

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

MARCOS VINÍCIUS FORTES ALBA

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE SÍNTESE E DOS ENSAIOS DE
CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO [¹¹C]-(R)-PK11195 NO
CENTRO DE PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS DO INSTITUTO DO
CÉREBRO/RS PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT**

Orientadora: Dra. Cristina M. Moriguchi Jeckel

Porto Alegre

2016

MARCOS VINÍCIUS FORTES ALBA

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE SÍNTESE E DOS ENSAIOS DE
CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO [¹¹C]-(R)-PK11195 NO
CENTRO DE PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS DO INSTITUTO DO
CÉREBRO/RS PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Cristina M. Moriguchi Jeckel

Porto Alegre

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A325d Alba, Marcos Vinícius Fortes

Desenvolvimento do processo de síntese e dos ensaios de controle de qualidade do radiofármaco [¹¹C]-(R)-PK11195 no Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro/RS para utilização em PET/CT. / Marcos Vinícius Fortes Alba. – Porto Alegre, 2016.

69f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

Orientadora: Prof. Dr. Cristina M. Moriguchi Jeckel

1. Radiofármacos. 2. [¹¹C]PK11195. 3. Síntese (Química). 4. Controle de Qualidade. 5. PET/CT. 6. PK11195. 7. TSPO. I. Jeckel, Cristina M. Moriguchi. II. Título

CDD 615.842

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

MARCOS VINÍCIUS FORTES ALBA

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE SÍNTESE E DOS ENSAIOS DE
CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO [¹¹C]-(R)-PK11195 NO
CENTRO DE PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS DO INSTITUTO DO
CÉREBRO/RS PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. João Osso Junior - AIEA

Dra. Margareth M. N. Matsuda - IPEN

Dr. Pablo Machado - PUCRS

“A dúvida é o princípio da sabedoria.” (Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico este trabalho à minha avó Suely, que doou boa parte da vida para tornar a dos filhos e netos melhor e hoje engrandece o céu. Obrigado por todo o amor, dedicação, ensinamentos e motivação que continua a despertar. Te amo!

Obrigado aos meus pais, Marco e Rose. Pai, com seus ensinamentos sobre a vida e exemplo de competência e mãe com seus valores e gestos que transcendem o ser humano. Ambos com muito amor. Obrigado por sempre tentar me tornar uma pessoa melhor. Amo vocês.

A toda minha família, mas em especial aos meus irmãos Renan, Bruna, Lorenzo e Vitor por estarem sempre ao meu lado. Mesmo que não saibam, nos piores momentos sempre me dão força para continuar lutando.

A minha orientadora, mentora e amiga Professora Cristina Moriguchi Jeckel todos os agradecimentos possíveis pela sabedoria e paciência transmitida sempre. Sou muito grato por ter esse exemplo de profissional e ser humano ao meu lado todos os dias. Sem você este trabalho não teria sido possível.

A todos os professores que tive até aqui. Cada um contribuiu bastante na minha formação profissional e de caráter.

Ao diretor do InsCer, Dr. Jaderson Costa da Costa, por todo o incentivo sempre prestado e conselhos sábios e precisos ao longo da minha carreira e deste trabalho.

A Josi, Simone, Leonel, João, Adri, Samuel, Gianina e a toda a equipe do InsCer por toda a ajuda e apoio emocional durante o trabalho.

Ao meu grande amigo de longa data, colega e padrinho Tiago Scott por toda a ajuda e dedicação.

A esta pessoa especial, minha melhor amiga e ídolo Louise Hartmann. Obrigado por toda a cumplicidade, ajuda, preocupação, ensinamentos e exemplo de pessoa e profissional que és, na qual sempre irei me espelhar. Mais que isso, obrigado também por me tornar uma pessoa melhor. Sempre serei grato por tudo que fazes por mim. Sem você, nada disso seria possível. Estarei sempre aqui para o que precisar.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que concedem um pouco de sua companhia e atenção para me fazer uma pessoa mais feliz. Obrigado a todos os amigos e amigas que de alguma forma ajudaram para concretização desta conquista.

Um grande abraço a todos.

RESUMO

A medicina nuclear possibilita, dentre outras coisas, a visualização, caracterização e quantificação de processos bioquímicos, metabólicos, biomarcadores e receptores, *in vivo*, através da imagem molecular. Dentre as modalidades de imagem funcional disponíveis nesta área está a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), que depende da administração de um radiofármaco no organismo estudado. Uma das doenças passíveis de estudo através do exame PET é a esclerose múltipla (EM), através do acesso à densidade de receptores TSPO (Proteína Translocadora). O radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 possui alta afinidade e seletividade por estes receptores, aumentados nas células ativadas da micróglia nos casos de EM. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar o processo produtivo (síntese, purificação e controle de qualidade) do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 no Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro do RS (InsCer), possibilitando a realização de exames PET para o estudo da EM. O radioisótopo foi produzido no Cíclotron PETTrace 16 MeV (*GE Healthcare*) na forma de [^{11}C]CO₂ através da reação nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, por meio do bombardeamento com prótons do alvo gasoso contendo N₂ e 0,5 % de O₂. A produção foi realizada no equipamento TRACERlab FX-C pro (*GE Healthcare*) atendendo às exigências de Boas Práticas de Fabricação (BPF). O controle de qualidade do radiofármaco foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade do InsCer e o produto acabado foi submetido às análises de Identidade e Pureza Radionuclídica, Pureza Radioquímica, Atividade Específica, Solventes Residuais, pH, Esterilidade, Integridade da Membrana Filtrante e Teor de Endotoxinas. A síntese foi realizada através da metilação do precursor (*R*)-[*N*-desmetil]PK11195 utilizando o [^{11}C]CH₃I (iodeto de metila marcado com carbono-11) sob as condições ótimas definidas: 400 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), aproximadamente 1 mg de precursor, aproximadamente 10 mg de hidróxido de potássio (KOH), a 40 °C durante 1 minuto. A mistura de reação foi posteriormente neutralizada com ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹ e diluída com fase móvel (acetonitrila 76 % e água Milli-Q 24 %). A mistura diluída foi injetada em sistema CLAE semi-preparativo para purificação. Extração de fase sólida (através de cartuchos SepPak C18 – *Waters*) foi utilizada para remoção do solvente. A eluição e formulação do produto foi realizada com 0,7 mL de etanol e 6,3 mL de solução salina 0,9 % (estéril e livre de pirogênicos). A esterilização foi realizada através de filtração em membrana de poro de 0,22 μm e, assim como o envase, ocorreu em fluxo laminar. As etapas do

processo foram otimizadas e adequadas aos equipamentos e estrutura dos laboratórios. O rendimento radioquímico do processo em relação à atividade de [^{11}C]CH₃I de partida foi de 15,5±2,4 % (7471,5±1283,8 MBq; n=39). Todos os lotes produzidos foram aprovados quanto às especificações definidas e testadas no controle de qualidade, atingindo Pureza Radioquímica maior que 99 % e uma Atividade Específica de 39,7±11,1 GBq/μmol, 10 minutos antes da injeção. Todas as metodologias analíticas foram validadas e atenderam os critérios estabelecidos pela norma vigente. Três lotes consecutivos foram produzidos e aprovados no controle de qualidade e o processo pôde ser considerado validado. O processo desenvolvido se mostrou adequado para produção do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 em doses suficientes para realização de exames em pacientes no InsCer. A produção do radiofármaco marcado com carbono-11 no instituto disponibiliza mais uma ferramenta para melhoria dos serviços de saúde no país e para melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras Chave: [^{11}C]PK11195. PET/CT. PK11195. TSPO. Radiofármacos. Síntese. Controle de Qualidade. Validação.

ABSTRACT

Nuclear Medicine enables, among other things, the visualization, characterization and quantification of biochemical processes, metabolism, biomarkers and receptors in vivo by molecular imaging. One of the methods of functional imaging available in this area is Positron Emission Tomography (PET), which depends on the administration of a radiopharmaceutical in the studied organism. One disease that can be studied by PET scan is multiple sclerosis (MS) through the access to the TSPO (Translocator protein) receptors density. The radiopharmaceutical [^{11}C]-(*R*)-PK11195 has high affinity and selectivity for these receptors, which are increased in activated microglia cells in the case of MS. Therefore, the objective of this study was to develop and to validate the production process (synthesis, purification and quality control) of the radiotracer [^{11}C]-(*R*)-PK11195 in the Radiopharmaceutical Production Center of the Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns), allowing performing PET scans for the study of MS. The radioisotope was produced in the 16 MeV PETrace cyclotron (*GE Healthcare*) as [^{11}C]CO₂ via the nuclear reaction $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ after the bombardment of a gaseous target containing N₂ and 0.5% of O₂ with protons. The production was performed in the equipment TRACERlab FX-C Pro (*GE Healthcare*) to meet the requirements of Good Manufacturing Practices (GMP). The radiopharmaceutical quality control was carried out at the BraIns Quality Control Laboratory and the final product was tested for Identity and Radionuclidic Purity, Radiochemical Purity, Specific Activity, Residual Solvents, pH, Sterility, the Filtration Membrane Integrity and Bacterial Endotoxins. The synthesis was performed through the methylation of the precursor (*R*)-[*N*-desmethyl]PK11195 using [^{11}C]CH₃I (methyl iodide labeled with carbon-11) under the defined optimal conditions: 400 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO), approximately 1 mg of precursor, approximately 10 mg of potassium hydroxide (KOH) at 40 °C for 1 minute. The reaction mixture was then neutralized with 1 mol.L⁻¹ hydrochloric acid and diluted with mobile phase (76% acetonitrile and 24% Milli-Q water). The diluted mixture was injected into a semi-preparative HPLC system for purification. Solid phase extraction (through Sep-Pak C18 cartridges - *Waters*) was used to remove the solvent. Product elution and formulation was conducted with 0.7 mL of ethanol and 6.3 ml of 0.9% saline (sterile and pyrogen free). Sterilization was performed by filtration on a 0.22 μm pore membrane and, as well as the filling process, was carried out under laminar flow. The process steps could be optimized and fitted to the equipments and

laboratories structure. Radiochemical yield of the process in relation to the [^{11}C]CH₃I start activity was $15.5 \pm 2.4 \%$ ($7471.5 \pm 1283.8 \text{ MBq}$; $n = 39$) . All batches were approved according to the specifications defined and tested in the quality control, reaching Radiochemical Purity levels greater than 99% and a Specific Activity of $39.7 \pm 11.1 \text{ GBq / micromol}$, 10 minutes before the injection. All analytical methods were validated and met the requirements established by current regulations. Three consecutive batches were produced and approved by the quality control, so the process could be considered validated. The developed process was suitable for production of adequate doses of the radiopharmaceutical [^{11}C]-(*R*)-PK11195 for clinical use at BraIns. The production of the radiopharmaceutical labeled with carbon-11 at the institute provides an additional tool for improving health services in the country and to improve the life quality of the patients.

Keywords: [^{11}C]PK11195. PET/CT. PK11195. TSPO. Radiopharmaceuticals. Synthesis. Quality Control. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Princípio de formação da imagem PET.	21
Figura 2. Esquema da produção do radiofármaco [¹¹ C]-(<i>R</i>)-PK11195..	28
Figura 3. Representação gráfica do sistema automatizado para síntese de radiofármacos marcados com carbono-11.....	30
Figura 4. Foto do sintetizador TRACERlab FX-C pro.....	31
Figura 5. Reação de síntese do [¹¹ C]-(<i>R</i>)-PK11195 após recebimento do [¹¹ C]CH ₃ I no reator.....	32
Figura 6. Exemplo de cromatograma de processo de purificação bem sucedido. Fase móvel acetonitrila 76 % e água Milli-Q 26 % a 5mL/min. Coluna Nucleosil Macherey Nagel 250X10 mm, 5 μm.....	48
Figura 7. Cromatograma prejudicado pelo dano sofrido pela coluna em virtude do KOH. Fase móvel acetonitrila 76 % e água Milli-Q 26 % a 5mL/min. Coluna Nucleosil Macherey Nagel 250X10 mm, 5 μm.....	49
Figura 8. Exemplo de cromatograma de padrão não radioativo de PK11195.....	57
Figura 9. Curva de calibração para PK11195 (CLAE).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características, dimensões e percentuais médios de retenção das membranas testadas.	51
Tabela 2. Condições ideais para as etapas de produção.	52
Tabela 3. Rendimentos da fase gasosa e do processo de síntese, purificação e formulação do radiofármaco.....	53
Tabela 4. Especificações para o radiofármaco [¹¹ C]-(R)-PK11195.	54
Tabela 5. Resultados com as principais análises de controle de qualidade para 46 lotes produzidos no InsCer.....	55
Tabela 6. Áreas relativas às concentrações de PK11195 para obtenção da curva de calibração.....	58
Tabela 7. Análise da exatidão do método.....	60
Tabela 8. Lotes para Validação do Processo.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	<i>Specific activity</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRAINS	<i>Brain Institute of Rio Grande do Sul</i> (tradução de InsCer)
C.A.	<i>Carrier added</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPR	Centro de Produção de Radiofármacos
CPS	Contagens por segundo
CT	<i>Computed Tomography</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Esclerose Múltipla
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IM	Imagem Molecular
INSCER	Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul
MN	Medicina Nuclear
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBAN	Substância branca aparentemente normal
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1.	Esclerose Múltipla	18
1.2.	Medicina Nuclear	19
1.3.	PET.....	20
1.4.	Produção de Radiofármacos com Carbono-11	22
1.5.	[¹¹ C]-(R)-PK11195 e a Avaliação da Ativação da Micróglia por PET/CT ..	25
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	Objetivo Geral.....	26
2.2.	Objetivos Específicos	26
3.	JUSTIFICATIVA	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	Produção do Radiofármaco	28
4.2.	Programação do Módulo de Síntese.....	29
4.3.	Fase gasosa	29
4.4.	Reação de Metilação	31
4.5.	Purificação.....	32
4.6.	Esterilização e Envase Asséptico	33
4.7.	Controle de Qualidade do [¹¹ C]-(R)-PK11195.....	33
4.7.1.	Identidade e Pureza Radionuclídica	34
4.7.2.	Pureza Radioquímica	35

4.7.3. Atividade Específica	35
4.7.4. Solventes Residuais.....	36
4.7.5. pH.....	37
4.7.6. Esterilidade (Teste de Esterilidade)	37
4.7.7. Integridade da Membrana Filtrante	38
4.7.8. Teor de Endotoxinas.....	39
4.8. Validação da Metodologia para Pureza Radioquímica e Atividade Específica (CLAE).....	39
4.8.1. Intervalo e Linearidade.....	39
4.8.2. Especificidade.....	40
4.8.3. Limite de Quantificação	40
4.8.4. Exatidão	40
4.8.5. Repetibilidade	41
4.8.6. Precisão Intermediária	41
4.8.7. Robustez.....	41
4.9. Validação do Processo	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Programação do Módulo de Síntese.....	43
5.2. Fase Gasosa	43
5.3. Síntese do Radiofármaco.....	47
5.4. Purificação.....	47
5.5. Esterilização e Envase Asséptico	50

5.6. Rendimento	52
5.7. Especificações e Controle de Qualidade	54
5.8. Validação da Metodologia para Pureza Radioquímica e Atividade Específica (CLAE)	57
5.8.1. Intervalo e Linearidade	57
5.8.2. Especificidade.....	59
5.8.3. Limite de Quantificação	60
5.8.4. Exatidão	60
5.8.5. Repetibilidade	60
5.8.6. Precisão intermediária	61
5.8.7. Robustez.....	61
5.9. Validação do Processo Produtivo	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7. BIBLIOGRAFIA	65

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Esclerose Múltipla

Os neurônios e as células gliais são os principais constituintes celulares do sistema nervoso central (SNC). Dentre as células gliais estão os astrócitos, oligodendrócitos e micróglia. A micróglia é constituída de células imunocompetentes e compartilha diversas funções com macrófagos, inclusive a sua habilidade de fagocitose (LULL; BLOCK, 2010).

Assim como os macrófagos, que atuam periféricamente, a micróglia atua como a primeira linha de defesa no SNC. A cada intervalo de tempo, a micróglia em seu estado não ativado revisa o parênquima cerebral com seus prolongamentos (NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Mediante a detecção de sinais de injúria, como o aumento de cálcio extracelular e a liberação de trifosfato de adenosina (ATP) das células vizinhas, os processos microgliais se direcionam ao sítio da lesão (DAVALOS et al., 2005; SIEGER et al., 2012). Ocorre, então, a ativação da micróglia e, dependendo do tipo de sinal detectado pela mesma, podem haver diferentes fenótipos de micróglia reativa (HANISCH; KETTENMANN, 2007).

