

SALUS CARDOSO VIDAL

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE OBTENÇÃO DO  
RADIOFÁRMACO MACRO-AGREGADO DE ALBUMINA PARA  
MARCAÇÃO COM  $^{99m}\text{Tc}$  E APLICAÇÃO EM MEDICINA NUCLEAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina M. Moriguchi Jeckel

Porto Alegre

2015

## RESUMO

O presente trabalho propõe uma metodologia para obtenção do radiofármaco Macro-Agregado de Soro Albumina Humano (MAA), para posterior marcação deste com o radioisótopo tecnécio-99-metaestável ( $^{99m}\text{Tc}$ ) e, assim, seu uso em diagnóstico por imagem. O método propõe uma melhoria de processo, em processo, para a manufatura deste radiofármaco em relação aos processos já descritos nos compêndios internacionais. O  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA é um radiofármaco imprescindível, principalmente, para o diagnóstico de patologias pulmonares permitindo a avaliação da capacidade de perfusão do paciente. Neste trabalho são apresentados os estudos desenvolvidos para a obtenção de uma preparação farmacêutica liofilizada de natureza atóxica, estéril e apirogênica para administração endovenosa. O produto injetável reconstituído foi caracterizado pela uniformidade do particulado em suspensão em relação ao número e ao tamanho dos agregados proteicos. As análises de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificação do tamanho e do número de particulados demonstraram que nenhum dos agregados apresentou tamanho superior a 150  $\mu\text{m}$ , estando, portanto, dentro do limite máximo para aplicação clínica. Os ensaios radioquímicos demonstraram a produção de um produto com elevado grau de pureza radioquímica (PRQ). As características radioquímicas apresentadas pelo produto marcado atendem aos requisitos descritos nas farmacopeias internacionais (PRQ > 90%) permitindo o seu emprego para o diagnóstico por imagem utilizando técnica de avaliação cintilográfica pulmonar de perfusão em medicina nuclear por meio da SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton único).

**Palavras-chave:** Radiofármacos;  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA; Perfusão Pulmonar; SPECT; Medicina Nuclear;

## ABSTRACT

This work proposes a methodology to obtain the radiopharmaceutical Human Macro-Aggregate Albumin (MAA) for further labeling with the radioisotope technetium-99-metastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ) and use in diagnostic imaging. The method proposes a process improvement during the manufacturing process for the production of this radiopharmaceutical regarding the established procedures described in international bibliography.  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA is an indispensable radiopharmaceutical, especially for the diagnosis of lung diseases, allowing the evaluation of patient perfusion capacity. This work presents the studies designed to obtain a lyophilized, non-toxic, sterile and pyrogen-free pharmaceutical preparation for intravenous administration. The injectable product reconstituted was characterized by the uniformity of the particles in suspension in relation to the number and size of protein aggregates. The analysis of optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) to check the number and size of particles have showed that none of the aggregates had size larger than 150 microns, therefore, within the clinical application limit. The radiochemical assays demonstrated the production of a product with high radiochemical purity (RQP). The radiochemical characteristics presented by the marked product according to the international pharmacopoeial requirements (QRP > 90%) allowing its use for diagnostic imaging through the technique that uses scintigraphic evaluation of pulmonary perfusion in nuclear medicine by single-photon emission computed tomography (SPECT).

**Keywords:** Radiopharmaceuticals;  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA ; Pulmonary Perfusion; SPECT; Nuclear Medicine;

## SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1.	Medicina nuclear	1
1.2.	Radiofármacos	4
1.3.	Tecnécio-99-metaestável	5
1.4.	Contextualização e perspectivas atuais dos radiofármacos	8
1.5.	Soro albumina humano (HSA)	10
1.6.	Macro-agregado de albumina (MAA)	11
1.7.	Características físicas do MAA	13
1.8.	Características radioquímicas do $^{99m}\text{Tc}$ -MAA	13
1.9.	Características de distribuição biológica do $^{99m}\text{Tc}$ -MAA	15
1.10.	Condições específicas para produção do MAA	16
1.11.	Formulações de kits frios de maa disponíveis no mercado nacional	16
1.12.	Manufatura do MAA	17
1.13.	Aspectos de mercado do MAA	18
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo geral	19
2.2.	Objetivos específicos	19
3.	Metodologia	20
3.1.	Materiais e equipamentos	20
3.2.	Método para produção do radiofármaco MAA	20
3.2.1.	Procedimento para preparo da solução-mãe de MAA	20
3.2.2.	Procedimento de produção da suspensão de MAA	21
3.2.3.	Procedimento de interrupção da agregação de MAA	22
3.2.4.	Procedimento de clarificação	23
3.2.5.	Procedimento de adição de excipientes	23
3.3.	Métodos de controle em processo	24
3.3.1.	Procedimento de verificação do pH da solução mãe de MAA	24
3.3.2.	Procedimento de verificação do volume dispensado	24

