. Reagents were prepared according in Table 1.

A diagram of GE TRACERLab FX<sub>FN</sub> is shown on figure 1. An adaptation was made in order to enable ethanol evaporation after tC<sub>18</sub> cartridge elution.

### *2.3. Production of <sup>18</sup>F*

No carrier added [<sup>18</sup>F]fluorine was produced at the PETtrace cyclotron via the <sup>18</sup>O(*p,n*)<sup>18</sup>F nuclear reaction by irradiation of 2.5mL of >98% enriched [<sup>18</sup>O]water with 16MeV protons. Typical beam currents were 20 - 40 $\mu\text{A}$  depending on the desired activity.

### *2.4. Synthesis of [<sup>18</sup>F]flumazenil*

The fully automated [<sup>18</sup>F]flumazenil radiosynthesis was carried out under classic conditions in the prepared, remotely controlled, synthesizer via a specific GE software (figure 1), using an in-house reaction sequence (Miller et al. 2008). [<sup>18</sup>F]fluoride (1.29GBq – 92.5GBq) was delivered from the cyclotron directly in a V-

vial and trapped in the anion-exchange (QMA) cartridge, previously activated with potassium carbonate and water (5mL K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M; 10mL water). [<sup>18</sup>F]fluoride was eluted to the reaction vessel with 1,5 mL of a solution K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>222 (Table 1, vial 1). The eluate, containing the complex [K/K<sub>2</sub>.2.2]<sup>+</sup> 18F<sup>-</sup>, was evaporated to dryness under helium gas flow for 7 minutes at 60°C and for 5 minutes at 120°C. During this step, the solvents (acetonitrile and water) were evaporated through azeotropic distillation, increasing 18F<sup>-</sup> nucleophilicity (Table 1, vial 3). To the dry residue, a flumazenil solution containing 6,27mg (20.68μmol) in 700μL of DMSO was added. The reaction was performed for 15 minutes at 130°C, 145°C and 160°C in the reactor vial.

#### *2.5. Purification and isolation of reaction product*

After cooling to 40°C, 3mL of mobile phase (0.01mol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CN, 70:30) was added for dilution (Table 1, vial 4). Purification was performed using the HPLC system, in a semi-preparative reverse-phase HPLC column [Macherey-Nagel Nucleosil (C18 250x16 mm); flow of 8mL/min; phosphoric acid and acetonitrile as a mobile phase (0.01mol.L<sup>-1</sup>; 70:30 v/v); λ=240nm]. The fraction containing the labeled product was collected between 14 and 16 minutes of run, approximately, through a controlled switch valve system, and diluted with 40mL of water. This solution was then passed through a tC<sub>18</sub> cartridge where the labeled product was trapped and the eluted solution sent to waste. To remove remaining solvents residues, 10mL of water was used to wash the cartridge. After that, [<sup>18</sup>F]flumazenil was eluted with 1mL of ethanol to final product vial. To remove the ethanol, low vacuum and a stream of helium gas were applied in the product vial for approximately 5 minutes. To the dry residue, 10mL of 0,9% saline solution was added to the final formulation. Synthesis time was 85 minutes, including purification steps.

### 2.6. Quality Control

The chemical and radiochemical purity of [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil was performed in a Dionex HPLC system equipped with UV/Vis detector ( $\lambda=240\text{nm}$ ) in series with a radiation detector on Agilent Pursuit C18 column (300x3.9mm; 10 $\mu\text{m}$ ) at a flow rate of 1.3mL/min and phosphoric acid and acetonitrile as a mobile phase (0.01mol.L<sup>-1</sup>; 70:30 v/v). The retention time was 4.8 minutes (figure 2), and the labeled product identity was confirmed by co-injection with flumazenil standard on HPLC.

Residual solvents were verified using a Bruker 430-GC equipped with ionization flame detector (FID), Bruker FourFactor Capillary, VF-200ms, 30m x 0,32mm column and helium flow of 2mL/min.