A micróglia ativada expressa várias citocinas e fatores de crescimento em resposta a injúria neural (NAKAMURA, 2002; PERRY, 2004). Acredita-se que a micróglia ativada possa exercer tanto efeitos citotóxicos quanto protetores no cérebro através de processos complexos diferentes, mas complementares (BANATI et al., 1993). A liberação prolongada de citocinas pro-inflamatórias pela micróglia implica na inflamação crônica e nos danos em longo prazo no SNC de pacientes com esclerose múltipla (EM) (GANDHI; LARONI; WEINER, 2010).

A EM é a doença inflamatória mais comum do SNC, sendo caracterizada por manifestações clínicas e patológicas bastante variáveis (GANDHI; LARONI; WEINER, 2010). Patologicamente, a EM é descrita como áreas multifocais de desmielinização, com perda de oligodendrócitos, cicatrizes astrogliais e lesões axonais. O dano pode ser focal (placas) ou difuso (substância branca aparentemente normal – SBAN), sendo caracterizada por uma combinação de desmielinização, inflamação e neurodegeneração. A doença geralmente inicia com um curso remitente-recorrente em que os pacientes têm crises caracterizadas por disfunções neurológicas focais transitórias, tais como dormência ou fraqueza de um membro, descoordenação, vertigem ou redução na

acuidade visual (MCALPINE, 1973). Estas crises ou recaídas estão relacionadas à inflamação e desmielinização focal do SNC.

O diagnóstico precoce e não invasivo da inflamação focal da substância branca pode ser realizado *in vivo* através de exame de PET (*Positron Emission Tomography* – Tomografia por Emissão de Póstron) com o uso de marcadores de ativação microglial como o radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 (CONVERSE et al., 2011). Este radiofármaco também tem sido utilizado para estudos de outras patologias neuroinflamatórias como derrame, encefalite e vasculite cerebral (GOERRES et al., 2001; RAMSEY et al., 1992).

A imagem de patologias neuroinflamatórias como a EM, obtida na Medicina Nuclear (MN), permite inicialmente identificar e segmentar as lesões focais de substância branca, objetivando quantificar a carga lesional da doença (VERSIJPT et al., 2005).

1.2. Medicina Nuclear

Em 1924, o médico húngaro Hevesy deu origem à MN utilizando isótopos radioativos do chumbo como traçadores em estudos ósseos. Porém, somente com o posterior aparecimento dos elementos radioativos artificiais passou a se ter uma maior quantidade de espécies passíveis de serem usadas como radiotraçadores. A invenção do ciclotron por E. Lawrence, em 1932, tornou possível a produção de isótopos radioativos de diversos elementos (LEITHA, 2009).

O primeiro ciclotron para finalidades médicas foi instalado em 1941, na Washington University em St. Louis, onde eram produzidos isótopos radioativos do fósforo, ferro, arsênio e enxofre. Após a II Guerra Mundial, com o desenvolvimento do processo de fissão nuclear, o uso de radioisótopos na medicina passou a se difundir com mais intensidade e passou a ser chamado de Medicina Nuclear.

Através da MN é possível a obtenção de imagens moleculares e funcionais cujo objetivo é visualizar, caracterizar ou mesmo quantificar, *in vivo*, processos bioquímicos, metabólicos, biomarcadores e receptores a nível celular. Este tipo de abordagem exerce papel fundamental no diagnóstico, na personalização e na otimização de tratamento de algumas doenças e também no desenvolvimento de novos medicamentos. Para isso, há a

necessidade de administração de um radiofármaco no paciente submetido ao exame. (KHALIL, 2011; LEITHA 2009).

Radiofármacos são medicamentos compostos por uma substância de biodistribuição conhecida (carreador), à qual se incorpora um elemento radioativo (radioisótopo ou radionuclídeo), possibilitando sua detecção através dos tecidos. Podem ser de diferentes tipos, de acordo com o seu radioisótopo e são utilizados para diagnóstico ou terapia. Os radioisótopos que compõem os radiofármacos podem ser emissores gama, emissores de pósitron, emissores α e β^- (estes dois últimos utilizados para terapia e os demais para diagnóstico). Ainda, podem se tratar de diferentes elementos químicos como o flúor-18, o carbono-11, dentre outros. (VALLABHAJOSULA, 2009)

Na MN existem duas modalidades diferentes de imagem funcional: o SPECT (*Single Photon Computed Tomography* – Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) e o PET, citado anteriormente. Em ambas, os radiofármacos são necessários, porém, a principal diferença entre elas é o tipo de radioisótopo utilizado no traçador. Enquanto que para SPECT são utilizados radiofármacos marcados com radioisótopos emissores gama, no PET são utilizados os emissores de pósitrons. O princípio é o mesmo para as duas modalidades, representando uma ferramenta não invasiva para avaliação e diagnóstico de doenças (KHALIL 2011; LEITHA 2009).

Além disso, radiofármacos podem ser utilizados com fins terapêuticos, como é o caso do iodo-131, do fósforo-32 e etc. O mecanismo de ação é baseado na capacidade do radioisótopo utilizado de entregar altas doses radioativas ao tecido doente. Com isso, objetiva-se que a energia emitida interaja com as células alteradas, a fim de eliminá-las. Dentre os principais usos terapêuticos para os radiofármacos estão casos de câncer de tireoide, dores ósseas em função de cânceres, câncer de fígado, hipertireoidismo, etc. (SAHA, 2010).

1.3. PET

O PET é a técnica da MN que utiliza radiofármacos emissores de pósitrons para a aquisição das imagens. Radiofármacos emissores de pósitron (ou emissores β^+) são aqueles marcados com um átomo radioativo de decaimento β^+ . Isso significa que o radioisótopo emite um pósitron (também chamado partícula β^+) do seu núcleo instável.

O pósitron é uma partícula de carga positiva e massa equivalente à de um elétron. Ao ser emitida do núcleo, a partícula β^+ choca-se com um elétron na eletrosfera, sofrendo o chamado processo de aniquilação. Na aniquilação de uma partícula β^+ com um elétron, dois fótons de 511 keV são emitidos em sentidos opostos, na mesma direção (180°) (Figura 1). São inúmeros os exemplos de radioisótopos emissores de pósitrons, sendo os mais utilizados o flúor-18 (meia-vida física de 109,8 min), carbono-11 (meia-vida física de 20,4 min), oxigênio-15 (meia-vida física de 2,03 min), nitrogênio-13 (meia-vida física de 9,97 min) e o gálio-68 (meia-vida física de 67,7 min.) (KHALIL, 2011; MILLER et al., 2008).

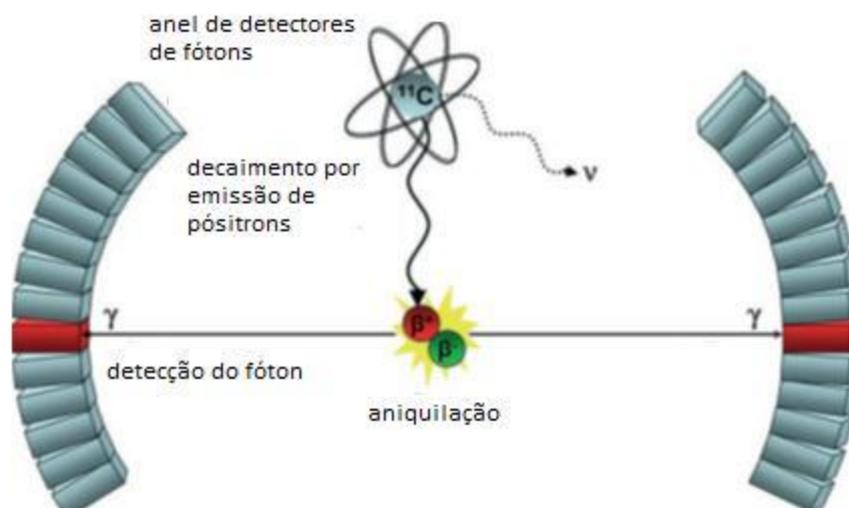


Figura 1.Princípio de formação da imagem PET: dois detectores atuando em conjunto para detectar raios coincidentes provenientes do processo de aniquilação do pósitron. (MILLER et al., 2008).

O equipamento PET consiste em uma série de detectores de cintilação dispostos em forma de anel (circular), pelo qual o paciente, em repouso no suporte (maca), passa após a administração do radiofármaco. Esta configuração é necessária devido ao processo único de emissão de pósitron. Desta forma, dois detectores atuam em conjunto de maneira que possam evidenciar eventos coincidentes (fótons opostos oriundos da mesma aniquilação de um pósitron), diferentemente do SPECT (figura 1). O equipamento ainda permite realização de uma análise quantitativa em relação à distribuição do medicamento nos diferentes órgãos e tecidos do paciente. O pós-processamento dos dados da imagem adquirida é essencial para a confiabilidade e valor diagnóstico do exame. Um grande e importante avanço na tecnologia deste tipo de

equipamento foi a fusão com a Tomografia Computadorizada (*Computed Tomography - CT*) em um único sistema híbrido, em série (PET/CT). Esta combinação permite correlacionar as informações funcionais e metabólicas fornecidas pelo PET com as informações anatômicas do CT, possibilitando que sejam realizadas correções nas imagens de PET, aumentando significativamente o poder diagnóstico do exame (MILLER et al., 2008; SAHA, 2010).

Para o exame PET ou PET/CT são utilizados radiofármacos com radioisótopos de meia-vida física curta ou ultracurta, o que significa que a sua atividade decai pela metade rapidamente. O flúor-18, por exemplo, é o radioisótopo emissor de pósitron bastante utilizado em exames de MN, cuja atividade decai pela metade em 109,8 minutos. Em casos como o do carbono-11 ou oxigênio-15, com meias-vidas físicas de 20,4 minutos e 122 segundos, respectivamente, o centro produtor do radiofármaco deve estar localizado fisicamente junto ao centro de imagem que virá a utilizá-lo. Considerando a necessidade de dispor de atividade radioativa mínima para realização de exames, a distribuição destes radiofármacos (de carbono-11 e oxigênio-15, por exemplo) para lugares distantes torna-se inviável devido ao seu rápido decaimento (KHALIL, 2011).

1.4. Produção de Radiofármacos com Carbono-11

Muitos radioisótopos emissores de pósitron, ou emissores β^+ , utilizados para produção de radiofármacos PET, são produzidos em ciclotron (acelerador de partículas) e são prevalentemente de meia-vida física curta nestes casos. Dentre eles, um dos mais utilizados é o isótopo do carbono de massa 11 (carbono-11). A presença de carbono na maioria das moléculas orgânicas, biomarcadores e ligantes de receptores favorece o seu uso como radioisótopo em um radiofármaco. Isto porque a incorporação do radioisótopo à molécula deve interferir o mínimo possível na sua biodistribuição, não devendo, portanto, representar alterações significativas na composição da molécula original (marcador). O carbono-11 é produzido no ciclotron através de reações nucleares $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. Neste método, em suma, irradia-se o alvo gasoso, nitrogênio-14 (contendo uma pequena quantidade de $\text{O}_2 = \leq 2\%$), com prótons acelerados, produzindo $^{11}\text{C}\text{CO}_2$. Ainda, ao invés do O_2 , pode ser utilizado H_2 , gerando $^{11}\text{C}\text{CH}_4$ (metano). A atividade específica do produto da reação (gás), que significa a razão entre a quantidade do isótopo radioativo e a quantidade equivalente à soma de todos os isótopos ($^{11}\text{C}/^{\text{total}}\text{C}$)

é um ponto crítico, devendo ser elevada (AIEA, 2008).

Os radiofármacos (ou radiotraçadores) marcados com carbono-11 são normalmente produzidos através da metilação de um precursor adequado utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ (iodeto de metila). Em função da radiação e da segurança radiológica, para realizar todo o processo de síntese é necessário um equipamento ou aparato automatizado, controlado por computador. É importante ressaltar que, em se tratando de um medicamento, todo o processo e o equipamento devem atender às normas vigentes de Boas Práticas de Fabricação. O precursor utilizado vai depender da molécula desejada como carreador do radioisótopo. As condições utilizadas na metilação, como a temperatura, o tempo de reação, o meio de reação, etc., podem interferir diretamente na mesma e no seu rendimento (SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007).

São dois os métodos tradicionalmente mais utilizados para obtenção do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ para a metilação e posterior síntese do radiofármaco. Em ambos, o gás recebido do ciclotron precisa ser retido no sintetizador de alguma maneira, através de matrizes adsorventes ou de temperaturas muito baixas, por exemplo. No chamado “método úmido” de produção do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, o $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (dióxido de carbono) recebido do ciclotron é reduzido, em meio líquido, à $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ (metanol) utilizando o hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4), seguido por sua conversão à $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ através da reação com ácido iodídrico (HI). Já através do “método seco” ou “método de fase gasosa”, o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ é obtido de maneira diferente. O mesmo gás $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ é produzido no ciclotron e utilizado na reação. Este é reduzido, ainda em fase gasosa, à $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ sob aquecimento na presença de H_2 através de catálise com níquel, geralmente. Outros catalizadores já foram testados. O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ produzido é então convertido, ainda gasoso, à $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ também sob aquecimento na presença de I_2 . Para aumentar o rendimento da produção de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, a reação normalmente é feita em um sistema de recirculação, onde todo o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ formado é retido e o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ não reagido passa novamente pelo “reator” contendo gás iodo para que possa, então, reagir. O método em fase gasosa apresenta vantagem sobre o método úmido, uma vez que a não utilização do LiAlH_4 proporciona uma atividade específica maior ao radiofármaco e é um processo mais limpo (SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007).

Muitos radiofármacos, porém, são produzidos partindo de reações que não apresentam bons rendimentos para a metilação utilizando o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Nestes casos, é

usual converter o [^{11}C]iodeto de metila à [^{11}C]triflato de metila, um composto mais reativo que o anterior. Isto é feito submetendo o [^{11}C]CH₃I a uma reação com triflato de prata sob aquecimento. O [^{11}C]triflato de metila pode ser produzido e utilizado independente do método, úmido ou de fase gasosa (SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007).

O [^{11}C]CH₃I ou [^{11}C]triflato de metila irá reagir com o precursor para marcação do mesmo (reação de metilação), resultando na obtenção do radiofármaco. O processo pode exigir remoção de grupamentos protetores do precursor, após a substituição nucleofílica, através de hidrólise (SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007).

A purificação do radiofármaco precisa ser realizada de modo a obter-se o mesmo com o grau de pureza e as especificações adequadas para que possa ser utilizado em pacientes ou mesmo em animais (em caso de pesquisa). Para isso, os módulos de síntese normalmente contém um sistema de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) semi-preparativo ou sítios para instalação de colunas contendo resina para extração de fase sólida. A etapa de purificação é um ponto crítico do processo, uma vez que deve ser eficiente e rápida ao mesmo tempo, devido à meia-vida física curta do radioisótopo, além de garantir que o rendimento total do processo não seja prejudicado. Por isso, deve ser estudada e otimizada para cada caso específico (SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007).

Além disso, como a purificação normalmente envolve uma cromatografia de fase reversa, a extração do solvente utilizado na fase móvel é necessária. Para isso, utiliza-se mais uma etapa de purificação e formulação do radiofármaco com colunas de extração de fase sólida (KHALIL, 2011; SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE, 2007; VAN LIER, 2007).

Todas essas particularidades e variáveis intrínsecas à produção de radiofármacos (equipamentos diferentes, condições e matérias-primas diferentes, etapas e técnicas diferentes) fazem com que seja necessário um estudo prévio e o desenvolvimento e adequação do processo produtivo para cada centro produtor, cada tipo de equipamento e cada técnica utilizada (principalmente quando se trata de radiofármaco marcado com carbono-11, de inviável distribuição para outros centros). Isso até mesmo para processos já descritos outrora (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012; SCHUBIGER; LEHMANN;

FRIEBE, 2007; VAN LIER, 2007).

1.5. [¹¹C]-(*R*)-PK11195 e a Avaliação da Ativação da Micróglia por PET/CT

O PK11195 (*1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide*) trata-se de uma isoquinolina que atua como ligante seletivo para receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR). A avaliação da ativação da micróglia por PET/CT pode ser feita através do uso deste composto marcado com carbono-11, o [¹¹C]-(*R*)-PK11195 (DEBRUYNE et al., 2003; VERSIJPT et al., 2005).

O [¹¹C]-(*R*)-PK11195 liga-se ao PBR, recentemente também chamado de Proteína Translocadora - TSPO (18 kDa) (PAPADOPOULOS et al., 2006), cuja expressão encontra-se aumentada na micróglia ativada (BANATI, 2002; BANATI et al., 2000; CAGNIN et al., 2007; DOORDUIN et al., 2009).

Na prática clínica, a realização do PET/CT marcado com [¹¹C]-(*R*)-PK11195 pode ter papel importante para obtenção de imagens cerebrais não invasivas de pacientes com EM, considerando que nestes casos a micróglia está ativada. O PET/CT pode detectar alterações na substância branca aparentemente normal (SBAN), além de ser mais sensível que a captação de contraste na ressonância magnética (RM) durante os surtos característicos da doença. Além disso, já foi estabelecida uma correlação entre a ativação da micróglia e a atrofia cerebral, igualmente presente nos pacientes com EM (VERSIJPT et al., 2005).