3.4.	Método de liofilização	25
3.5.	Métodos para controle de qualidade do produto final	25
3.5.1.	Procedimento para determinação de massa média	25
3.5.2.	Procedimento para determinação da densidade do produto final	25
3.5.3.	Procedimento para determinação de umidade – karl-fischer	26
3.5.4.	Procedimento para detecção de endotoxinas bacterianas	26
3.5.5.	Procedimento para determinação da esterilidade	26
3.5.6.	Determinação do particulado em hemocitometro	27
3.5.7.	Análise do particulado em microscopia eletrônica de varredura	27
3.5.8.	Procedimento para determinação de ph do produto final	27
3.5.9.	Procedimento para avaliação radioquímica do <sup>99m</sup> Tc-MAA	27
3.6.	Aspectos regulatórios	28
4.	Resultados e Discussão	29
4.1.	Formulação do MAA	29
4.2.	Manufatura do maa e controle em processo	29
4.2.1.	Verificação do volume dispensado em função da massa	30
4.3.	Ciclo de liofilização	31
4.4.	Controle de qualidade do produto final	31
4.4.1.	Densidade relativa do produto final	31
4.4.2.	Umidade no produto final	31
4.4.3.	Massa média do produto final	31
4.4.4.	Esterilidade do produto final	32
4.4.5.	Determinação de endotoxinas bacterianas	32
4.4.6.	pH do produto final	32
4.4.7.	Microscopia optica em hemocitometro manual	32
4.4.8.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
4.4.9.	Pureza radioquímica (PRQ)	42
5.	Considerações finais	45

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.MEDICINA NUCLEAR

A Medicina Nuclear (MN) é uma especialidade médica que permite o diagnóstico e/ou terapia de diversas enfermidades, de acordo com o tipo de emissão radioativa utilizada (WERLANG *et al.*, 2009). Os tipos de radiações mais importantes em MN são: radiação gama ( $\gamma$ ) e partículas beta ( $\beta$ ) (THRALL e ZIESSMAN, 2003). A radiação gama ou fóton gama é utilizado no diagnóstico (formação da imagem) e as partículas alfa e beta são utilizadas com finalidade terapêutica (DULLIUS, 2011).

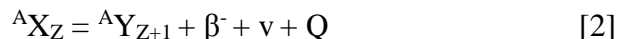
As partículas alfa são núcleos de hélio, constituídos por dois prótons e dois nêutrons, tendo duas cargas positivas. A reação de desintegração alfa pode ser expressa pela equação 1:



Sendo “Q” a energia liberada no processo de desintegração, oriunda da diferença de massa existente entre o núcleo-pai e os produtos da desintegração.

As partículas alfa são emitidas como energias discretas e características do núcleo pai. A desintegração alfa é característica de núcleos pesados ( $Z > 82$ ), salvo exceções, sendo que a maioria dos nuclídeos emissores alfa são naturais.

As partículas beta ( $\beta$ ) podem adquirir cargas positivas ou negativas, dependendo do tipo de desintegração. Quando o núcleo possui um nêutron em excesso, este é convertido em um próton e uma partícula beta negativa ( $\beta^-$ ). A reação de desintegração beta negativa ( $\beta^-$ ) pode ser expressa pela equação 2:



sendo “ $\nu$ ” representado pelo antineutrino, partícula sem carga, com massa de repouso extremamente pequena e que se desloca à velocidade da luz. O antineutrino transporta a diferença de energia existente entre a energia da partícula beta negativa e a energia disponível, dada pela diferença de massa entre o núcleo pai e os produtos da desintegração (Q).

Como o núcleo possui níveis de energias discretos, a emissão de uma partícula com espectro contínuo de energia é explicada pela emissão de uma segunda partícula, neste caso o antineutrino. A partícula beta negativa possui as mesmas características dos elétrons atômicos, porém tem origem no núcleo. A emissão de partícula  $\beta^-$  é diferente das emissões  $\alpha$  uma vez que as partículas  $\beta^-$  são emitidas em um espectro contínuo de energia, variando de zero até um valor máximo, característico do núcleo pai. Esta energia máxima está na faixa de 0,05 - 3,5 MeV, para os nuclídeos mais comuns (XAVIER *et al.*, 2014).

Por outro lado, quando o núcleo possui um próton em excesso, este é convertido em um nêutron e uma partícula beta positiva ( $\beta^+$ ) (pósitron). A reação de desintegração beta positiva ( $\beta^+$ ) pode ser expressa pela equação 3:



O pósitron ( $\beta^+$ ) possui a mesma massa do elétron e sua carga tem valor absoluto igual à do elétron, porém com sinal positivo. De maneira análoga às partículas beta negativas, as partículas beta positivas são emitidas em um espectro contínuo de energia. Neste caso, a energia máxima está na faixa de 0,3 - 1,4 MeV, para os núclídeos mais comuns.