### 3. Results and Discussion

The evaluation of the reaction temperature is shown in Table 2. Variations in the molar ratio of [ $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2$ ] to flumazenil were found to influence the synthesis. It is seen that nucleophilic radiofluorination performed at 145°C, ensures a reproducibly  $^{18}\text{F}$  incorporation degree (72 $\pm$ 6%), at an equimolar ratio. In the same conditions, flumazenil degradation percentage was 39 $\pm$ 4%. Comparing 145°C and 160°C reaction temperatures at equimolar ratios of [ $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2$ ] to flumazenil, no significant changes were observed on incorporation degree, neither on flumazenil degradation, according to Table 2. When the synthesis was carried out at lower temperatures (130°C), also at equimolar ratios, the  $^{18}\text{F}$  incorporation degree decreased considerably (36.8 $\pm$ 0.3%), despite the fact that degradation levels was nearly the same (39 $\pm$ 3%). According to Ryzhikov et al., an increase of temperature stimulates flumazenil degradation. However, this study showed that temperature increase to a maximum of 160°C causes no flumazenil degradation increment.

Furthermore, there is an improvement of radiochemical yield. Nevertheless, complementary testing should be done in order to confirm this finding.

On the other hand, at higher molar ratios, flumazenil molecule decomposition tends to increase, leading to lower  $^{18}\text{F}$  incorporation. A molar ratio ( $[\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}2.2.2]/\text{flumazenil}$ ) of 6, at  $130^\circ\text{C}$ , completely degraded flumazenil molecule. It is clear in this study, that the molar ratio of potassium cryptate to flumazenil is a critical point to radiolabel this molecule, confirming the results from similar studies (Ryzhikov et al. 2004; Ryzhikov et al. 2005). One possible decomposition pathway is a hydrolysis reaction in the ester group, caused by basicity of the medium. Considering the results presented above, to study the purification steps, the reaction temperature of  $145^\circ\text{C}$  was chosen due to its good  $^{18}\text{F}$  incorporation yield.

Typically,  $^{18}\text{F}$ flumazenil was synthesized with radiochemical and chemical purity higher than 99% and specific activity of  $0.997\text{GBq}/\mu\text{mol}$ . The content of ethanol in the final product was 0.57%, acceptable for radiopharmaceuticals injection when the injection volume is not more than 20mL, and acetonitrile was not found in final product (Serdons et al. 2008). The quality control analysis demonstrated the good quality of the product. Low specific activity results from the impossibility to separate the labeled compound from the unlabeled compound. As this reaction is an isotopic exchange, there are no chemical differences in the molecule after labeling.

A compound that could substitute  $^{18}\text{F}$ flumazenil, is 2'- $^{18}\text{F}$ fluoroflumazenil. The synthesis of this radiopharmaceutical uses as a precursor variations of flumazenil molecule, but it requires previous synthesis steps. Labeling efficiency was 68% and radiochemical purity 98%. However, previous preparation of the precursor makes this

method more expensive and long-lasting (Yoon et al. 2003). Furthermore, in an experiment with rats, studies have demonstrated that [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil is a superior radiotracer to 2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroflumazenil for in-vivo PET imaging of GABA<sub>A</sub>/BZD. It has slower metabolism and leads to lower concentrations of metabolites in the brain, resulting in a substantially better signal-to-noise ratio (Dedeurwaerdere et al. 2009). For this reason, flumazenil labeled with  $^{11}\text{C}$  or  $^{18}\text{F}$  remain the best option.

Considering that [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil represents a better choice in the clinical point of view, another precursor that could replace it in order to improve specific activity, is Nitromazenil (Ro 15-2344). This compound is a good option because of its different physical-chemical characteristics comparing to flumazenil. In this case, a good separation of labeled molecule and its precursor might be achieved.