Conforme previamente publicado, o [¹¹C]-(*R*)-PK11195 pode ser obtido através da metilação do precursor (*R*)-[*N*-desmetil]PK11195 com [¹¹C]CH₃I (iodeto de metila), na presença de hidróxido de potássio, em dimetilsulfóxido (DMSO). A temperatura e o tempo de reação variam entre as publicações. Outros parâmetros como o meio de reação também podem variar, porém, em todos os casos um rendimento adequado é passível de ser obtido (CAMSONNE et al., 1984; TOMASI et al., 2008; HASHIMOTO et al., 1989).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar o processo produtivo (síntese, purificação e controle de qualidade) do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 no Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro do RS, com base em dados da literatura, adaptando-o aos equipamentos e infraestrutura, a fim de obter o medicamento dentro dos padrões de qualidade exigidos para sua utilização em seres humanos.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Configurar e adequar o equipamento TRACERlab FX-C pro para o uso na produção de radiofármacos de carbono.
- 2.2.2. Configurar e adequar a etapa em fase gasosa para produção de [^{11}C]CH₃I a partir de [^{11}C]CO₂.
- 2.2.3. Adequar as condições de síntese do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 descritas na literatura ao processo realizado no CPR do InsCer.
- 2.2.4. Desenvolver os métodos de purificação do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 para as configurações do equipamento TRACERlab FX-C pro, do CPR do InsCer.
- 2.2.5. Definir e validar os métodos de controle de qualidade do produto acabado e os parâmetros utilizados.
- 2.2.6. Avaliar e otimizar a atividade específica obtida.
- 2.2.7. Avaliar e definir o método de esterilização por membrana filtrante para redução de perdas (tipo de membrana).
- 2.2.8. Avaliar a reprodutibilidade do processo.
- 2.2.9. Otimizar a formulação do radiofármaco para atender a demanda do serviço de MN do InsCer em relação ao volume máximo para injeção do medicamento (370 MBq em no máximo 3 mL).

3. JUSTIFICATIVA

O radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195, um marcador de neuroinflamação, será utilizado em um projeto cujo objetivo é verificar a ativação da micróglia em regiões específicas do SNC. Tendo em vista que as publicações na área fornecem somente aspectos gerais do processo produtivo, e considerando todas as variações intrínsecas da produção de radiofármacos já mencionadas (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012), o desenvolvimento e implantação de um processo produtivo para o [^{11}C]-(*R*)-PK11195 no CPR do InsCer, bem como de toda a metodologia analítica para seu controle de qualidade, se faz necessário. A montagem e configuração da linha produtiva no próprio instituto, ainda assume caráter imprescindível em se tratando de radiofármaco marcado com carbono-11, em função de sua meia-vida física muito curta (20 minutos) e consequente inviabilidade de distribuição por outros centros produtores.

Este radiofármaco é essencial para a realização de um estudo clínico de fase IV, que trata da avaliação de um novo medicamento para tratamento da Esclerose Múltipla. Este estudo foi solicitado por uma indústria farmacêutica internacionalmente reconhecida.

O desenvolvimento das etapas que constituem a produção de um novo radiofármaco, desde a seleção das matérias primas e a adaptação da metodologia original aos equipamentos disponíveis, até a validação dos processos e metodologias, é indispensável para a obtenção de um produto que contemple os requisitos exigidos para a administração em seres humanos com segurança e eficácia. Além disso, a importação e implantação deste tipo de tecnologia (produção de radiofármacos) em uma determinada planta produtiva sempre exige estudo do processo, adequação e otimização.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção do Radiofármaco

A síntese foi realizada no Centro de Produção de Radiofármacos do InsCer, utilizando o módulo de síntese automatizado TRACERlab FX-C pro (GE Healthcare), e com base nas metodologias propostas por Doorduin et al. (2009), Alves (2012), e Shao et al. (2011). O precursor empregado na reação de metilação com [^{11}C]iodeto de metila foi o (*R*)-[N-desmetil]-PK11195 (ABX *advanced biochemical compounds*). O radioisótopo utilizado no processo foi produzido no ciclotron (PETrace 16 MeV, GE) na forma de [^{11}C]CO₂ através da reação nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, por meio do bombardeamento com prótons acelerado de alvo gasoso contendo N₂ e 0,5 % de O₂, sob parâmetros previamente estabelecidos. O equipamento de síntese automatizado foi instalado em uma capela blindada modelo MIP1-2P (Comecer), chamada de *hotcell*. Por ser blindada e possuir filtros de carvão ativado, esta capela protege o operador e o ambiente da radiação. O laboratório onde os equipamentos estavam instalados possui certificação classe ISO 7.

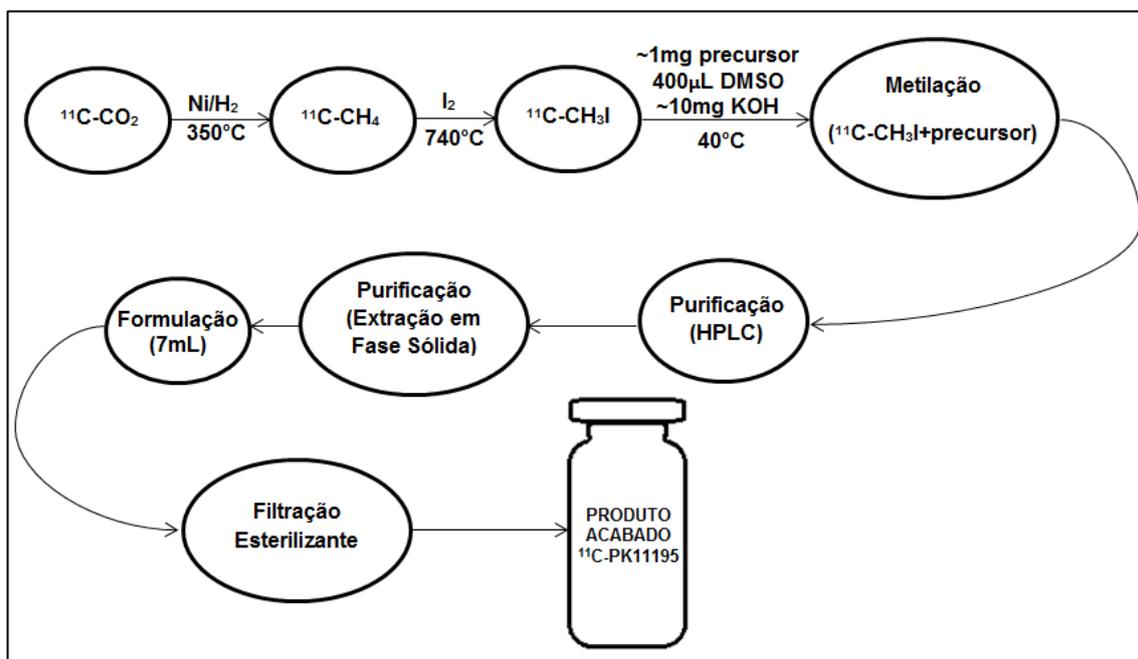


Figura 2. Esquema da produção do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195.

4.2. Programação do Módulo de Síntese

Durante o projeto, a programação do módulo de síntese (o *timelist*) foi elaborada e construída no software de controle do equipamento. Todos os parâmetros (temperaturas, tempo de cada passo, fluxo de gases, quantidades de matéria-prima/reagente, etc.) foram definidos, configurados e avaliados. Além disso, a adequabilidade do processo foi avaliada através da verificação do rendimento absoluto (quantidade absoluta produzida) e do atendimento às especificações de qualidade do produto final obtido. Algumas etapas foram avaliadas individualmente através de testes preliminares. Lotes piloto também foram produzidos a fim de estabelecer às condições do processo. Uma vez determinados os parâmetros, foram produzidos 03 lotes para validação do processo, e 46 lotes para uso na pesquisa clínica (pacientes). Testes preliminares e lotes piloto não foram contabilizados nesta amostra. Ao longo das produções, algumas alterações/adaptações foram necessárias em função do equipamento. O impacto dessas mudanças foi avaliado para verificar a necessidade de revalidação do processo. O tempo total, desde o recebimento da atividade no módulo de síntese até o envase, também foi considerado.

4.3. Fase gasosa

O TRACERlab FX-C pro utiliza o método seco, ou de fase gasosa, para a produção do [^{11}C]iodeto de metila (^{11}C CH₃I) utilizado na marcação do precursor. O equipamento foi montado e preparado (colunas preenchidas) conforme manual de instrução fornecido pelo fabricante. O [^{11}C]CO₂ utilizado foi produzido no ciclotron e a atividade produzida (teórica) foi a mesma para todas as produções.

Na fase gasosa para produção de [^{11}C]CH₃I, o [^{11}C]CO₂ era recebido do ciclotron durante aproximadamente 2 minutos e 45 segundos, e aprisionado em uma coluna preenchida com uma mistura de peneira molecular (4A, 80/100 mesh, Alltech) e catalisador níquel (Shimalite-nickel, 80-100 mesh, Shimadzu). Nesta mesma coluna, o [^{11}C]CO₂ era reduzido a [^{11}C]CH₄ na presença de gás hidrogênio >99,99 % puro (Airliquid) e sob aquecimento a 350 °C. Em seguida, o [^{11}C]CH₄ formado era liberado da peneira molecular sob fluxo de 100 mL/min de hélio >99,99 % puro (Airliquid), e posteriormente retido em outra coluna denominada [^{11}C]CH₄-trap preenchida com Carboxen (60-80 mesh, Sigma Aldrich) e resfriada a -75 °C com nitrogênio líquido.

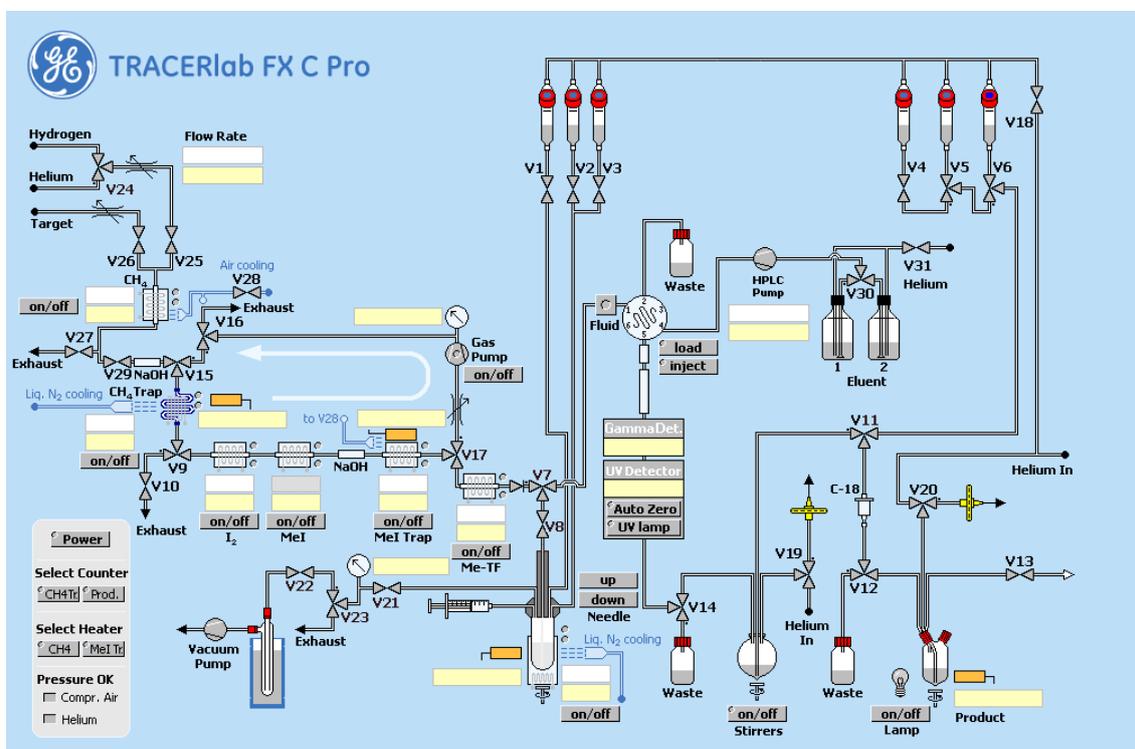


Figura 3. Representação gráfica do sistema automatizado para síntese de radiofármacos marcados com carbono-11 (GEMS, 2003).

Após, este $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$ era submetido a aquecimento até $80\text{ }^\circ\text{C}$ também sob fluxo de gás hélio, e o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ era liberado e transferido para o início do *loop* de produção do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Ali estava localizado o forno contendo o reservatório de iodo (cristais) e preaquecido, ($100\text{ }^\circ\text{C}$) para sublimá-lo e inseri-lo no reator de quartzo. Este reator ficava em linha, logo após o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$, sendo o local onde ocorria a reação entre iodo e $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ para formar o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ (sob aquecimento a $740\text{ }^\circ\text{C}$). Na medida em que era formado o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, o mesmo passava por filtros de hidróxido de sódio, (Ascarite® 8-20 mesh, Sigma-Aldrich) para retenção de eventual CO_2 residual contido no produto e era logo retido e acumulado em outra coluna, contendo Porapak Q (50-80 mesh, Sigma Aldrich; $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I-trap}$). Enquanto isso, o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ que não reagia era recirculado por uma bomba, retornando para o início do *loop*, passando pelo reator de quartzo novamente. A recirculação ocorria durante 5 minutos. Após, através do aquecimento do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I-trap}$ a $190\text{ }^\circ\text{C}$ sob fluxo de hélio de 30 mL/min , o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ era liberado e transferido para o reator principal (onde ocorrerá a síntese do $[^{11}\text{C}]\text{-(R)-PK11195}$ já contendo o precursor ((*R*)-[*N*-desmetil]PK11195) e hidróxido de potássio (KOH) no meio de reação de escolha. Para o recebimento do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, o reator não era resfriado, ou seja, era mantido a temperatura ambiente. A disposição do sistema pode ser melhor visualizada na sua representação gráfica (figura 3) e foto real (figura 4).

Testes preliminares foram realizados individualmente para esta etapa a fim de encontrar as melhores condições. A temperatura e tempos para reação, transferência e/ou retenção do produto de uma etapa (ou coluna) para outra, bem como o fluxo de gás utilizado, foram ajustados e verificados. As configurações de partida foram baseadas no



Figura 4. Foto do sintetizador TRACERlab FX-C pro (GEMS, 2003).

método publicado por Shao et al. (2011) e no próprio manual do equipamento. O acompanhamento do processo para sua avaliação ocorreu visualmente, com ajuda dos detectores de radiação localizados no $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$ (Carboxen), $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I-trap}$ (Porapak Q) e no próprio reator principal. Os detectores foram observados quanto a sua estabilização (platô no incremento da atividade de determinada etapa).

4.4. Reação de Metilação

A reação de metilação do precursor e síntese do $[^{11}\text{C}]$ -(*R*)-PK11195 foi planejada e conduzida com base nos métodos utilizados por Doorduyn et al. (2009) e Alves (2012). Alguns pontos necessitaram ser alterados e readequados no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

Aproximadamente 1mg do precursor (*R*)-[*N*-desmetil]PK11195 foi utilizado em cada síntese, pesado 10 minutos antes do final do bombardeamento, e dissolvido em 400 μL de dimetilsulfóxido (anidro, Sigma Aldrich) diretamente no frasco reator. Além disso, inicialmente 30 mg de KOH (Merck) triturado foram adicionados à solução no

mesmo momento que o precursor, e a mistura obtida foi submetida a agitação por no mínimo 1 minuto. No decorrer do projeto, alterou-se essa quantidade para 10 mg.

O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, recebido lentamente no reator, era dissolvido e “aprisionado” no meio. A solução foi aquecida a $40\text{ }^\circ\text{C}$ e a reação ocorria durante 1 minuto sob agitação. Em seguida, a mistura reacional era neutralizada com $400\text{ }\mu\text{L}$ (para 30 mg de KOH) ou $200\text{ }\mu\text{L}$ (para 10 mg de KOH) de ácido clorídrico $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (HCl), e diluída com $700\text{ }\mu\text{L}$ ou $900\text{ }\mu\text{L}$ da mesma fase móvel utilizada na etapa de purificação por CLAE semipreparativo. O volume final obtido, a ser injetado no sistema de CLAE era de 1,5 mL.