Em muitos casos, após ocorrer um dos tipos de desintegração descritos anteriormente, o processo radioativo se completa. Em outros, o núcleo filho é formado em um de seus estados excitados, contendo, ainda, um excesso temporário de energia. Quando isto ocorre, o núcleo filho emite essa energia armazenada sob a forma de raios gama ( $\gamma$ ). A radiação gama constitui-se numa onda eletromagnética com origem nuclear, diferentemente da radiação X, oriunda da eletrosfera quando os elétrons sofrem mudança de orbital. O fóton gama pode ser retratado como um pequeno pacote de energia, também chamado quantum, que se move através do espaço com a velocidade da luz. Embora fótons não possuam massa, eles possuem campos elétricos e magnéticos que se movem continuamente sob a forma de ondas senoidais (XAVIER *et al.*, 2014). As propriedades importantes do modelo senoidal são a frequência ( $f$ ) e o comprimento de ondas ( $\lambda$ ), sendo a equação da onda expressa pela equação 4:

$$V = f \cdot \lambda \quad [4]$$

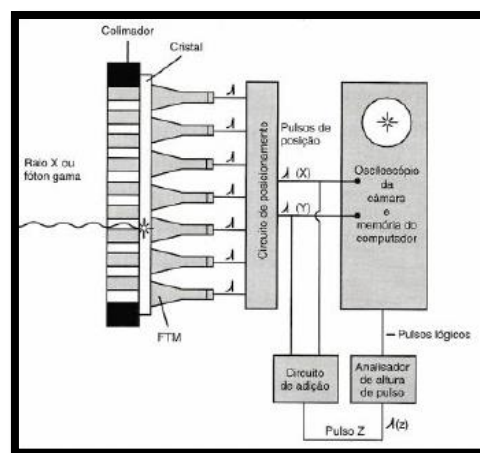
A energia dos raios gamas emitidos pelos diferentes núclídeos está, aproximadamente, na faixa de 0,03 – 3 MeV.

O diagnóstico em medicina nuclear é baseado, principalmente, em medidas não invasivas realizadas com fontes internas de radiação ionizante, utilizando detectores de radiação que permitem a medição do radionuclídeo aplicado ao paciente (DULLIUS, 2011). O desenvolvimento desse tipo de tecnologia subsidia-se no princípio básico de aplicação de radiofármacos para a obtenção de imagens diagnósticas (LYRA *et al.*, 2011). Em um exame *in vivo* de medicina nuclear, um radiofármaco é administrado ao paciente; em seguida, um instrumento de aquisição de imagens detecta a radiação, oriunda do decaimento do radionuclídeo, possibilitando o estudo da funcionalidade de um órgão ou a detecção precoce de tumores (FERREIRA *et al.*, 2011). Para o diagnóstico *in vitro*, o material é coletado, normalmente sangue, e se verifica a reação de contraste radioativo com as células neoplásicas e outras anomalias (SHARP *et al.*, 2005).

A cintilografia é um procedimento que permite identificar a emissão de uma radiação ionizante, através da conversão da radiação em luz (cintilação). A cintilografia inclui a cintilografia planar, a tomografia por emissão de fóton único (SPECT - *single-photon emission computed tomography*) e a tomografia por emissão de pósitron (PET – *positron emission tomography*) (ZAIDI, 2006). A SPECT é amplamente utilizada em MN, pois possibilita a obtenção de dados fisiológicos qualitativos para o diagnóstico por imagem (LYRA *et al.*, 2011).

A câmara de cintilação, geralmente, é composta por colimadores, que limitam o ângulo de aceitação da radiação incidente e define a distribuição espacial da radiação gama que chega até o cristal. Após o colimador encontra-se o cristal de cintilação, normalmente de iodeto de sódio enriquecido com tálio (NaI:TI). Atrás do cristal um guia de luz é opticamente acoplado aos tubos fotomultiplicadores (FMT), que convertem e multiplicam a luz da cintilação em sinal eletrônico. O sinal de saída é analisado e define a posição espacial (x, y) da radiação incidente, através do circuito de posicionamento. Outro circuito, chamado de circuito de adição, amplifica o pulso inicial; após essa amplificação o sinal atravessa um circuito que analisa a altura do pulso, ou seja, verifica a energia desse evento (ZAIDI, 2006).

A FIG.1 apresenta os componentes básicos de uma câmara de cintilação.