#### **4. Conclusion**

[ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil was synthesized through [ $^{18}\text{F}$ ]fluorine aromatic nucleophilic reaction with in a fully automated system. Besides the low specific activity generated, the synthesis is reliable and produced activities that are suitable for multi-dose use, and could be easily adapted to GMP rules. Moreover, it's possible to change the precursor and use the same system and the same method with minimal changes to produce no carrier added [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil. This process facilitates the access to this radiopharmaceutical for clinical use.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Jaderson C. DaCosta is a researcher for Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors wish to thank Leonel Azevedo who operate the cyclotron, João Borges e Karina Franz for their assistance in radiologic issues, Mara Lize Zanini and Josiane Spolavori for their technical support and Formil Química (Jandira, SP, Brazil) that has kindly provided flumazenil (RO 15-1788) to us.

## REFERENCES

- Andersson, J. D., et al. "PET radioligands targeting the brain GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor complex." **Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals** (2013) 56(3-4): 196-206.
- Bradford, H. F. "Glutamate, GABA and epilepsy." **Prog Neurobiol** (1995) 47(6): 477-511.
- Dedeurwaerdere, S., et al. "In-vivo imaging characteristics of two fluorinated flumazenil radiotracers in the rat." **Eur J Nucl Med Mol Imaging** (2009) 36(6): 958-965.
- Johnston, G. A. "GABA(A) receptor channel pharmacology." **Curr Pharm Des** (2005) 11(15): 1867-1885.
- Miller, P. W., et al. "Synthesis of <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O, and <sup>13</sup>N radiolabels for positron emission tomography." **Angew Chem Int Ed Engl** (2008) 47(47): 8998-9033.
- Rosenow, F., et al. "Presurgical evaluation of epilepsy." **Brain** (2001) 124(Pt 9): 1683-1700.
- Ryzhikov, N. N., et al. "Preparation of [<sup>18</sup>F]Flumazenil, a Potential Radioligand for PET Imaging of Central Benzodiazepine Receptors, by Isotope Exchange." **Radiochemistry** (2004) 46(3): 290-294.
- Ryzhikov, N. N., et al. "Preparation of highly specific radioactivity [<sup>18</sup>F]flumazenil and its evaluation in cynomolgus monkey by positron emission tomography." **Nucl Med Biol** (2005) 32(2): 109-116.
- Serdons, K., et al. "The presence of ethanol in radiopharmaceutical injections." **J Nucl Med** (2008) 49(12): 2071.
- Vallabhajosula, S., et al. "A broad overview of positron emission tomography radiopharmaceuticals and clinical applications: what is new?" **Semin Nucl Med** (2011) 41(4): 246-264.
- Vithlani, M., et al. "The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses." **Physiol Rev** (2011) 91(3): 1009-1022.
- Vivash, L., et al. "<sup>18</sup>F-Flumazenil: A gamma-Aminobutyric Acid A-Specific PET Radiotracer for the Localization of Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy." **J Nucl Med** (2013) 54(8): 1270-1277.
- Votey, S. R., et al. "Flumazenil: a new benzodiazepine antagonist." **Ann Emerg Med** (1991) 20(2): 181-188.
- Yoon, Y. H., et al. "Novel one-pot one-step synthesis of 2'-[<sup>18</sup>F]fluoroflumazenil (FFMZ) for benzodiazepine receptor imaging." **Nucl Med Biol** (2003) 30(5): 521-527.