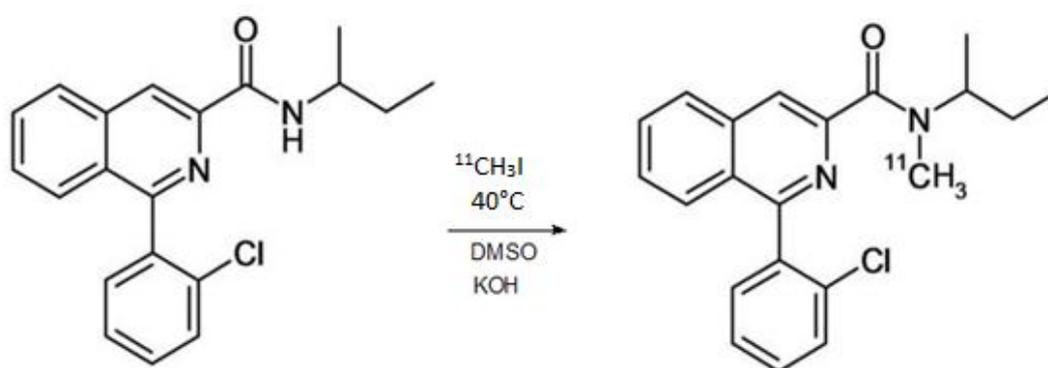


Figura 5. Reação de síntese do $[^{11}\text{C}]$ -(*R*)-PK11195 após recebimento do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ no reator.

4.5. Purificação

A purificação do $[^{11}\text{C}]$ -(*R*)-PK11195 era realizada em duas etapas. Na primeira, através de CLAE semipreparativo, impurezas e subprodutos oriundos da reação eram eliminados. Na segunda, através de extração de fase sólida (SPE) com o auxílio de cartucho C18 (Sep-Pack C18 Plus Light Cartridge, Waters), era retirado o solvente orgânico proveniente da fase móvel da cromatografia.

O módulo de síntese TRACERlab FX-C pro estava equipado com um sistema de CLAE contendo coluna Nucleosil Macherey Nagel 250 X 10 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$, loop do injetor com 1,5 mL. Foram testados vários parâmetros para a cromatografia líquida até que os ideais fossem encontrados. Finalmente, a fase móvel utilizada foi composta por Acetonitrila e Água Milli-Q (76:24, respectivamente) sob fluxo de $5\text{ mL}/\text{min}$. O tempo de retenção do produto observado foi de aproximadamente 7 minutos. O pico (ou fração de interesse) era coletado através de comando manual no software de controle do

equipamento e diluído com água Milli-Q para, posteriormente, ser passado através do cartucho C18. Durante testes preliminares, foram testados 35 mL de água Milli-Q para diluição. Enquanto o produto ficava retido no cartucho de SPE, o solvente oriundo da fase móvel era destinado ao frasco de descarte. Além disso, o mesmo cartucho era lavado com 10 mL de água para injeção para eliminar qualquer resíduo de solvente orgânico. Depois disso, o produto era eluído do cartucho C18 com 700 µL de etanol absoluto (Merck) e coletado no frasco de produto acabado. Após, eram transferidos para o frasco de produto final do sintetizador, através da coluna C18, 6,3 mL de solução salina 0,9 % para diluir o eluato.

4.6. Esterilização e Envase Asséptico

A esterilização e envase foram realizados em outra *hotcell*, com ambiente classificado e certificado grau ISO 5, equipado com o fracionador Timotheo (Comecer). Uma vez coletado no frasco de produto acabado (ainda no equipamento de síntese), o radiofármaco era esterilizado através de filtração por membrana e envasado assepticamente. A membrana esterilizante apresenta porosidade de 0,22 µm, e o frasco utilizado para o envase era estéril e livre de pirógenos.

Diferentes membranas filtrantes foram testadas previamente a validação: filtro Millex-GV com membrana PVDF, 32 mm de diâmetro, Merck Millipore; filtro Millex-GS com membrana PTFE, 25 mm de diâmetro, Merck Millipore; filtro Millex-GV com membrana PVDF, 13 mm de diâmetro, Merck Millipore.

Foi realizado *media fill* para validação do envase asséptico, porém, a metodologia e resultados não serão abordados. Também foi realizado o teste do *bioburden* ou carga microbiana pré-filtração.

4.7. Controle de Qualidade do [¹¹C]-(*R*)-PK11195

As metodologias utilizadas nas análises do controle de qualidade do radiofármaco foram desenvolvidas no próprio Laboratório de Controle de Qualidade do CPR do InsCer. Além disso, todas as metodologias foram validadas e seus parâmetros avaliados de acordo com as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). As análises realizadas foram estabelecidas com base nas monografias de outros radiofármacos semelhantes e na literatura, bem como os métodos escolhidos

para realizá-las, uma vez que o [¹¹C]-(R)-PK11195 não possui monografia na farmacopeia brasileira e nos compêndios oficiais reconhecidos por ela. Todos os métodos foram adaptados a infraestrutura disponível no InsCer e ao [¹¹C]-(R)-PK11195. Os parâmetros de qualidade e critérios para aprovação para os lotes do medicamento foram definidos neste trabalho. Para tal, tomou-se como base a Farmacopeia Brasileira 5^a Edição (FARMACOPEIA, 2010) e/ou compêndio oficial por ela reconhecido, literatura publicada e as necessidades do estudo clínico.

Foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros para determinar a qualidade do produto acabado:

4.7.1. Identidade e Pureza Radionuclídica

O radiofármaco [¹¹C]-(R)-PK11195 foi analisado quanto a sua identidade e pureza radionuclídica. Esta análise foi feita no intuito de garantir que o radioisótopo presente no radiofármaco seja o desejado, e que não haja contaminação por outros radioisótopos acima do percentual permitido.

A pureza radionuclídica era realizada através do espectro de energia de emissão do radioisótopo (contido no radiofármaco) obtido através de um analisador multicanal. No espectro obtido, a energia de emissão do produto devia ser correspondente a energia dos emissores de pósitrons, atendendo a um percentual mínimo dentre todas as energias verificadas (≥ 95 % das emissões em 511 keV e/ou 1022 keV – emissores de pósitrons).

A identidade radionuclídica era determinada através da verificação do tempo de meia-vida física do radioisótopo presente no radiofármaco. Para isso, foi utilizado um ativímetro, e a atividade radioativa de determinada quantidade do produto foi medida em dois momentos. Através da variação da atividade (A) em dada variação de tempo (t), a meia-vida física ($t_{1/2}$) pôde ser inferida através da fórmula:

$$t_{1/2} = \frac{t-t_0}{\ln A_0 - \ln A} \cdot \ln 2 \quad (1)$$

O critério de aceitação fixados foram de 19,9 a 20,9 minutos (USP, 2015).

As metodologias para estes parâmetros encontram-se nos capítulos gerais da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010) e da Farmacopeia Americana (USP, 2015). Ainda, as duas metodologias trabalham com o princípio de medição de

parâmetros da radiação emitida pelo radioisótopo, possuindo sólida base teórica. Portanto, a adequabilidade dos métodos já fica comprovada estando os equipamentos utilizados devidamente qualificados, como era o caso dos equipamentos do InsCer utilizados neste trabalho. Desta forma, estes métodos analíticos não necessitaram de validação.

4.7.2. Pureza Radioquímica

A pureza radioquímica trata-se da quantidade de radiação presente no produto acabado na forma química desejada ($[^{14}\text{C}]$ -(R)-PK11195) em relação a atividade total. Foi analisada através de CLAE com detecção de radiação acoplada (em serie). O cromatograma obtido através do detector UV/Vis era utilizado para identificação dos picos radioativos do cromatograma obtido com o detector de radiação, principalmente o pico referente ao $[^{14}\text{C}]$ -(R)-PK11195. A área relativa do pico radioativo referente ao $[^{14}\text{C}]$ -(R)-PK11195 era utilizada para inferir o grau (%) de pureza radioquímica. A pureza radioquímica do $[^{14}\text{C}]$ -(R)-PK11195 precisou atender o percentual mínimo de 90 % da área total de todos os picos do cromatograma para o atendimento deste parâmetro.

A análise era realizada através de CLAE de fase reversa. Foi utilizado cromatógrafo Dionex ICS 5000 equipado com uma coluna Agilent Pursuit C18 (300 mm x 3,9 mm, 10 μm), detector UV/VIS e detector de radiação gama (NaI) acoplado, além de injetor manual. Como fase móvel utilizou-se acetonitrila e água (70:30, respectivamente) sob fluxo de 2,5 mL/min. O volume de injeção utilizado de 25 μL e o comprimento de onda para detecção no UV foi de 254 nm. O forno da coluna permaneceu a 20 $^{\circ}\text{C}$ (± 1 $^{\circ}\text{C}$) durante as análises.. A metodologia foi desenvolvida e validada neste trabalho. A validação foi realizada conforme descrito em **4.8. Validação da Metodologia para Pureza Radioquímica e Atividade Específica (CLAE)**.

4.7.3. Atividade Específica

A atividade específica consiste na razão entre a atividade radioativa referente ao radioisótopo do radiofármaco (em Curie ou Bequerel) e a quantidade total do elemento (em mol). Ou seja, no caso do $[^{14}\text{C}]$ -(R)-PK11195 é a atividade radioativa (referente ao C 11) por mol da molécula, radioativa e/ou não (1 átomo de carbono ligado ao grupamento amino por molécula).

Era verificada através de calibração de ponto único, ou seja, comparação direta com a área do pico obtida na análise de solução do padrão não radioativo (R)-PK11195 (ABX, *Advanced Biochemical Compounds*) de concentração conhecida, utilizando a mesma metodologia da análise da Pureza Radioquímica. Para isso, sempre previamente a análise da amostra, eram realizadas análises em duplicata da solução padrão, em concentração aproximada de 5,0 µg/mL. Com isso, o total de moléculas (radioativas + não radioativas) pôde ser quantificado (mol/mL). A atividade radioativa de 0,1 mL do produto também foi mensurada, sendo possível determinar a concentração radioativa (Curie/mL ou Bequerel/mL) e, conseqüentemente, a atividade por mol. A fórmula utilizada para o cálculo da atividade específica é:

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\left(\frac{CR \times \% \text{pureza radioquímica}}{100} \right)}{\left(\frac{CM}{352,856} \right)} \quad (2)$$

Onde:

C_R: Concentração radioativa (MBq/mL ou GBq/mL)

C_M: Concentração (µg/mL)

A atividade específica do produto ([¹¹C]-(R)-PK11195) devia ser maior ou igual à 12 GBq/µmol 10 minutos antes da injeção.

Conforme supracitado, a metodologia foi desenvolvida durante este trabalho e validada de acordo com o descrito em **4.8. Validação da Metodologia Analítica para Pureza Radioquímica e Atividade Especifica (CLAE)**.

4.7.4. Solventes Residuais

Os solventes residuais foram testados para o produto acabado de acordo com o processo de produção. Dentre os principais solventes testados estavam a acetonitrila e o etanol, utilizados na formulação. Além disso, solventes utilizados como meio de reação também devem ser testados, apesar de geralmente serem eliminados durante a CLAE. Com isso, todos os solventes testados foram etanol, acetonitrila e DMSO.

A análise era realizada em equipamento Bruker 430-GC, equipado com detector FID e coluna Bruker FourFactor Capillary VF-200ms, 30 m x 0,32 mm, sob fluxo de hélio de 2 mL/min. Foi utilizada a seguinte rampa de temperatura no forno da coluna:

temperatura inicial de 50 °C durante 2,7 minutos; elevação para 180 °C a uma taxa de 60 °C/min. e permanência a 180 °C por 1,10 minutos; por fim, elevação até 200 °C e permanência por 0,5 minutos. A injeção foi realizada com taxa split de 20, com injetor sob temperatura de 150 °C. A temperatura do detector utilizada foi de 200 °C, o fluxo de hélio (*make-up*) de 28 mL/min., o de hidrogênio 30 mL/min. e o de ar sintético 300 mL/min. Os limites para solventes residuais deviam atender os limites estabelecidos pelos métodos gerais da Farmacopeia Americana (USP, 2015), compendio oficial reconhecido pela Farmacopeia Brasileira. Foram de no máximo 10 % para etanol, 0,04 % para acetonitrila e 0,5 % para DMSO. Apesar do limite máximo de 0,5 % estipulado pelo compendio para solventes de classe 3, como o etanol, o próprio texto dos métodos gerais abre a possibilidade destes solventes serem aprovados mesmo com especificações que excedam este limite (em níveis realísticos em relação ao processo produtivo). Neste caso o solvente deve ser identificado e quantificado (USP, 2015).

A metodologia foi desenvolvida e validada no CPR do InsCer. Porém, a validação desta metodologia não será discutida neste trabalho.

4.7.5. pH

O pH era medido através de papel indicador de pH. Duas fitas foram utilizadas, uma na faixa de medição de 5-10 e outra na faixa de 4-7. O valor de pH devia estar entre 4,5 e 7,5. Esta metodologia já é bem estabelecida e não necessitou validação.

4.7.6. Esterilidade (Teste de Esterilidade)

A esterilidade do produto foi verificada conforme descrito no Capítulo Geral da Farmacopeia Brasileira, 5^a Edição (FARMACOPEIA, 2010): método de inoculação direta em meio de cultura (mesma metodologia descrita na Farmacopeia Americana). A análise era realizada através de inoculação direta do produto em meio de cultura líquido e incubação por 14 dias, conforme segue:

- Caldo Tioglicolato com indicador resarzurina (tubo de 9 mL de meio): 30 – 35 °C;
- Caldo Caseína-Soja (TSB – tubo de 9 mL de meio): 20 – 25 °C.

O volume de amostra inoculado era de 100 µL. Além disso, o mesmo volume de solução salina 0,9 % (veículo) era inoculado em tubo separado de cada meio de cultura

para servir de controle negativo. Todo lote de meio de cultura foi submetido à análise de capacidade de promoção de crescimento e esterilidade previamente a seu uso. A análise era feita em caráter retrospectivo, uma vez que não há tempo hábil para verificar o resultado antes da utilização do produto devido à sua meia-vida (o que é previsto em ambas as farmacopeias citadas). Para aprovação do lote em tempo hábil, estimou-se a esterilidade através da verificação da integridade da membrana (teste de ponto de bolha). Portanto, o teste de esterilidade era iniciado somente após a liberação do lote (porém até 30 horas depois do horário do final da produção).

Para o produto ser considerado estéril os meios inoculados com o mesmo e os controles negativos não deviam apresentar sinais de crescimento microbiano. Em se tratando de medicamento injetável, como especificação, os lotes do produto deviam ser estéreis.

Esta metodologia também foi validada no CPR, conforme diretrizes da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010) e Farmacopeia Americana (USP, 2015). Os procedimentos de validação desta metodologia também não irão ser discutidos neste trabalho.

4.7.7. Integridade da Membrana Filtrante

A integridade da membrana filtrante era verificada através do teste de ponto de bolha, constante no Capítulo Geral da Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição. Consiste em aplicar uma pressão sobre a membrana filtrante, previamente carregada com solução salina 0,9 % (passando 3 mL pelo filtro), até que seja possível deslocar o líquido dos poros da mesma. Como a membrana era instalada dentro de um suporte plástico e uma agulha era utilizada na extremidade de saída do líquido, este deslocamento foi verificado através da formação de bolhas na saída do aparato. Isso foi possível uma vez que o teste era realizado com a agulha imersa em água. A pressão necessária para deslocar o líquido dos poros devia ser maior ou igual à especificada pelo fabricante da membrana, garantindo que os poros estavam íntegros. Desta forma, era possível inferir que a membrana foi eficiente ao esterilizar o produto. A membrana devia ser considerada íntegra ao final da produção e envase para que o lote fosse aprovado.

4.7.8. Teor de Endotoxinas

O teor de endotoxinas foi verificado através do equipamento Endosafe PTS (Charles River). Trata-se de dispositivo que realizava a análise de LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) de maneira automatizada. O equipamento utilizava cartuchos previamente preparados e calibrados contendo quatro poços para aplicação de amostra. Dois deles marcados com quantidade conhecida de padrão de endotoxinas e o reagente LAL e os outros dois somente como reagente LAL. Eram aplicados 25 μL de amostra em cada poço do cartucho para a análise realizada pelo equipamento. A amostra era bombeada pela cânula ligada a cada poço, encontrando o reagente e o padrão de endotoxina (nos poços “marcados”). O teor de endotoxinas era inferido através do método cinético de análise da reação com o reagente LAL. Esta metodologia também está de acordo com os requisitos das farmacopeias Brasileira e Americana

O teor de endotoxinas devia ser inferior a 25 UE/mL para o produto acabado. Esta metodologia também foi validada no CPR do InsCer, porém o procedimento de validação não fará parte deste trabalho.

4.8. Validação da Metodologia para Pureza Radioquímica e Atividade Específica (CLAE)

A análise da Pureza Radioquímica e da Atividade Específica do produto acabado se deu conforme previamente descrito em **4.7.2. Pureza Radioquímica**. A validação foi planejada e executada conforme diretrizes da RE 899/2003 da ANVISA (ANVISA, 2003). Os parâmetros Linearidade, Intervalo, Especificidade, Limite de Quantificação, Exatidão, Robustez, Repetibilidade e Precisão Intermediária foram testados conforme segue abaixo.