**FIGURA 1:** Esquema de uma câmara de cintilação (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Em equipamentos que contém o sistema tomógrafo existe um conjunto de engrenagens num suporte (*gantry*) onde os detectores são fixados, permitindo movimentos giratórios. O principal objetivo de sistemas tomógrafos é uma melhor definição dos detalhes da imagem (THRALL e ZIESSMAN, 2003). A SPECT-CT é uma técnica para obtenção de imagens tomográficas por meio da representação da distribuição



de um radiofármaco específico emissor de fótons gama com afinidade pelo órgão de interesse (LYRA *et al.*, 2011).

Além disso, muito frequentemente, os métodos em MN se associam bem a outros métodos já consagrados, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, complementando-os com informações funcionais. Os chamados SPECT-CT (tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada) e PET-CT (tomografia por emissão de pósitrons – tomografia computadorizada) são bons exemplos deste fato; neles se combinam, em um mesmo aparelho, um método anatômico (CT) com outro eminentemente funcional (SPECT ou PET) (WERLANG *et al.*, 2009).

Por estarem fundamentadas em preceitos fisiológicos, podemos afirmar que as imagens que se produzem em MN revelam principalmente condições funcionais do organismo (WERLANG *et al.*, 2009). Essas imagens também podem ser avaliadas em termos quantitativos para medir processos bioquímicos ou fisiológicos importantes na análise clínica (ZAIDI, 2006).

## **1.2.RADIOFÁRMACOS**

De acordo com a RDC nº 63 da ANVISA de 18 de dezembro de 2009, são denominadas como radiofármacos todas as preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos (isótopos radioativos); compreendem também os componentes não radioativos para marcação; além dos componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos. Além disso, é sabido que os mesmos quando utilizados para fins de diagnóstico ou terapia, geralmente, não provocam efeitos farmacológicos *in vivo*. A maioria dos radiofármacos é administrada por via endovenosa, por via oral ou por via aérea. Assim, os radiofármacos devem ser substâncias de natureza atóxica, estéreis e apirogênicas (EANM, 2009).

Os radiofármacos são produtos farmacêuticos compostos por dois componentes principais: um radionuclídeo, que fornece a radiação característica desejada, e uma molécula com biodistribuição conhecida, adequado para o comportamento fisiológico do radiofármaco (EANM, 2009). Decorrem desses componentes, as características específicas que determinam as propriedades de cada produto em particular (ABREU *et al.*, 2006).

O fármaco é o responsável pela biodistribuição do radiofármaco após a administração deste no paciente, permitindo a presença ou o acúmulo do radionuclídeo no órgão de interesse. A captação de radioatividade deve ser o mais específico possível,

a fim de minimizar a irradiação de outros órgãos. Isto é particularmente importante quando se utilizam radiofármacos para a terapia, devido à emissão de partículas alfa ou beta de alta energia. Porém, não é menos importante para os de diagnóstico, afinal, é desejável que o radiofármaco se acumule preferencialmente no órgão em estudo, já que a presença de radioatividade em áreas não requeridas pode obscurecer os detalhes estruturais das imagens dos órgãos em estudo (EANM, 2009).

A meia-vida ( $T_{1/2}$ ) de um radionuclídeo determina a sua taxa de decaimento radioativo. Se a meia-vida ( $T_{1/2}$ ) for muito curta, a atividade poderá decair para um nível muito baixo antes da obtenção da imagem. Por outro lado, se a meia-vida for muito longa, poderá haver a exposição excessiva do paciente à radiação (EANM, 2009). Dependendo das características dos radionuclídeos, os radiofármacos são usados para diagnóstico ou para terapia. Radiofármacos para diagnóstico decaem emitindo raios gama, no caso de SPECT, ou pósitrons, no caso de PET. Radiofármacos para terapia decaem emitindo partículas alfa ou beta, as quais podem causar danos radioativos em células e tecidos específicos (COUTO *et al.*, 2006).

### 1.3.TECNÉCIO-99-METAESTÁVEL

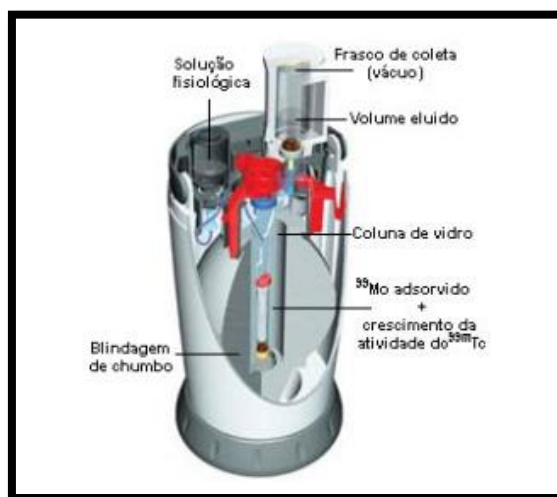
Alguns radionuclídeos que sofrem decaimento radioativo apresentam estados excitados intermediários com duração maior do que  $10^{-9}$  segundos, esses estados são chamados de estados metaestáveis, sendo indicados através da letra “m” logo após o número de massa, por exemplo, o tecnécio-99m, que é o nuclídeo filho do molibdênio-99. A transição do estado metaestável para o estado fundamental é isomérica porque não altera o número atômico (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