## Figures

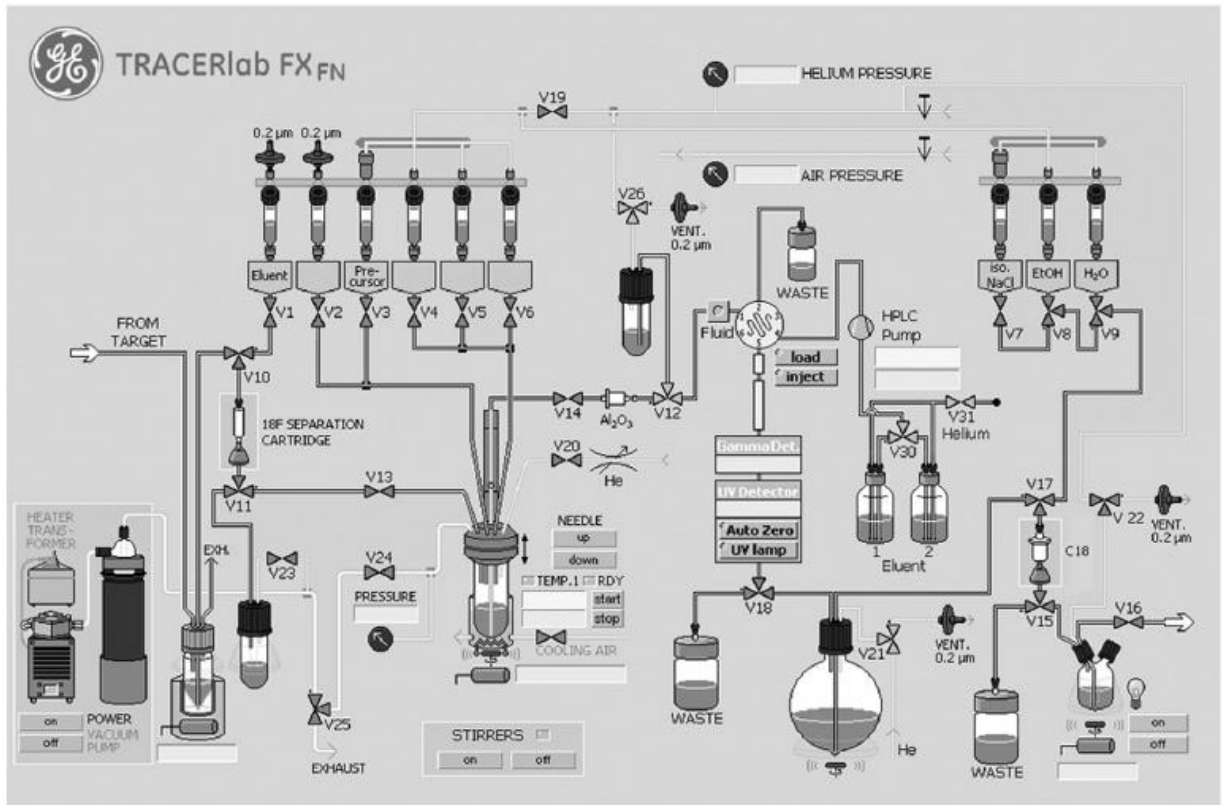
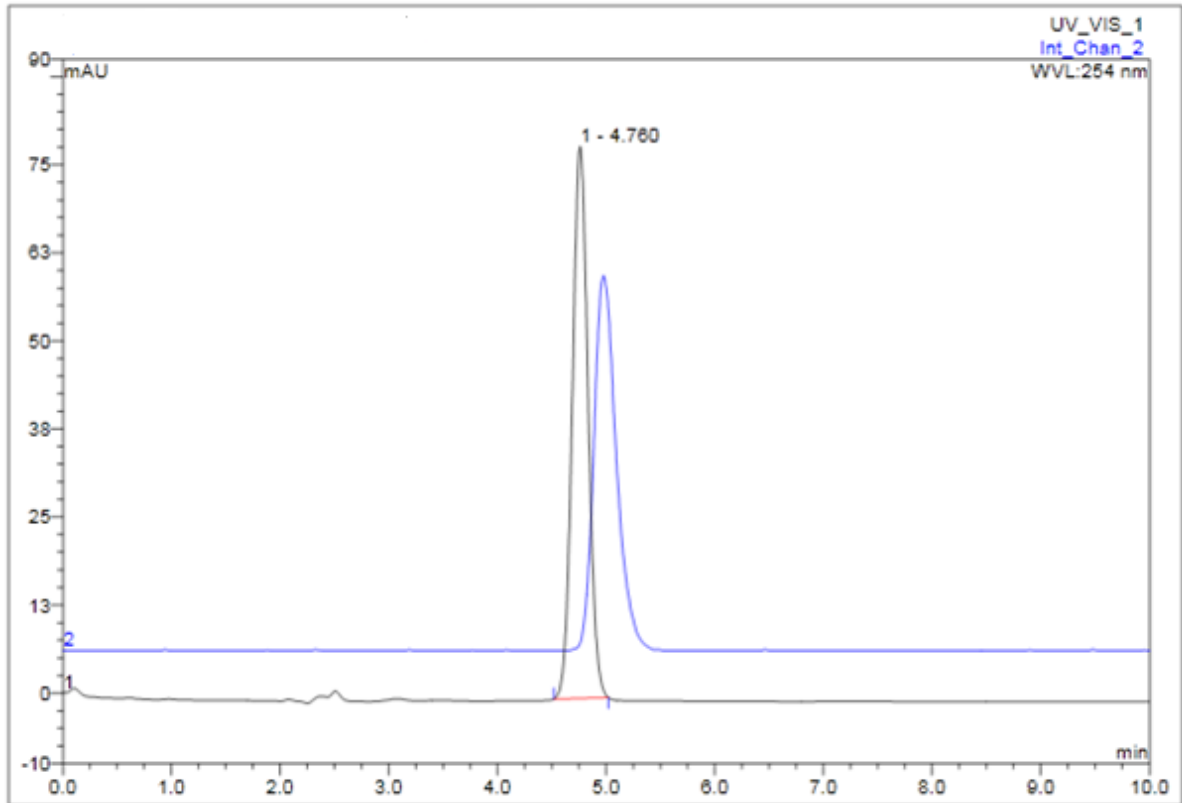