4.8.1. Intervalo e Linearidade

Para análise do intervalo e linearidade uma curva de calibração de cinco pontos de concentração foi construída em triplicata. Foi injetado e analisado padrão não radioativo de (R)-PK11195 no seguinte intervalo de concentrações: 1,1 $\mu\text{g/mL}$, 2,7 $\mu\text{g/mL}$, 5,3 $\mu\text{g/mL}$, 6,6 $\mu\text{g/mL}$ e 11,1 $\mu\text{g/mL}$. Após, a média das áreas de cada ponto foi utilizada para compor a equação da reta da curva obtida. O coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (r) foram analisados para verificar se a curva é linear.

O R^2 e o r devem ser maiores que 0,99 para o atendimento do parâmetro. O intervalo linear é definido do ponto menos concentrado até o mais concentrado, enquanto a linearidade é observada.

4.8.2. Especificidade

O equipamento utilizado não é equipado com detector de arranjo de fotodiodo, inviabilizando a análise da pureza de pico através do software do equipamento. Portanto, para análise da especificidade foi injetado e analisado o padrão não radioativo do (*R*)-PK11195 em solução preparada com a matriz do medicamento (placebo) e contaminada com a principal impureza em potencial do produto: o precursor do radiofármaco. Após, foi analisada somente a matriz do medicamento, (solução salina 0,9 %:etanol, 90:10), em uma corrida cromatográfica separada. Foi observado se houve presença de pico referente ao padrão de (*R*)-PK11195 no seu tempo de retenção (TR) característico na corrida do padrão e ausência de pico qualquer neste mesmo TR ($\pm 0,2$ minutos) na corrida da matriz. Além disso, na corrida contendo impureza (precursor) e padrão, a resolução entre os dois picos foi analisada e deve ser maior que 1. Ainda, o resultado de concentração obtido através do método para o padrão na presença da impureza foi avaliado quanto a recuperação em relação à sua concentração teórica. A recuperação deve atender as especificações de exatidão.

4.8.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi verificado através do método baseado na identificação visual do mesmo. Trata-se de estipular o ponto de menor concentração da curva como sendo o limite de quantificação, desde que a curva se mostre linear para o intervalo analisado.

4.8.4. Exatidão

Para análise da exatidão do método foram preparados, injetados e analisados no equipamento soluções de concentração conhecida do padrão não radioativo de (*R*)-PK11195 em placebo (etanol 10 % em solução salina 0,9 %). Uma faixa de concentração baixa, uma média e uma alta foram utilizadas. As concentrações das soluções preparadas foram 1,10 $\mu\text{g/mL}$, 2,66 $\mu\text{g/mL}$ e 10,60 $\mu\text{g/mL}$. Cada solução foi injetada em triplicata. Após, os cromatogramas foram analisados conforme a curva de

calibração construída durante análise da linearidade e o percentual de recuperação em relação a concentração teórica de cada ponto foi analisado conforme a fórmula:

$$Rec. \% = \frac{Conc. Prática}{(Conc. Teórica \times 100)} \quad (3)$$

Onde:

- “Rec.%” é o Percentual de Recuperação;
- “Conc. Prática” é a média das concentrações verificadas nos cromatogramas de cada ponto;
- “Conc. Teórica” é a concentração teórica calculada para cada ponto).

As recuperações devem estar entre 75 % e 120 % para as concentrações de 1,10 µg/mL e 2,66 µg/mL e em entre 80 % e 115 % para a concentração de 10,6 µg/mL para o atendimento do parâmetro.

4.8.5. Repetibilidade

A repetibilidade foi analisada através de seis injeções da mesma solução padrão em uma faixa de concentração média. Uma solução do padrão de (*R*)-PK11195 em fase móvel, na concentração de 2,66 µg/mL e outra na concentração de 5,55 µg/mL foi utilizada. O desvio padrão relativo (CV) entre os resultados das injeções deve ser inferior a 5 % para atendimento do parâmetro.

4.8.6. Precisão Intermediária

Foi realizado o mesmo procedimento para análise da repetibilidade, porém, por outro operador e em data diferente. O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) entre os resultados das injeções deve ser inferior a 5 % para atendimento do parâmetro.

4.8.7. Robustez

A robustez foi analisada realizando pequenas alterações no método e injetando solução padrão de (*R*)-PK11195 para observar se o método continua adequado ainda assim. O fluxo foi alterado para 2,6 ml/min. e três injeções do padrão 2,66 µg/mL foram

realizadas. Após, três corridas com o mesmo padrão, porém com fase móvel alterada (acetonitrila 74 % e água Milli-Q 26 %) foram realizadas. O método deve se manter dentro das especificações para os parâmetros analisados. O percentual de recuperação do padrão em relação a sua concentração teórica deve se manter, bem como o seu tempo de retenção característico.

4.9. Validação do Processo

Após definidas as condições da síntese e purificação do medicamento [^{11}C]-(*R*)-PK11195, três lotes foram produzidos e os parâmetros de qualidade foram testados através das metodologias analíticas já validadas. O produto dos três lotes deve atender as especificações definidas para cada parâmetro para o processo ser considerado validado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Programação do Módulo de Síntese

Com base nos dados da literatura e nas condições de trabalho no InsCer, foi possível construir, inicialmente, os *timelists* adequados contendo a programação do equipamento para o início dos testes preliminares com a produção do [^{11}C]-(*R*)-PK11195. Uma programação com três *timelists*, que iniciam automaticamente um após o outro, foi criada. A programação ou método incluiu todas as etapas (fase gasosa, síntese, purificação e formulação) e se mostrou adequada para início dos ensaios. Ao longo dos testes, alguns pontos foram alterados, porém, a estrutura base dos *timelists* foi mantida. A construção da programação ou método, contendo os *timelists*, é etapa importante no processo, pois aqui estão contidas todas as informações que o equipamento irá receber para executar o passo-a-passo. Uma simples linha fora de contexto ou com problema pode comprometer uma ou mais produções de lote.

5.2. Fase Gasosa

As configurações definidas para a etapa em fase gasosa da produção se mostraram capazes de produzir [^{11}C]CH₃I em quantidades apropriadas. A literatura apresenta diferentes configurações e diverge a respeito de quais são melhores para este tipo método de produção de [^{11}C]CH₃I (KNIESS; RODE; WUEST, 2008; LARSEN et al., 1997; VAN LIER, 2007; SHAO et. al., 2011). Devido a isso, foi necessária uma análise crítica dos dados e das características do processo produtivo do CPR do InsCer para realizar a adaptação das mesmas. Partindo de aproximadamente 185000 MBq (5000 mCi) foi possível produzir uma atividade média de $48153,1 \pm 2941,3$ MBq ($1301,4 \pm 79,5$ mCi) de [^{11}C]CH₃I (n=46), o suficiente para obtenção de quantidade apropriada do produto acabado ao final do processo (SHAO et al, 2011), conforme resultados a serem demonstrados. Considerando a atividade teórica de partida (atividade de [^{11}C]CO₂) utilizada nas corridas, o rendimento médio percentual foi de 26 ± 2 % (não corrigido pelo decaimento), o que condiz com o especificado pelo manual do equipamento (30 ± 7 %) (GEMS, 2003) e com a média das publicações com metodologias similares, respeitando as variações em função de infraestrutura e tempos de processo diferentes (SHAO et. al., 2011; KNIESS; RODE; WUEST, 2008). É importante considerar que o valor percentual de rendimento é calculado com base em

uma estimativa para a atividade recebida (calculada) do cíclotron. Como o TRACERlab FX-C pro não é equipado com monitor de radiação na coluna que recebe o $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, não há como obter o valor real de atividade para o início da síntese. Um parâmetro possível de monitorar durante o recebimento da atividade é a taxa de exposição da *hotcell* em mSv/h. Uma vez que o equipamento não foi movido da posição original ao longo das produções, é possível estabelecer uma relação entre a taxa de exposição e a atividade produzida, já que quanto maior a atividade recebida, maior a taxa medida. O que se verificou foi uma oscilação desses valores ao longo das sínteses, da menor taxa de 20,4 mSv/h até a maior de 25,1 mSv/h, mostrando uma variação grande mesmo com a atividade calculada, ou teórica, mantida ($\sim 5\text{Ci}$). Isso pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles variações do próprio cíclotron, incluindo perdas maiores ou menores na transferência, variações na eficiência de retenção da peneira molecular, produção de altas taxas de monóxido de carbono $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ ou outras impurezas, (ALVES, 2012; GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012; MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995), etc.

O tempo de 2 minutos e 45 segundos configurado foi suficiente para o recebimento de todo o material radioativo (atividade) oriundo do alvo do cíclotron. O tempo é adequado para que a pressão do alvo atinja os valores de *baseline*. Ainda, não foi tão excedente a ponto de proporcionar perda excessiva de atividade pelo decaimento. Em relação à pressão no sistema, o fluxo de H_2 de 50 mL/min. incidido na coluna com peneira molecular também foi adequado. Um fluxo muito elevado pode causar contrapressão na linha de transferência, comprometendo o envio, além de problemas na retenção da atividade (MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995). Como já mencionado, não foi possível avaliar a eficiência da retenção de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ da coluna em questão devido à ausência de detector na mesma. Porém, metodologias similares evidenciaram resultados apropriados nesse sentido (MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995). De qualquer maneira, mesmo sendo possível atender a demanda para o processo produtivo do $[^{11}\text{C}]\text{-(R)-PK11195}$, este pode ser um ponto passível de estudos mais aprofundados em futuros desenvolvimentos visando a otimização.

Shao et al. (2011), utilizando um TRACERlab FX-C pro, cita a realização da redução do $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a uma temperatura de 350 °C durante 20 segundos. Neste trabalho adotou-se a mesma temperatura, porém durante 40 segundos, levando em consideração

os níveis mais altos de atividade em relação às publicações citadas (MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995; SHAO et. al, 2011; GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012) e que a reação de redução é tempo dependente (KNISS; RODE; WUEST, 2008), além do baixo significado do acréscimo de tempo em relação ao decaimento. Além disso, Kniess, Rode e Wuest (2008) utilizou tempos muito mais longos também em um TRACERlab FX-C pro (de 4 a 7 minutos). Porém a atividade específica significativamente reduzida observada (máximo 4,8 GBq/ μmol , para o menor tempo testado – 4 min.) pode ter sido causada pela reação de redução das impurezas em função dos altos tempos de reação (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012).

Os 2 minutos e 25 segundos para o recebimento do $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ a $-75\text{ }^\circ\text{C}$ no $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$ (Carboxen), sob fluxo de He de 100 mL/min., foram adotados após os testes preliminares no CPR do InsCer. Previamente aos testes, este tempo estava configurado em 1 minuto e 30 segundos e mesmo fluxo. Enquanto o tempo se encontrava configurado desta maneira, eram verificados problemas de rendimento na fase gasosa o que foi resolvido com a alteração (valores não registrados; observação visual durante o acompanhamento do processo). O aumento do tempo proporcionou o dobro de atividade no $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$ segundo o medidor Geiger-Muller. Porém, não é possível afirmar com clareza se este aumento se deu pelo acúmulo de atividade ou pelo simples deslocamento da mesma através da coluna, aproximando-se mais do detector. Apesar disso, tempos maiores foram descritos na literatura para esta etapa (~ 6 minutos), que também cita a menor eficiência de aprisionamento em relação à peneira molecular com o $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (VAN LIER, 2007). Esta menor eficiência foi evidenciada através da perda e detecção de atividade pela exaustão do equipamento, por onde é direcionado o fluxo durante o recebimento de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$. Esta perda não aumentou após a alteração do tempo, conforme detectado na saída da exaustão. A temperatura de recebimento parece ser um fator mais determinante para redução desta perda (VAN LIER, 2007). Apesar de publicações utilizando a mesma temperatura deste trabalho (SHAO et. al, 2011), há autores que recomendam faixas bem menores, como por exemplo $-196\text{ }^\circ\text{C}$ (VAN LIER, 2007). Um teste (n=1) com o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4\text{-trap}$ a $-150\text{ }^\circ\text{C}$ para o recebimento foi realizado sem diferenças perceptíveis na atividade final obtida (~49950 MBq ou ~1350mCi de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ produzidos). Este ponto, porém, merece ser avaliado mais profundamente em projetos futuros, uma vez que mostra potencial para melhoria/redução de perda.

O aquecimento a 80 °C do [^{11}C]CH₄-*trap* sob fluxo de 100 mL/min de gás hélio para liberação do [^{11}C]CH₄ para o loop é descrito com frequência na literatura (Gómez-Vallejo et al., 2012; ALVES, 2012; MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995, Shao et al., 2011). A configuração se mostrou adequada, uma vez que a atividade residual observada no Geiger Muller da coluna ao final do tempo de recirculação já atingia níveis muito baixos e estáveis (não reduziam). Fato que também demonstra que o tempo de 5 minutos para o *loop* também foi apropriado, o que foi reforçado pelo comportamento do medidor Geiger-Muller da coluna de Porapak Q ([^{11}C]CH₃I-*trap*). Ao final do tempo, houve estabilidade no sinal do detector, ou seja, o platô de atividade foi atingido. Tempos maiores nesta etapa fariam com que a perda por decaimento superasse o ganho de atividade. Além disso, o forno de iodo a 100 °C e o forno do reator de quartzo a 740 °C também proporcionaram uma produção adequada de [^{11}C]CH₃I. Os filtros de Ascarite® (NaOH) localizados entre o forno de quartzo e o ([^{11}C]CH₃I-*trap*) foram eficientes o suficiente para reter as impurezas (CO₂, I₂, HI, etc.), proporcionando atividade específica adequada para o produto acabado. O fluxo do gás no *loop* é controlado pela bomba própria desta etapa do sistema e é fixo (não ajustável através da programação).

A transferência do [^{11}C]CH₃I da coluna para o reator e retenção no solvente (DMSO) trata-se de mais um ponto crítico do processo. Variáveis como fluxo e solvente escolhido são determinantes para uma boa retenção da atividade (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012; ALVES, 2012; GEMS 2003). Com as configurações estabelecidas ([^{11}C]CH₃I-*trap* a 190 °C, fluxo de hélio 30 mL/min. durante 5 minutos e 400 µL de DMSO) foi possível reter atividade suficiente para a obtenção da quantidade necessária do produto acabado. As atividades do reator não são registradas no relatório de síntese emitido pelo equipamento, porém, atingem níveis entre aproximadamente 34410 MBq (930 mCi) e 46620 MBq (1260 mCi) (dados baseados em análise visual dos detectores, o erro dessa leitura pode ser maior que o usual). O DMSO já havia sido descrito por Alves (2012) como sendo mais eficiente na retenção do [^{11}C]CH₃I quando comparado a outros solventes apróticos polares. O fluxo de 30 mL/min. proporcionou a situação desejada, uma transferência lenta o suficiente para o bom aprisionamento do material radioativo e em um tempo não excessivo a ponto de originar perdas pelo decaimento.

5.3. Síntese do Radiofármaco

A reação de metilação do precursor (*R*)-[*N*-desmetil]PK11195 para obtenção do radiofármaco pode ser realizada com sucesso nas condições estabelecidas. Reações de substituição nucleofílica como esta devem ser realizadas com solventes apróticos polares como meio de reação (ALVES, 2012). O rendimento radioquímico médio da reação, calculado com base no cromatograma da purificação por CLAE semi-preparativa (área do pico referente ao produto em relação à área total do cromatograma do detector de radiação), foi de $39\pm 6\%$ ($n=39$, corrigido pelo decaimento). Foi possível obter quantidades apropriadas do produto acabado com este rendimento observado, conforme será demonstrado. Não foram considerados resultados de 7 das 46 produções realizadas para esta análise devido a ocorrência de situações anormais de produção, o que incluiria um fator externo na avaliação do processo.

Para favorecer a reação, é necessária a desprotonação do nitrogênio do precursor. Para isso, a base forte KOH é utilizada. Como não é solúvel em DMSO, o KOH é utilizado em excesso, formando uma suspensão. As produções realizadas com ~30 mg da base apresentaram rendimento similar daquelas nas quais foram utilizadas ~10 mg ($40\pm 5\%$ e $38\pm 6\%$; $n=18$ e $n=21$, respectivamente). A utilização de aproximadamente 30 mg (ALVES, 2012), apesar de proporcionar rendimentos adequados, expunha a coluna do sistema a pHs altos, o que é extremamente danoso à mesma. Apesar da utilização de HCl para neutralizar a mistura, não foi possível pesar sempre a mesma quantidade de base, o que dificultava a constância na eficiência da neutralização. Uma coluna foi perdida durante o projeto em função deste problema. Desta forma, para minimizar os riscos à coluna de CLAE, optou-se pela utilização de aproximadamente 10 mg de KOH (DOORDUIN et al., 2009), uma vez que pHs básicos oferecem maiores perigos. Desde a alteração da quantidade de base, não foi notado decaimento na eficiência do sistema CLAE como observado anteriormente. Não houve prejuízo importante de rendimento em função da mudança, conforme já citado.