O crescimento do diagnóstico por imagem por meio da MN foi devido, principalmente, à descoberta de radioisótopos com tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) adequado e energia ideal, como o Tecnécio-99-metaestável ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Este radioisótopo é utilizado em mais de 80% de todos os procedimentos de diagnóstico *in vivo* em MN (MARQUES *et al.*, 2001). Um dos principais fatores para a disseminação do uso deste radioisótopo é a meia-vida ( $T_{1/2}$ ) curta, de apenas 6,02 h, e por ser um emissor de radiação gama pura com fótons de 140 keV (*kiloeletron volt*), ideal para a formação da imagem em medicina nuclear (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Além da meia-vida, outro fator determinante para a alta demanda do  $^{99m}\text{Tc}$  é a facilidade de obtenção. O  $^{99m}\text{Tc}$  pode ser obtido por meio de um gerador de Molibdênio/Tecnécio ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ) (Figura.2). O gerador possui uma vida útil de até duas

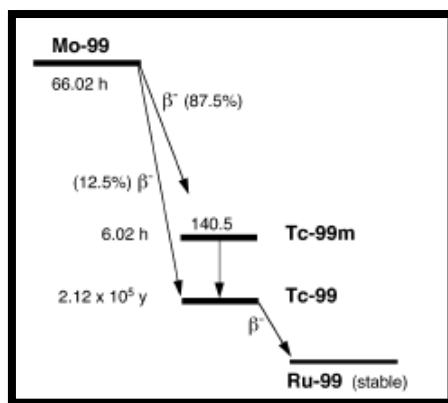
semanas e é disponibilizado, semanalmente, para as radiofarmácias brasileiras pelo órgão estatal responsável - IPEN/CNEN (ABREU *et al.*, 2006).

Um gerador de radionuclídeos é uma fonte de radionuclídeos para a preparação de radiofármacos. Baseia-se no princípio de que um radionuclídeo pai origina um radionuclídeo filho por decaimento (Figura.3), sendo este último removido por eluição com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, no qual o eluato resultante é usado para compor o radiofármaco, segundo a RDC nº 67 da ANVISA de 2007. O gerador mais comumente utilizado em MN é o gerador de molibdênio/tecnécio ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), o qual consiste em uma coluna de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) com  $^{99}\text{Mo}$  fortemente ligado, na forma de  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ , que por decaimento origina o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  na forma de pertecnetato de sódio ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) quando da eluição do gerador com uma solução salina estéril (SAHA, 2003).



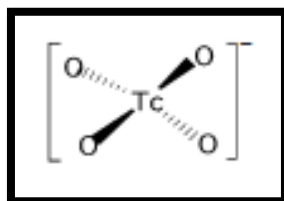
**FIGURA 2:** Gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  e componentes internos (ZOLLE, 2007)

Esse sistema de obtenção de radionuclídeos é economicamente vantajoso quando comparado aos de produção por meio de reatores nucleares ou cíclotrons, além de ser de mais fácil operação. Sempre que necessário, o radioisótopo de interesse pode ser produzido na própria radiofarmácia, enquanto os radioisótopos produzidos em reatores nucleares e cíclotrons geralmente possuem dias específicos para a produção, sendo necessário programar a compra e agendar os exames com maior antecedência (SAHA, 2003).



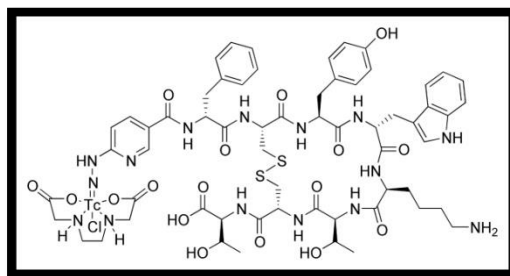
**FIGURA 3:** Diagrama do decaimento do radionuclídeo instável  $^{99}\text{Mo}$  ao radionuclídeo estável  $^{99}\text{Ru}$  (ZOLLE, 2007)

Devido aos seus múltiplos estados de oxidação e à sua química versátil, o tecnécio é capaz de produzir uma variedade de complexos com características desejáveis. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é utilizado em vários procedimentos diagnósticos, desde cintilografias de glândulas salivares, que utiliza apenas o produto diretamente eluído do gerador (o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertecnetato) (Figura.4) sem a necessidade de ser complexado a outro fármaco, até exames para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos, como é o caso do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Octreotide (Figura.5), um radiofármaco de estrutura mais complexa (IAEA, 2008).