Figure 27. Diagram of GE TRACERlab FX<sub>FN</sub> module.



**Figure 28.** QC analysis of [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil for chemical and radiochemical purity. [ $^{18}\text{F}$ ]Flumazenil retention time was 4,7 minutes. The first peak is the UV chromatogram. As the detectors are in series, the sample passes through the UV detector first. In consequence, the chromatograms are not exactly overlaid.

## Tables

**Table 1.** Reagents preparation to produce [ $^{18}\text{F}$ ]flumazenil using GE TRACERlab FX F-N module.

| Vial or Position   | Reagents or Materials  | Quantities                               |
|--------------------|--|--|
| <b>V10 – V11</b>   | QMA Plus Light Cartridge   | 1  |
| <b>Vial 1</b>      | $\text{K}_{222}$ ; $\text{CH}_3\text{CN}$ ; $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; $\text{H}_2\text{O}$ | 7,7mg; 1mL;<br>1,44mg; 500 $\mu\text{L}$ |
| <b>Vial 3</b>      | FMZ in DMSO  | 6,2mg in 700 $\mu\text{L}$               |
| <b>Vial 4</b>      | $\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,01M; $\text{CH}_3\text{CN}$                                      | 3mL (70:30 v:v)                          |
| <b>Vial 7</b>      | $\text{H}_2\text{O}$   | 10mL                                     |
| <b>Vial 8</b>      | ethanol  | 1mL                                      |
| <b>Vial 10</b>     | Saline solution 0,9%   | 10mL                                     |
| <b>V17 – V15</b>   | t $\text{C}_{18}$ cartridge  | 1  |
| <b>Bulb vessel</b> | $\text{H}_2\text{O}$   | 40mL                                     |

**Table 2.** Results of flumazenil nucleophilic fluorination.

| Series  | Reaction Temperature<br>$^{\circ}\text{C}$ | Degree of $^{18}\text{F}$ incorporation in flumazenil molecule % | Content of non-radioactive by-products % |
|---------|--|--|--|
| 1 (n=2) | 130  | 36.8 $\pm$ 0.3   | 39 $\pm$ 3                               |
| 2 (n=5) | 145  | 72 $\pm$ 6   | 39 $\pm$ 4                               |
| 3 (n=2) | 160  | 70 $\pm$ 3   | 39 $\pm$ 3                               |