5.4. Purificação

A mistura reacional diluída foi filtrada e injetada no sistema CLAE com as configurações já mencionadas. O sistema proporcionou uma boa separação dos picos de impureza e do [^{11}C]-(*R*)-PK11195 (TR ~7,5min.), conforme pode ser visualizado na

Figura 6, permitindo a coleta do radiofármaco isolado. O pico de impurezas radioativas observado no cromatograma oriundo do detector gamma (~ 3 min.) não foi pesquisado quanto sua (s) identidade (s), porém pode se tratar de vários compostos coeluídos, como $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ (oriundo de contaminação por água no meio de reação), $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$ que não reagiu e/ou ainda outros subprodutos da reação.

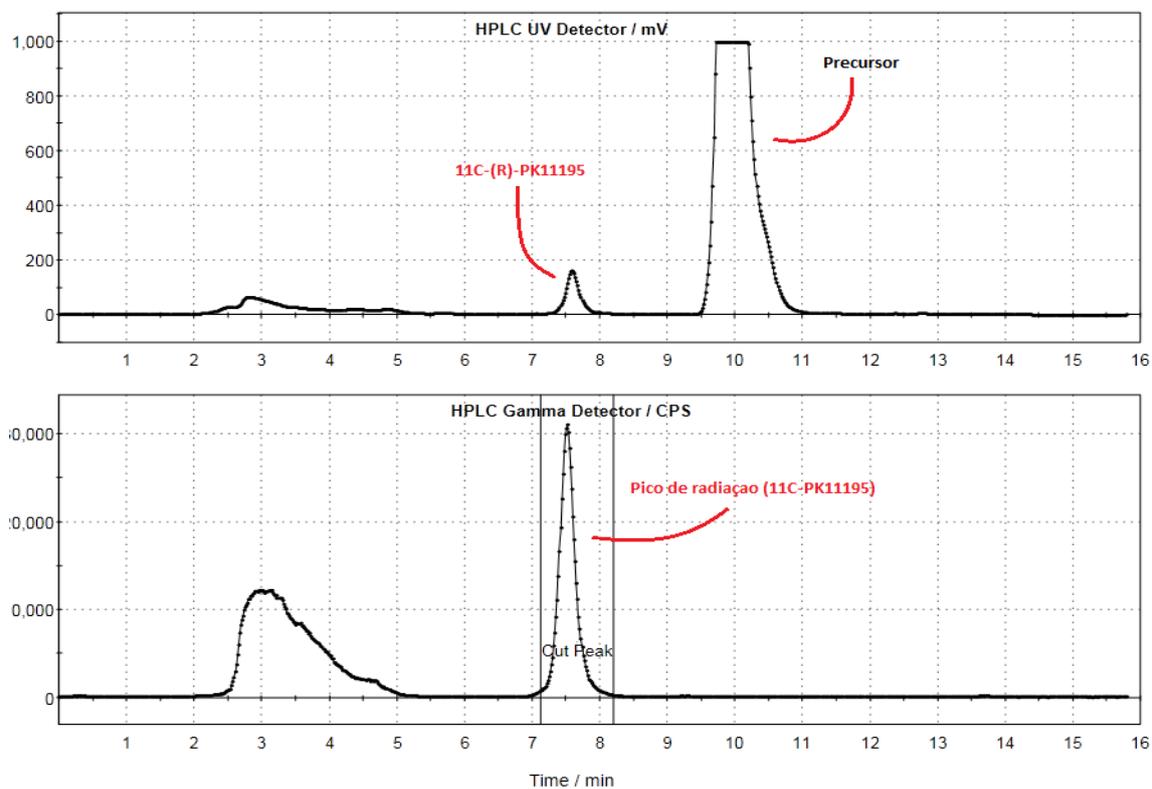


Figura 6. Exemplo de cromatograma de processo de purificação bem sucedido. Fase móvel acetonitrila 76 % e água Milli-Q 26 % a 5mL/min. Coluna Nucleosil Macherey Nagel 250X10 mm, 5 μm .

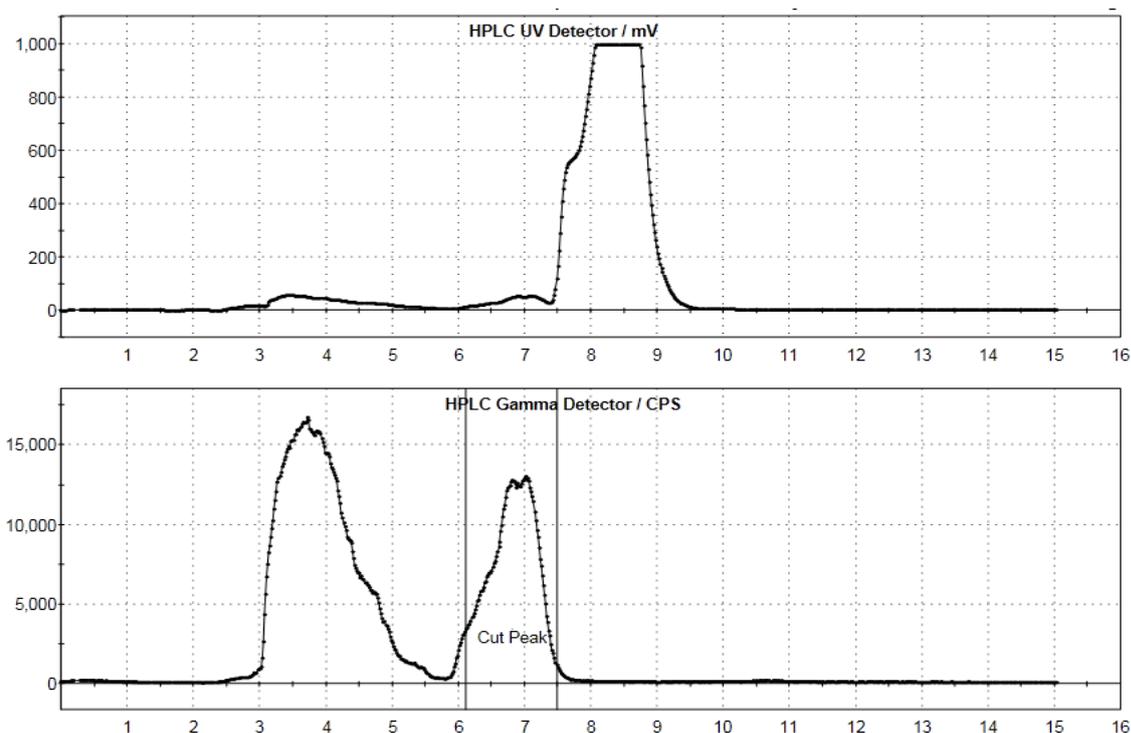


Figura 7. Cromatograma prejudicado pelo dano sofrido pela coluna em virtude do KOH. Fase móvel acetonitrila 76 % e água Milli-Q 26 % a 5mL/min. Coluna Nucleosil Macherey Nagel 250X10 mm, 5 μ m.

Problemas na purificação como a perda na eficiência da coluna (Figura 7) foram verificados ao longo do projeto. Apesar de dificultada, a coleta do radiofármaco com grau de pureza adequado foi possível, conforme averiguado durante o controle de qualidade. O problema provavelmente tenha sido ocasionado pelo pH muito alto (básico) da mistura de reação, conforme já citado. A substituição da coluna foi necessária, resolvendo o problema e restaurando o comportamento do cromatograma para o padrão (observado na figura 6).

Em condições normais da cromatografia, o pico de interesse foi coletado em aproximadamente 1 minuto, significando uma quantidade de ~3,8 mL de acetonitrila nos ~5 mL coletados (fase móvel 76 % acetonitrila e 24 % Água Milli-Q, a 5mL/min.). A extração de fase sólida através de cartucho (C18) foi o método escolhido para a retirada do solvente orgânico da mistura em detrimento da evaporação do mesmo (LEMAIRE et al., 1999). A passagem da fração coletada, diluída em 35 mL de água Milli-Q, através do cartucho C18 e subsequente lavagem do mesmo com adicionais 10 mL de água para injetáveis se mostrou eficiente na retirada do solvente, conforme resultados do controle de qualidade. O cartucho foi lavado com 10 mL adicionais de água Milli-Q com o produto ainda retido para garantir a remoção de qualquer solvente

orgânico, conforme descrito em diversos processos na literatura (SHAO et al., 2011; DOORDUIN et. al., 2009). Eventuais perdas durante a extração de fase sólida em virtude da diluição da porção coletada na CLAE não foram avaliadas. Porém, rendimentos apropriados foram obtidos ao final do processo (rendimento radioquímico médio de $15,5 \pm 2,4$ % em relação à atividade de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$).

Para eluição do produto do cartucho e formulação, foram utilizados 700 μL de etanol absoluto e 6,3 mL de solução salina 0,9 % para injetáveis. As quantidades foram planejadas para atender à demanda de volume máximo do produto para injeção por parte do serviço de MN do InsCer. O dispositivo utilizado para realização da injeção em bolo do radiofármaco no paciente possuía a capacidade máxima de 3 mL. Para obter a dose necessária para realização do exame, de 370 MBq (10 mCi) , em menos de 3 mL, o produto acabado não poderia estar em concentração menor que 123,33 MBq/mL (3,33 mCi/mL) no momento da injeção. O período entre o final da produção, realização do controle de qualidade e a aplicação do medicamento precisou ser considerado. Para garantir que o volume não seria excedido, mesmo com eventuais problemas de rendimento no processo, o volume final foi ajustado para 7 mL. Volumes menores não foram cogitados, pois haveria risco de perda de eficiência da eluição do cartucho C18, uma vez que seria necessário reduzir o volume de etanol para manter sua concentração no produto acabado dentro do limite de 7,9 % (m/v) (USP, 2015). Doorduin et al. (2009) já havia descrito o processo utilizando a 700 μL de etanol de maneira eficiente. O volume foi capaz de eluir quantidade suficiente do produto para atingir o rendimento esperado. Ensaios verificando o residual do produto no cartucho não foram realizados. Foi possível obter o produto na concentração necessária para administração.

5.5. Esterilização e Envase Asséptico

A literatura já apresentava evidências de que o $[^{11}\text{C}]\text{-(R)-PK11195}$ poderia interagir com a membrana filtrante, gerando retenção de uma porção do mesmo. Em vista disso, diferentes membranas, todas de porosidade de 0,22 μm , foram testadas (Tabela 1). As membranas testadas se apresentam na forma de um dispositivo de policloreto de polivinila (PVC) ou de polipropileno e foram as seguintes: membrana de politetrafluoretileno (PTFE), com 25 mm de diâmetro, hidrofóbica, com dispositivo apresentando escape de ar e esterilizada e dois modelos de membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), hidrofílicas, com 33 mm e com 13 mm de diâmetro, ambas com

dispositivo sem escape de ar e esterilizadas. A primeira, de PTFE foi a que apresentou maior percentual de retenção do produto, gerando a perda de cerca de 70 % do medicamento. Isso ocorre devido às características da membrana e da molécula filtrada (ZHANG et al., 2002). Como a membrana é hidrofóbica, assim como a molécula de [¹⁴C]-(*R*)-PK11195, estabelecem-se ligações deste tipo entre ambos, retendo boa parte do produto (ZHANG et al., 2002). Além disso, como o dispositivo possui ventilação, não ocorre a purga do líquido do filtro ao se incidir a pressão de transferência do produto final, ocasionando a perda de volume de solução, gerando perda ainda maior. Já a membrana de PVDF, hidrofílica e de baixa ligação proteica, apresenta característica opostas, não estabelecendo interações hidrofóbicas com produto, reduzindo drasticamente a perda do mesmo. O modelo de 33 mm de diâmetro foi capaz de diminuir a o percentual de produto perdido para aproximadamente 20 % e o modelo de 13 mm de diâmetro para menos de 10 %. O pequeno percentual de retenção ainda observado pode ser atribuído a questões físicas como o volume morto do filtro (menor em virtude de não haver ventilação, porém, existente) ou o entupimento dos microporos da membrana pelas moléculas (ZHANG et al., 2002). Os percentuais foram calculados através da relação entre a medida do frasco de produto acabado ainda com o filtro conectado e posterior medida somente do filtro. O filtro de PVDF apresentou a menor retenção do produto e foi utilizado para as validações e posteriores produções de rotina.

Tabela 1. Características, dimensões e percentuais médios de retenção das membranas testadas.

	Perda (%)	Característica	Diâmetro (mm)
PTFE	71,3 (n=2)	Hidrofóbica	25
PVDF	19,6 (n=2)	Hidrofílica	33
PVDF	8,2 (n=4)	Hidrofílica	13

Ainda o envase asséptico foi validado. Para validação do processo de esterilização foi verificado o *bioburden* (carga microbiana pré-filtração). Para realização do *bioburden*, foi produzido lote do produto conforme procedimento já validado, porém, sem utilização da membrana esterilizante no momento do envase. Todo o lote produzido (7 mL) foi filtrado em membrana 0,22 µm e esta foi posteriormente inoculada em meio de cultura (ágar caseína-soja) e incubada a 32,5 °C (± 2,5 °C) por 7 dias para contagem de microorganismos totais. A carga microbiana pré-filtração foi nula, ou seja, não cresceram microorganismos.

Tabela 2. Condições ideais para as etapas de produção

ETAPA	CONDIÇÃO
Recebimento de [¹¹ C]CO ₂ no sintetizador	2 minutos e 45 segundos H ₂ a 50 mL/min.
Redução do [¹¹ C]CO ₂ em [¹¹ C]-CH ₄	40 segundos Temperatura: 350 °C
Recebimento do [¹¹ C]CH ₄ no [¹¹ C]CH ₄ -trap	2 minutos e 25 segundos H ₂ a 100 mL/min. Temperatura: -75 °C
Liberação do [¹¹ C]CH ₄ do [¹¹ C]CH ₄ -trap para o loop	Temperatura: 80 °C
Temperatura do forno do reator de quartzo	Temperatura: 740 °C
Temperatura do forno de iodo	Temperatura: 100 °C
Tempo de recirculação no loop	5 minutos
Liberação do [¹¹ C]CH ₃ I do [¹¹ C]CH ₃ I-trap para o reator	5 minutos H ₂ a 30 mL/min. Temperatura: 190 °C
Recebimento do [¹¹ C]CH ₃ I no reator	Temperatura: ambiente
Síntese do Radiofármaco (reação de metilação)	(R)-[N-desmetil]PK11195: 1 mg DMSO: 400 µL KOH: ~10 mg Temperatura: 40 °C Tempo: 1 minuto
Neutralização e diluição da mistura de reação	HCl 1 mol.L ⁻¹ : 200 µL Fase Móvel: 900 µL
CLAE semipreparativo	Fase Móvel: Acetonitrila 76 % e Água Milli-Q 24 % Fluxo: 5 mL/min. Tempo de retenção do produto: ~7,5 min.
Purificação por Extração de Fase Sólida	35 mL de água Milli-Q para diluição da fração coletada Lavagem do cartucho C18 com 10 mL de água para injeção Eluição do cartucho C18 com 700 µL de etanol
Formulação e Esterilização	700 µL de etanol 6,3 mL de solução salina 0,9 % para injetáveis Membrana filtrante de PVDF de 13 mm

5.6. Rendimento

A atividade média de produto acabado, obtida ao final do processo, foi de 7471,5±1283,8 MBq (201,9±34,7 mCi; n=39). O rendimento médio do processo em relação ao [¹¹C]CH₃I formado, não corrigido pelo decaimento, foi de 15,5±2,4 %. As atividades produzidas condizem com os dados publicados na literatura (DOORDUIN et al., 2009; ALVES, 2012; VAN LIER, 2007; SHAO et al., 2011).

Tabela 3. Rendimentos da fase gasosa e do processo de síntese, purificação e formulação do radiofármaco.