**FIGURA 4:** Estrutura molecular do Ânion Pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) (ZOLLE, 2007)

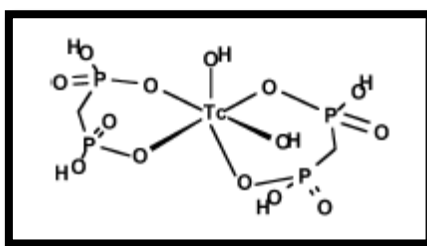
Há centenas de complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  úteis para procedimentos diagnósticos, dos quais mais de trinta são rotineiramente utilizados em MN (IAEA, 2008).



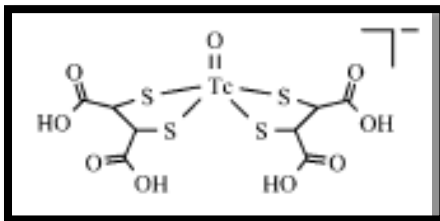
**FIGURA 5:** Estrutura molecular do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Octreotide (ZOLLE, 2007)

## 1.4.CONTEXTUALIZAÇÃO E PERSPECTIVAS ATUAIS DOS RADIOFÁRMACOS

Radiofármacos contendo  $^{99m}\text{Tc}$  podem ser classificados como sendo de primeira, de segunda ou de terceira geração, dependendo de seu nível de complexidade. A primeira geração de radiofármacos de tecnécio foi desenvolvida com base no metabolismo de absorção, distribuição e excreção dos complexos contendo esse radionuclídeo. As primeiras pesquisas conduziram à produção de radiofármacos para diagnóstico por imagem de tireoide com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , de fígado ( $^{99m}\text{Tc}$ -colóides), de esqueleto com  $^{99m}\text{Tc}$ -difosfonados (Figura.6), de rim com  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA (Figura.7) e de pulmão ( $^{99m}\text{Tc}$ -MAA) (IAEA, 2008).

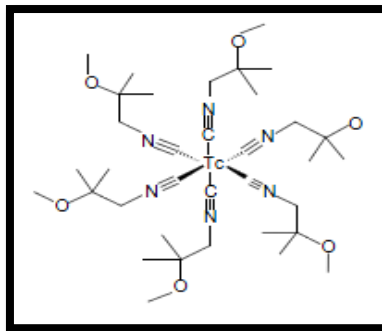


**FIGURA 6:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -Difosfonado (MDP) (ZOLLE, 2007)

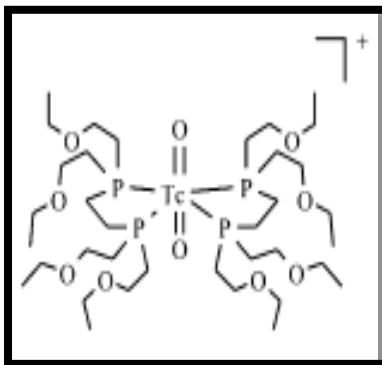


**FIGURA 7:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA (ZOLLE, 2007)

Os radiofármacos de segunda geração baseiam-se na correlação estrutura-atividade subjacente ao comportamento biológico dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  devido às propriedades físico-químicas como o tamanho, carga e lipofilicidade, sendo, principalmente, utilizados para a obtenção de imagens de perfusão do miocárdio, no caso de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (Figura.8) e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin (Figura.9), e do cérebro, no caso de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO (Figura.10) e  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD (Figura.11) (IAEA, 2008).

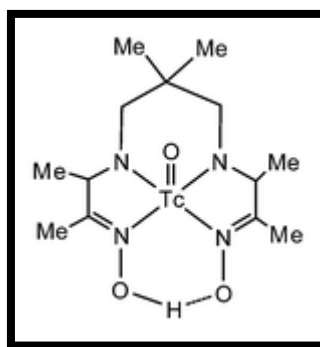


**FIGURA 8:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi (ZOLLE, 2007)

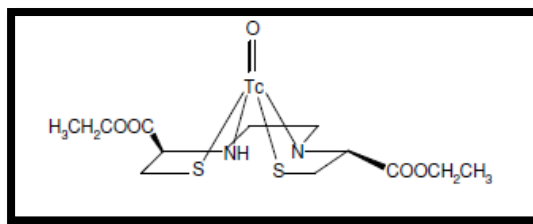


**FIGURA 9:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin (ZOLLE, 2007)

Atualmente, radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  são projetados para funcionar como vetores para distribuição de radioatividade em biomoléculas específicas, tais como receptores e transportadores. Os melhores exemplos de radiofármacos de terceira geração são o  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-EDDA-TOC ou  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Octreotide, desenvolvido como alternativa para o  $^{111}\text{In}$ -Octreotide e utilizado para imagens de tumores neuroendócrinos, e o  $^{99m}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (Figura. 12), utilizado para estudos de receptores cerebrais (IAEA, 2008).