Produção	Atividade de Inicial ($[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) (MBq)	Atividade de ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) (MBq)	Rendimento Radioquímico da Fase Gasosa ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ vs. $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) (%)*	Atividade de Produto Acabado ($[^{11}\text{C}]\text{-(R)-PK11195}$) (MBq)	Rendimento Radioquímico ($[^{11}\text{C}]\text{-(R)-PK11195}$ vs. $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) (%)*
1	182891	40821,36	22,3 %	4928,03	12,1 %
2	182891	44747,06	24,5 %	6013,61	13,4 %
3	196100	43360,67	22,1 %	4168,79**	9,6 %**
4	182891	44404,81	24,3 %	4152,88**	9,4 %**
5	182410	44210,93	24,2 %	7668,25	17,3 %
6	183150	45064,15	24,6 %	6021,75	13,4 %
7	183150	43053,94	23,5 %	8544,78	19,8 %
8	183150	48527,72	26,5 %	7713,39	15,9 %
9	185000	51300,13	27,7 %	7418,50	14,5 %
10	190920	49000,58	25,7 %	8041,95	16,4 %
11	220150	48510,33	22,0 %	7756,31	16,0 %
12	225700	50665,21	22,4 %	9023,93	17,8 %
13	185000	45505,19	24,6 %	5903,35	13,0 %
14	185000	48217,29	26,1 %	6924,92	14,4 %
15	190550	48333,84	25,4 %	5813,07	12,0 %
16	185000	47247,52	25,5 %	6950,08	14,7 %
17	185000	44066,26	23,8 %	7732,26	17,5 %
18	185000	44059,23	23,8 %	6790,61	15,4 %
19	185000	49455,31	26,7 %	5168,90**	10,5 %**
20	185000	52407,54	28,3 %	5440,85**	10,4 %** %
21	185000	52813,06	28,5 % %	6451,69	12,2 % %
22	185000	53063,55	28,7 % %	8299,47	15,6 % %
23	185000	51374,13	27,8 % %	7173,19	14,0 % %
24	185000	47568,31	25,7 % %	8549,22	18,0 % %
25	185000	45737,92	24,7 % %	5464,53**	11,9 %** %
26	185000	45988,41	24,9 % %	5446,03**	11,8 %** %
27	185000	45896,65	24,8 % %	7583,52	16,5 % %
28	185000	46464,6	25,1 % %	6160,87	13,3 % %
29	185000	46715,09	25,3 % %	3868,72	8,3 % %
30	185000	48020,08	26,0 % %	6329,59	13,2 % %
31	185000	48753,42	26,4 % %	8246,19	16,9 % %
32	185000	50139,81	27,1 % %	7851,40	15,7 % %
33	185000	50308,9	27,2 % %	8887,40	17,7 % %
34	185000	51275,34	27,7 % %	8376,80	16,3 % %
35	185000	49864,53	27,0 % %	8787,50	17,6 % %
36	185000	50957,88	27,5 % %	7655,30	15,0 % %
37	185000	50326,66	27,2 % %	6922,70	13,8 % %
38	185000	51063,7	27,6 % %	8732,00	17,1 % %
39	185000	50389,93	27,2 % %	8021,60	15,9 % %
40	185000	51204,67	27,7 % %	9631,10	18,8 % %
41	185000	48827,79	26,4 % %	9176,00	18,8 % %
42	185000	47670,8	25,8 % %	8743,10	18,3 % %
43	185000	49314,34	26,7 % %	8288,00	16,8 % %

44	185000	50601,57	27,4 % %	3574,20**	7,1 %** %
45	185000	46193,02	25,0 % %	5616,60	12,2 % %
46	185000	51550,62	27,9 % %	8791,20	17,1 % %

*Não corrigido pelo decaimento

** dados não utilizados para cálculo

5.7. Especificações e Controle de Qualidade

As especificações foram definidas conforme a Tabela 4 e os parâmetros testados através das metodologias analíticas desenvolvidas.

Tabela 4. Especificações para o radiofármaco [¹¹C]-(*R*)-PK11195.

Parâmetro		Especificação
Análise Visual		Límpido, Incolor e Livre de Partículas
Atividade Específica		>12GBq/μmol 10 min. antes da injeção
Identidade Radioquímica		TR = 2,5min. ±10 %
Pureza Radioquímica		>95 %
Solventes Residuais	Etanol	<10 %
	Acetonitrila	<0,04 %
	DMSO	<0,5 %
Identidade Radionuclídica		Entre 19,9 e 20,9 min.
Pureza Radionuclídica		>99,5 %
pH		entre 4,3 e 7,5
Teor de Endotoxinas		<25 UE/mL
Esterilidade		Estéril

As especificações foram definidas com base nas diretrizes da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010) e na Farmacopeia Americana (USP, 2015) e com base em publicações científicas.

A atividade específica é um dos mais importantes parâmetros para medicamentos marcados com carbono-11 (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012). Os valores obtidos foram adequados segundo os parâmetros adotados por outros autores. Atividades específicas entre ~15 e ~70 GBq/μmol foram descritas (DOORDUIN et al., 2009; LARSEN et al., 1997, ALVES, 2012). A média de atividade específica encontrada nos 46 lotes produzidos foi de 39,7±11,1 GBq/μmol, 10 minutos antes da injeção. Esta especificação foi estabelecida desta forma porque o tempo entre o final da produção e a injeção pode sofrer variações, mínimas que sejam. Com isso, o parâmetro poderia estar fora de conformidade no momento da injeção mesmo após a aprovação do lote pelo controle de

qualidade. Considerando que o controle de qualidade é realizado em 25 minutos e que a amostra demora em torno de 5 minutos para chegar ao laboratório de CQ, pode-se afirmar que a injeção é realizada aproximadamente 30 minutos após o final da produção. Com isso, a atividade específica ao final da síntese (EOS) supera o mínimo citado por publicações a respeito do radiofármaco em questão (DOORDUIN et al., 2009; ALVES, 2012).

As especificações de análise visual, identidade e pureza radioquímica, identidade e pureza radionuclídica, pH, teor de endotoxinas e esterilidade seguem o recomendado pelas farmacopeias brasileira e americana (BRASIL 2010; USP 2015).

A análise de solventes residuais também acompanha o especificado pelo capítulo geral da Farmacopeia Americana. Porém, o etanol é um caso peculiar. A USP (2015) define o limite máximo de etanol em preparações injetáveis de 0,5 % (m/v). Porém, a própria farmacopeia em questão contém ressalva para casos em que não é possível atender os limites para os solventes de classe 3, como no caso do [^{11}C]-(*R*)-PK11195. Nestes casos, o novo limite deve ser justificado e o solvente quantificado ao final de cada lote (USP, 2015). Para o radiofármaco, não foi possível obtê-lo sem etanol devido à extração de fase sólida. Desta forma, o solvente é quantificado a cada lote para averiguar se o limite estabelecido foi atendido. Demais solventes sempre se apresentaram bem abaixo dos limites no produto acabado.

Os resultados das principais análises do controle de qualidade podem ser observados na Tabela 5. Todos os resultados observados nas demais análises (identidades radioquímica e radionuclídica, teor de endotoxinas, integridade da membrana filtrante, esterilidade e análise visual) restaram “Conforme”, de acordo com as especificações estabelecidas.

Tabela 5. Resultados com as principais análises de controle de qualidade para 46 lotes produzidos no InsCer.

	Atividade Específica	Etanol (%)*	DMSO (%)*	Acetonitrila (%)*	Pureza Radioquímica	Pureza Radionuclídica	pH
1	39,0 GBq/mL	7,837 %	<0,056 %	0,011 %	>99 %	>99,5 %	5
2	38,7 GBq/mL	7,121 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	5
3	12,9 GBq/mL	7,420 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
4	30,2 GBq/mL	7,914 %	<0,056 %	0,011 %	>99 %	>99,5 %	5
5	32,4 GBq/mL	6,798 %	<0,056 %	0,010 %	>99 %	>99,5 %	5
6	31,9 GBq/mL	7,316 %	<0,056 %	0,008 %	>99 %	>99,5 %	5

7	28,9 GBq/mL	7,238 %	<0,056 %	0,010 %	>99 %	>99,5 %	5
8	66,7 GBq/mL	7,678 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	5,3
9	65,7 GBq/mL	8,046 %	<0,056 %	0,010 %	>99 %	>99,5 %	5
10	51,4 GBq/mL	8,125 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
11	71,7 GBq/mL	7,024 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
12	42,7 GBq/mL	7,626 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	5
13	47,4 GBq/mL	7,350 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
14	58,8 GBq/mL	7,431 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
15	52,9 GBq/mL	7,646 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
16	50,1 GBq/mL	7,540 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
17	47,9 GBq/mL	7,237 %	<0,056 %	0,036 %	>99 %	>99,5 %	5
18	25,9 GBq/mL	7,367 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	5
19	23,4 GBq/mL	7,106 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
20	32,9 GBq/mL	7,239 %	<0,056 %	0,008 %	>99 %	>99,5 %	5
21	32,7 GBq/mL	7,525 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
22	37,4 GBq/mL	7,708 %	<0,056 %	0,023 %	>99 %	>99,5 %	5
23	26,1 GBq/mL	7,745 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	4,7
24	41,3 GBq/mL	7,909 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	4,7
25	34,5 GBq/mL	7,493 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
26	33,3 GBq/mL	7,281 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
27	29,7 GBq/mL	7,380 %	<0,056 %	0,012 %	>99 %	>99,5 %	4,7
28	38,9 GBq/mL	7,385 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	4,7
29	38,3 GBq/mL	7,254 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
30	37,7 GBq/mL	7,454 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
31	38,3 GBq/mL	7,407 %	<0,056 %	0,013 %	>99 %	>99,5 %	5
32	28,9 GBq/mL	7,677 %	<0,056 %	0,005 %	>99 %	>99,5 %	5
33	37,5 GBq/mL	7,246 %	<0,056 %	0,005 %	>99 %	>99,5 %	5
34	43,9 GBq/mL	7,702 %	<0,056 %	0,009 %	>99 %	>99,5 %	5
35	38,5 GBq/mL	7,297 %	<0,056 %	0,014 %	>99 %	>99,5 %	5
36	43,2 GBq/mL	7,822 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
37	41,0 GBq/mL	7,177 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
38	41,3 GBq/mL	7,206 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
39	48,7 GBq/mL	7,979 %	<0,056 %	<0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
40	36,3 GBq/mL	8,051 %	<0,056 %	0,006 %	>99 %	>99,5 %	4,7
41	37,2 GBq/mL	7,150 %	<0,056 %	<0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
42	35,3 GBq/mL	7,228 %	<0,056 %	<0,006 %	>99 %	>99,5 %	5
43	33,0 GBq/mL	9,060 %	<0,056 %	0,008 %	>99 %	>99,5 %	5
44	46,8 GBq/mL	6,883 %	<0,056 %	0,007 %	>99 %	>99,5 %	5
45	39,1 GBq/mL	6,966 %	<0,056 %	0,008 %	>99 %	>99,5 %	5
46	39,1 GBq/mL	6,660 %	<0,056 %	<0,006 %	>99 %	>99,5 %	5

* (m/v)

A Figura 8 mostra um exemplo de cromatograma do padrão não radioativo utilizando a metodologia para análise da atividade específica e da identificação e pureza radioquímica. Neste método analítico, o pico referente $[^{11}\text{C}]$ -(R)-PK11195 era eluído em 2,5 minutos, acompanhado do seu pico radioativo (com diferença de aproximadamente 0,2 min. devido à disposição dos detectores em série; tempo de retenção de ~2,7 min.). O único pico radioativo observado nas análises foi referente ao produto, mostrando altíssimo grau de pureza radioquímica. Através da área do pico do cromatograma de UV/VIS foi possível calcular a concentração do produto e, por fim, sua atividade específica.

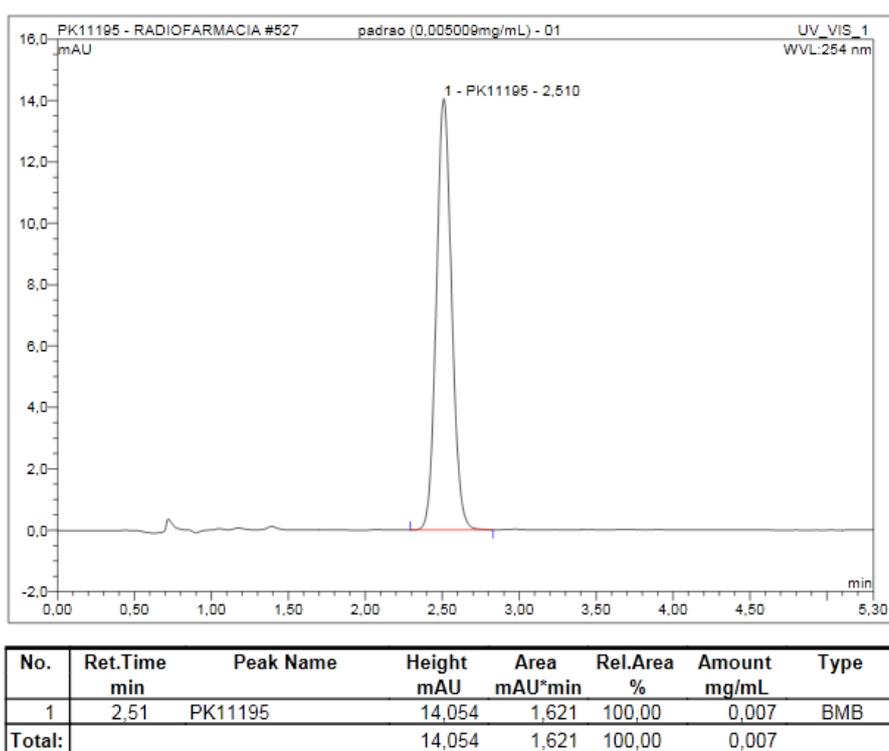


Figura 8. Exemplo de cromatograma de padrão não radioativo de PK11195.

5.8. Validação da Metodologia para Pureza Radioquímica e Atividade Específica (CLAE)

5.8.1. Intervalo e Linearidade

Conforme os padrões adotados pelos órgãos regulatórios brasileiros, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Em outras palavras, o parâmetro avalia se a variação dos valores do sinal observado se dá em função da variação da concentração da

amostra. Para sua determinação, o modelo de regressão linear deve ser aplicado aos dados e o R^2 deve ser analisado.

As áreas correspondentes a cada ponto da linearidade e suas médias encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Áreas relativas às concentrações de PK11195 para obtenção da curva de calibração.

Linearidade PK11195						
Concentração (µg/mL)		Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	CV
1,1	Ponto 1	0,2584	0,2664	0,275	0,2666	3,1 %
2,7	Ponto 2	0,6599	0,6693	0,6754	0,6682	1,2 %
5,3	Ponto 3	1,3025	1,3166	1,3537	1,3243	2,0 %
6,6	Ponto 4	1,6284	1,6791	1,6225	1,6433	1,9 %
11,1	Ponto 5	2,6788	2,675	2,6733	2,6757	0,1 %

O coeficiente de determinação encontrado para os pontos, $R^2=0,999$, e o coeficiente de variação ($r=0,999$) demonstram a linearidade no intervalo escolhido. A Figura 8 mostra o gráfico com os pontos de concentração e suas respectivas áreas plotados, bem como a equação da reta para a curva. Como a linearidade foi comprovada, adota-se o intervalo da curva analítica usada para este parâmetro como sendo o intervalo linear do método (1,1 µg/mL até 11,1 µg/mL).

Para medicamentos diferentes de radiofármacos, o convencional é estabelecer o intervalo linear entre 80 % e 120 % da concentração média de trabalho (100 %) adicionando mais dois pontos entre esses três (ANVISA, 2003; ICH, 1996), totalizando os cinco pontos preconizados pela ANVISA (2003). Isso é viável para estes tipos de medicamentos uma vez que se tem uma faixa fixa de trabalho (a dose teórica). Porém, para radiofármacos de carbono, tanto rendimento quanto atividade específica oscilam entre as produções, fazendo com que a faixa de concentração também oscile (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012). Com isso, estabeleceu-se um intervalo mais abrangente para evitar que a concentração do produto em algum lote ficasse fora do intervalo linear, inviabilizando a determinação da sua atividade específica. Mesmo assim, a curva inclui a faixa localizada entre 80-120 % no intervalo, o que a deixa em conformidade com o preconizado (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

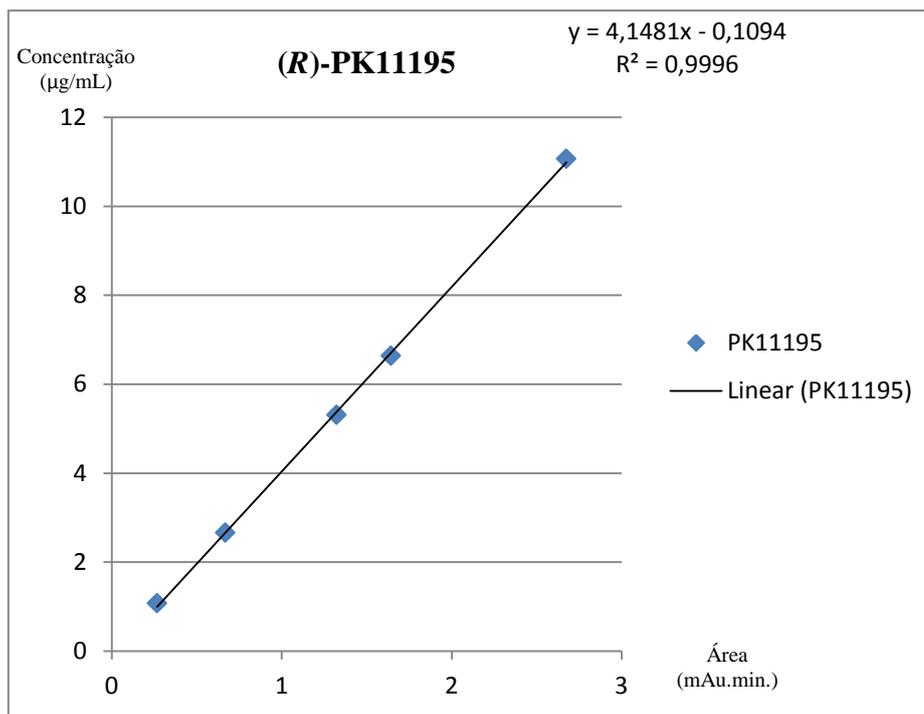


Figura 9. Curva de calibração para PK11195 (CLAE).