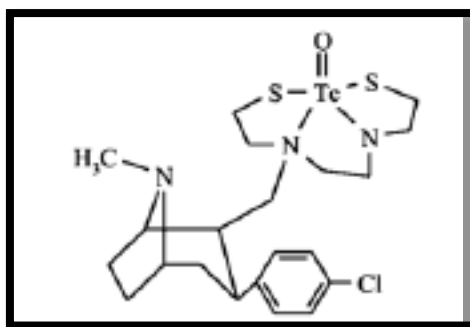


**FIGURA 10:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO (ZOLLE, 2007)



**FIGURA 11:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD (ZOLLE, 2007)

Os radiofármacos contendo  $^{99m}\text{Tc}$  para SPECT-CT mais utilizados nos serviços de MN e nas radiofarmácias hospitalares brasileiras são os kits de 2-metoxi-isobutil-isonitrila (MIBI), Ácido medrônico (MDP), Ácido pentético (DTPA), Ácido fítico (FITATO), Diidrocloreto de biscisato (ECD), Macro-agregado de albumina (MAA), Disofenina (DISIDA), Pirofosfato tetrassódico (PIROFOSFATO) e Dextrana 70 (DEXTRAN 70) (ARAÚJO,1995).

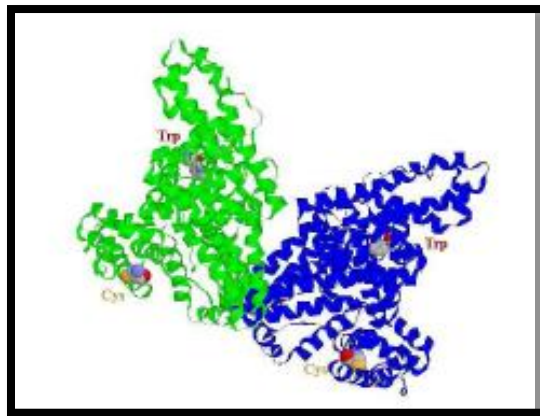


**FIGURA 12:** Estrutura molecular do  $^{99m}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (ZOLLE, 2007)

### 1.5.SORO ALBUMINA HUMANO (HSA)

O soro albumina humano (HSA) é a proteína de maior abundância no sangue, representando cerca de 60% das proteínas totais no plasma e na síntese hepática, com peso molecular de 66 a 69 kDa (ALMEIDA *et al.*, 2009). É sabido que o HSA desempenha função de transporte de metabólitos circulantes como ácidos graxos livres, aminoácidos, hormônios e metais pesados (cobre e zinco), além de drogas de abuso e fármacos (CHUANG *et al.*, 2002).

A Figura 13 mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de HSA, onde os resíduos de cisteína (Cys34) e triptofano (Trp214) aparecem representados como esferas. Dezesete pontes dissulfeto ajudam a manter a estrutura terciária (ALMEIDA *et al.*, 2009).



**FIGURA 13:** Estrutura quaternária do HSA com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque (ALMEIDA *et al.*, 2009).

A proteína liga-se ao tecnécio-99m após a redução deste pelo cloreto estano, de heptavalente para pentavalente (GARCIA *et al.*, 2006), constituindo assim um radiofármaco ( $^{99m}\text{Tc}$ -HSA) que é comumente utilizado como agente para determinação de alterações na circulação linfática, diagnóstico de linfedemas primários e secundários, além de aplicação clínica para testes das funções cardíacas (WANG *et al.*, 2007).

#### **1.6.MACRO-AGREGADO DE ALBUMINA (MAA)**

Após a realização dos estudos de biodistribuição desenvolvidos por George Taplin (TAPLIN *et al.*, 1964), o MAA foi introduzido na medicina clínica por James Quinn e Henry Wagner, (WAGNER *et al.*, 1964). O agente original  $^{131}\text{I}$ -MAA. Cabe resaltar que Wagner realizou o primeiro estudo humano em si mesmo (FREEMAN, 2014).