5.8.2. Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). A especificidade foi verificada injetando o placebo (matriz do medicamento sem o princípio ativo, o PK11195) contaminado com a principal impureza potencial (o precursor do [^{11}C]-(*R*)-PK11195). Logo, foi realizada outra análise de uma solução padrão de PK11195 em placebo (2,58 µg/mL), também contaminada com precursor (ICH, 1996).

Nenhum pico foi verificado no TR correspondente ao padrão de PK11195 (2,5 ±10 %) na corrida do placebo com a impureza, indicando a seletividade do método. A análise do padrão não sofreu alterações em função da matriz ou da impureza, apresentando uma recuperação de 102,9 % da concentração teórica, o que se encontra dentro dos limites de exatidão para faixa. A resolução entre o pico do padrão e a impureza no cromatograma em que foram injetados simultaneamente foi de 3,75. Portanto, o método é seletivo para análise do [^{11}C]-(*R*)-PK11195.

O parâmetro foi avaliado desta forma devido ao fato de que o equipamento não possui detector de arranjo de fotodiodo, que possibilita calcular a pureza do pico

cromatográfico. Porém, a metodologia utilizada é adequada para o propósito (ICH, 1996).

5.8.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser quantificada pelo método (ANVISA, 2003). Foi utilizado o método baseado em análise visual para avaliação deste parâmetro (ICH, 2006). Com isso, como limite de detecção foi adotado o ponto de menor concentração da curva de calibração (1,1 µg/mL ou 3,1 µmol/mL).

5.8.4. Exatidão

A exatidão é definida como a proximidade dos resultados obtidos através do método com os valores verdadeiros (ANVISA, 2003). As soluções das faixas de concentração de padrão baixa (1,10 µg/mL), média (2,66 µg/mL) e alta (10,60 µg/mL) foram preparadas em placebo e as análises realizadas em triplicata. (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

Foi estabelecida a relação da média dos resultados obtidos através das injeções de cada faixa e suas concentrações teóricas já citadas. A tabela 7 mostra os resultados.

Tabela 7. Análise da exatidão do método.

Concentração Teórica (µg/mL)	Faixas	Concentração Medida	Recuperação
10,60	Alta	0,0114	108 %
2,66	Média	0,0026	99 %
1,10	Baixa	0,0013	118 %

Os critérios de aceitação estabelecidos para a recuperação foram de: 75–120 % para o padrão de 1,1 µg/mL e 80-115 % para os padrões de 2,7 µg/mL e 10,6 µg/mL. Portanto, o método demonstrou exatidão adequada (ICH, 1996).

5.8.5. Repetibilidade

A repetibilidade ou precisão intra-corrída é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ANVISA, 2003). Foi verificada através de seis injeções na faixa de trabalho (ANVISA,

2003; ICH, 1996). Conforme citado, fica dificultado o estabelecimento de uma faixa fixa de trabalho uma vez que a concentração do composto oscila produção a produção. Desta forma, optou-se por escolher dois pontos, mais aproximados da faixa de trabalho (conforme produções realizadas até então): 2,66 µg/mL e 5,55 µg/mL. Isso devido ao fato de que após os testes iniciais, com a otimização do processo, o rendimento e a atividade específica melhoram e a concentração de trabalho aumentou de ~2,5 para ~5,0 µg/mL. Ainda assim observa-se oscilações, porém as duas faixas cobrem essa variação.

Calculou-se o desvio padrão relativo, ou CV das seis injeções e este devia ser menor que 5 %. Para a concentração de 2,66 µg/mL o CV obtido foi de 1,9 % e para a concentração de 5,55 µg/mL foi de 1,4 %. Portanto, o método apresenta repetibilidade adequada.

5.8.6. Precisão intermediária

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). Foi realizado o mesmo procedimento da análise da repetibilidade, porém, por outro operador e em dia diferente.

Os resultados para o CV foram de 2,9 % para a concentração de 2,66 µg/mL e de 0,8 % para a concentração de 5,55 µg/mL. Portanto a precisão intermediária do método é adequada.

5.8.7. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos e indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003).

Foi alterado o fluxo do sistema para 2,6 mL/min. e foram realizadas três corridas do padrão a 2,66 µg/mL. Além disso, foi realizada modificação na proporção da fase móvel para acetonitrila 74 % e água Milli-Q 26 %. Três corridas foram feitas com o mesmo padrão nestas condições também. O tempo de retenção do padrão e percentual de recuperação foram analisados.

A média das concentrações verificadas para o padrão nas corridas com alteração no fluxo foi de 2,77 µg/mL, proporcionando um percentual de recuperação de 104 %. O tempo de retenção das três corridas permaneceu 2,417 minutos, e continuou dentro da janela referente ao padrão (2,5 min.±10 %).

A média das concentrações do padrão nas corridas com a fase móvel alterada foi de 2,83 µg/mL, atingindo um percentual de recuperação de 107 %. O tempo de retenção médio para os picos foi de 2,351 minutos e também está dentro da janela do padrão.

Desta forma, o método se mostrou robusto. Com todos estes parâmetros testados, a metodologia pôde ser considerada válida.

5.9. Validação do Processo Produtivo

Para a validação do processo produtivo foram realizadas produções de três lotes consecutivos do [¹¹C]-(*R*)-PK11195 e os mesmos foram analisados quanto aos parâmetros de qualidade definidos. Os resultados estão na Tabela 8.

Com base nos resultados obtidos, uma vez que os três lotes atenderam todas as especificações estabelecidas, o processo pode ser considerado validado.

Tabela 8. Lotes para Validação do Processo.

	Pureza Radioquímica	Etanol	Acetonitrila	DMSO	Meia-vida	Pureza Radionuclídica	pH	Endotoxinas	Identidade Radioquímica	Aparência	Atividade Específica (10 min. antes da injeção)	Ponto de Bolha*	Esterilidade
Lote 1	>99%	7,27%	<0,006%	<0,056%	20,3 min.	>99,5%	5-5,3	<10 EU/mL	Conforme	Conforme	40,75 GBq/μmol	56 psi	Estéril
Lote 2	>99%	7,40%	0,009%	<0,056%	20,3 min.	>99,5%	5-5,3	<10 EU/mL	Conforme	Conforme	55,15 GBq/μmol	59 psi	Estéril
Lote 3	>99%	5,18%	<0,006%	<0,056%	20,3 min.	>99,5%	5-5,3	<10 EU/mL	Conforme	Conforme	42,97 GBq/μmol	55 psi	Estéril

* Especificação do fabricante da membrana filtrante: ≥50 psi

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de radiofármacos é um processo ímpar, que demanda domínio de diversas áreas do conhecimento. Além disso, seu desenvolvimento e implantação sempre requer estudo das condições locais, uma vez que é muito suscetível a interferências do meio onde ocorre.

Foi possível desenvolver e implantar um processo produtivo próprio do CPR do InsCer, apropriado à estrutura do instituto. O procedimento de produção do [^{11}C]-(*R*)-PK11195 no equipamento TRACERlab FX-C pro se mostrou viável e capaz de ser conduzido segundo as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (ANVISA, 2010). Foi possível obter rendimento adequado para realização de exames no próprio InsCer. Os parâmetros de qualidade do produto foram otimizados e se mostraram adequados. O processo foi validado. As metodologias analíticas também foram validadas, conforme norma vigente (ANVISA, 2003). Nem todas as validações foram abordadas neste trabalho, porém, a validação da principal metodologia analítica para o radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 foi elucidada.

Ficam alguns pontos citados ao longo do trabalho para estudos futuros, inclusive a discussão das demais validações.

Por fim, o objetivo do projeto foi alcançado e a linha produtiva do radiofármaco [^{11}C]-(*R*)-PK11195 está operante no Centro de Produção de Radiofármacos do InsCer e adequada à legislação vigente. O produto é produzido dentro dos padrões de qualidade já descritos na literatura. Além disso, o projeto foi muito importante enquanto representou a primeira produção de radiofármaco marcado com carbono-11 no CPR do InsCer. Isso porque foi possível dominar e aprimorar a operação do equipamento e as etapas comuns a todos os radiofármacos marcados com este radioisótopo. Com certeza, o trabalho abriu caminho para demais projetos como este.

7. BIBLIOGRAFIA

ALVES, V. H. **Optimisation of synthesis, purification and reformulation of (R)-[N-Methyl-¹¹C]PK11195 for in vivo PET imaging studies**,. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA ATÔMICA. **Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice**. Viena: IAEA, 2008. 215 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. **Dispõe Sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Brasília, DF, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.

BANATI, R. B. et al. Cytotoxicity of microglia. **Glia**. [s.l.], v. 7, n. 1, p. 111-118. jan. 1993.

BANATI, R. B et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. **Brain**. [s.l.], v. 123, n. 11, p. 2321-2337. nov. 2000.

BANATI, R. B. Visualising microglial activation in vivo. **Glia**. [s.l.], v. 40, n. 2, p. 206-217. jan. 2002.

CAGNIN, A. et al. Positron emission tomography imaging of neuroinflammation. **Neurotherapeutics**. [s.l.], v. 4, n. 3, p. 443-452. july 2007.

CAMSONNE, R. et al. Synthesis of N-[¹¹C]methyl, N-(methyl-1-propyl), (chloro-2-phenyl)-1-isoquinoline carboxamide-3 (PK11195): a new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. **J. Labelled Compd. Radiopharm**. [s.l.], v. 21, n. 10, p. 985-991. 03 july 1984.

CONVERSE, A. K. et al. ^{11}C -(R)-PK11195 PET Imaging of Microglial Activation and Response to Minocycline in Zymosan-Treated Rats. **J. Nucl. Med.** [s.l.], v. 52, n. 2, p. 257-262. 1 feb. 2011.

DAMOISEAUX, J. S. et al. Reduced resting-state brain activity in the “default network” in normal aging. **Cereb. Cortex.** [s.l.], v. 18, n. 8, p. 1856-1864. aug. 2008..

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience.** [s.l.], v. 8, n. 6, p. 752-758. 15 june. 2005.

DEBRUYNE, J. C. et al. PET visualization of microglia in multiple sclerosis patient using [^{11}C]PK11195. **European Journal Of Neurology.** [s.l.], v. 10, n. 3, p. 257-264. may 2003.

DOORDUIN, J. et al. [^{11}C]-DPA-713 and [^{18}F]-DPA-714 as New PET Tracers for TSPO: A Comparison with [^{11}C]- (R)-PK11195 in a Rat Model of Herpes Encephalitis. **Mol. Imaging Biol.** [s.l.], v. 11, n. 6, p. 386-398. nov. 2009.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

GANDHI, R.; LARONI, A.; WEINER, H. L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** [s.l.], v. 221, n. 1-2, p. 7-14. apr. 2010.

GE MEDICAL SYSTEMS. **TRACERlab FX-C pro:** Specification Manual. Uppsala: GE, 2003. 47 p.

GOERRES, G. W. et al. Imaging Cerebral Vasculitis in Refractory Epilepsy Using [^{11}C] (R)-PK11195 Positron Emission Tomography. **American Journal Of Roentgenology.** [s.l.], v. 176, n. 4, p. 1016-1018. apr. 2001.

GÓMEZ-VALLEJO, V. et al. Specific Activity of ^{11}C -Labelled Radiotracers: A Big Challenge for PET Chemists. In: POSITRON Emission Tomography: Current Clinical and Research Aspects. Current Clinical and Research Aspects. [s.l.]: Chia-hung Hsieh, 2012. p. 183-210.

HANISCH, U.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**. [s.l.], v. 10, n. 11, p. 1387-1394. nov. 2007.

HASHIMOTO, K. et al. Synthesis and evaluation of ^{11}C -PK11195 for in vivo study of peripheral-type benzodiazepine receptors using positron emission tomography. **Ann. Nucl. Med.** [s.l.], v. 3, n. 2, p. 63-71. july. 1989.

INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **GUIDANCE FOR INDUSTRY Q2B**: Text on Validation of Analytical Procedures. Rockville, 1996.

KHALIL, M. M. (Ed.). **Basic Sciences of Nuclear Medicine**. Berlim: Springer, 2011.

KNISS, T.; RODE, K.; WUEST, F. Practical experiences with the synthesis of ^{11}C CH₃I through gas phase iodination reaction using a TRACERlabFXC synthesis module. **Appl. Radiat. Isot.** [s.l.], v. 66, n. 4, p. 482-488. apr. 2008.

LARSEN, P. et al. Synthesis of ^{11}C iodomethane by iodination of ^{11}C methane. **Appl. Radiat. Isot.** [s.l.], v. 48, n. 2, p. 153-157. jan. 1997.

LEITHA, T. Nuclear Medicine: Proof of Principle for Targeted Drugs in Diagnosis and Therapy. **Current Pharmaceutical Design**. [s.l.], v. 15, n. 2, p. 173-187. jan. 2009.

LEMAIRE, C. et al. Solid phase extraction - an alternative to the use of rotary evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals. **J. Labelled Compd. Radiopharm.** [s.l.], v. 42, n.1, p. 63-65. jan. 1999.

LULL, M. L.; BLOCK, M. L. Microglial Activation & Chronic Neurodegeneration. **Journal Of The American Society For Experimental Neurotherapeutics**. [s.l.], v. 7, n. 4, p. 354-365. oct. 2010.

MCALPINE, D. Multiple sclerosis: a review. **British Medical Journal**. [s.l.], v. 2, n. 5861, p. 292-295. may 1973.

MILLER, P. W. et al. Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N radiolabels for positron emission tomography. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** [s.l.], v. 47, n. 47, p. 8998-9033.

jan. 2008.

MOCK, B. H.; VAVREK, T.; MULHOLLAND, G. K. Solid-Phase Reversible Trap for [¹¹C] Carbon Dioxide Using Carbon Molecules Sieves. **Nuclear Medicine and Biology**. [s.l.], v. 22, n. 5, pp. 667-670. july 1995.

NAKAMURA, Y. Regulating factors for microglial activation. **Biol. Pharm. Bull.** [s.l.], v. 25, n. 8, p. 945-953. aug. 2002.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**. [s.l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318. may 2005.

PAPADOPOULOS, V. et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. **Trends Pharmacol. Sci.** [s.l.], v. 27, n. 8, p. 402-409. aug. 2006.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav. Immun.** [s.l.], v. 18, n. 5, p. 407-413. sep. 2004.

RAMSAY, S. C. et al. Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. **Lancet**. [s.l.], v. 339, n. 8800, p. 1054-1055. apr. 1992.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. Cleveland: Springer, 2010. 409 p.

SCHUBIGER, P. A.; LEHMANN, L.; FRIEBE, M. (Ed.). **PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging**. Berlin: Springer, 2007. 339 p.

SHAO, X. et al. Highlighting the versatility of the Tracerlab synthesis modules. Part 2: fully automated production of [¹¹C]-labeled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FXC-Pro. **J. Labelled Compd. Radiopharm.** [s.l.], v. 54, n.14, p. 819-838. oct. 2011.

SIEGER, D. et al. Long-range Ca²⁺ waves transmit brain-damage signals to microglia. **Dev. Cell**. [s.l.], v. 22, n. 6, p. 1138-1148. june 2012.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 38. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

TOMASI, G. et al. Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of ^{11}C -(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's disease. **J. Nucl. Med.** [s.l.], v. 49, n. 8, p. 1249-1256. aug. 2008.

VALLABHAJOSULA, S. **Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT**. Berlin: Springer, 2009. 372 p.

VAN LIER, E. **Gas Phase Methanol Synthesis for Carbon-11 Radiopharmaceuticals**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Chemical And Biological Engineering, The University Of British Columbia, Vancouver, 2007.

VERSIJPT, J. et al. Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study. **Multiple Sclerosis Journal**. [s.l.], v. 11, n. 2, p. 127-134. apr. 2005.

ZHANG, Q. et al. Biocompatibility evaluation of ePTFE membrane modified with PEG in atmospheric pressure glow discharge. **J. Biomed. Mater. Res.** [s.l.], v. 60, n. 3, p. 502-509. june 2002.