No início da década de 1970, com a aprovação do Food and Drug Administration (FDA), muitas indústrias farmacêuticas produtoras de radiofármacos (Squibb, New England Nuclear/Dupont, CIS/Syncor, Diagnostic Isotopes, Merck-Frost e DraxImage) iniciaram a produção e comercialização deste *cold kit* para marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  (FREEMAN, 2014). O Macro-Agregado de Albumina humana marcado com tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ -MAA) é o principal agente de perfusão para exames cintilográficos de rotina, amplamente empregado para o diagnóstico de embolia pulmonar por SPECT (PINSKY *et al.*, 1975; JOVANOVIC *et al.*, 1978); embora outros radionuclídeos como Gálio-68 também possam ser empregados para o mesmo propósito diagnóstico (GREGORY & MARK, 1989), contudo por meio de outra modalidade da medicina nuclear, a tomografia por emissão de pósitron (PET).

O  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA é utilizado para a aquisição de imagens de perfusão pulmonar para diagnóstico de diversas doenças, como embolias, enfisema, carcinoma brônquico e avaliação do grau de vascularização do parênquima pulmonar (BAJC *et al.*, 2010). Tem



sido também empregado para a análise da venografia e possível trombose de veias profundas nas extremidades inferiores (SAHA, 2003).

O  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA pode ser usado também para o estudo de patologias cardíacas e lesões valvulares e na localização radioguiada de lesão oculta, podendo ser administrado próxima à lesão tumoral para auxiliar a sua localização operatória. Após a administração intravenosa, as partículas de tamanho entre 10 e 100  $\mu\text{m}$  são depositadas proporcionalmente à capacidade de perfusão, nos capilares pulmonares e nas arteríolas pré-capilares. Pelo menos 60.000 partículas são necessárias para a produção de uma imagem de perfusão adequada referente a uma região pulmonar específica (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009).

Na prática clínica, aproximadamente 100.000 a 400.000 partículas são rotineiramente injetadas em pacientes adultos. O número de capilares ocluídos comparado ao total de capilares – cerca de 280 bilhões – é praticamente insignificante, enquanto que menos de 1% das arteríolas pré-capilares e artérias distributivas podem vir a ser ocluídas se partículas maiores que 150  $\mu\text{m}$  forem administradas, ocasionando embolismo pulmonar regional (SAHA, 2003). Como existem aproximadamente 300 milhões de arteríolas pré-capilares e bilhões de capilares pulmonares, uma pequena fração dos vasos pulmonares será ocluída (BAJC et al., 2010). Uma vez ocorrida a oclusão - o MAA é suficientemente frágil para promover uma micro-occlusão temporária - sendo evidenciado um aumento da pressão pulmonar arterial. Conforme recomendação não mais de 100.000 partículas para pacientes com hipertensão pulmonar, o número de partículas deve ser reduzido conforme a proporção da severidade da doença. Em crianças, o número de partículas é ajustado de acordo com o peso (SAHA, 2003). Em pacientes com *shunt* cardíaco da direita para a esquerda, as partículas de MAA podem induzir microembolização cerebral e, portanto, o número de partículas deve ser reduzido (BAJC et al., 2010).

Para uma distribuição uniforme, a suspensão de MAA deve ser administrada lentamente por injeção intravenosa, enquanto o paciente respira normalmente. As imagens cintilográficas do pulmão são obtidas imediatamente após a injeção em uma gama-câmara com colimadores de baixa energia. O paciente deve estar em decúbito dorsal, na posição supinada, para uma distribuição uniforme das partículas no pulmão, uma vez que em posição sentada uma maior parcela das partículas tendem a se localizar na porção inferior devido à gravidade, resultando, portanto, em uma distribuição desigual do radiofármaco no órgão (SAHA, 2003).

## 1.7. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO MAA

A aparência física de um radiofármaco é importante tanto para a análise farmacológica pré-marcação, quanto para a análise radioquímica após a reconstituição do liofilizado, uma vez que uma solução verdadeira não deve conter material particulado em suspensão. É de fundamental importância estar familiarizado com a cor e o estado específico de determinado radiofármaco, pois quaisquer modificações nesses parâmetros macroscópicos, como cor e transparência da solução, devem ser identificados pontualmente, uma vez que podem provocar modificações no radiofármaco e alterar o seu padrão de distribuição no organismo humano (SAHA, 2003).

Assim como as preparações coloidais, os agregados devem ter uma gama de tamanho de partículas adequada à sua finalidade. Em relação aos coloides, por exemplo, para a visualização do sistema retículo-endotelial, as partículas devem possuir um tamanho médio de 100 nm. Por outro lado, quando se trata de agregados radioquímicos como o  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA, o tamanho de partícula deve estar entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ , identificados por meio de equipamentos como o hemocitômetro sob microscopia de luz (SAHA, 2003). Preparações que contenham partículas maiores que 150  $\mu\text{m}$  devem ser descartadas, devido à possibilidade de oclusão massiva das artérias pulmonares (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009).

## 1.8. CARACTERÍSTICAS RADIOQUÍMICAS DO $^{99m}\text{Tc}$ -MAA

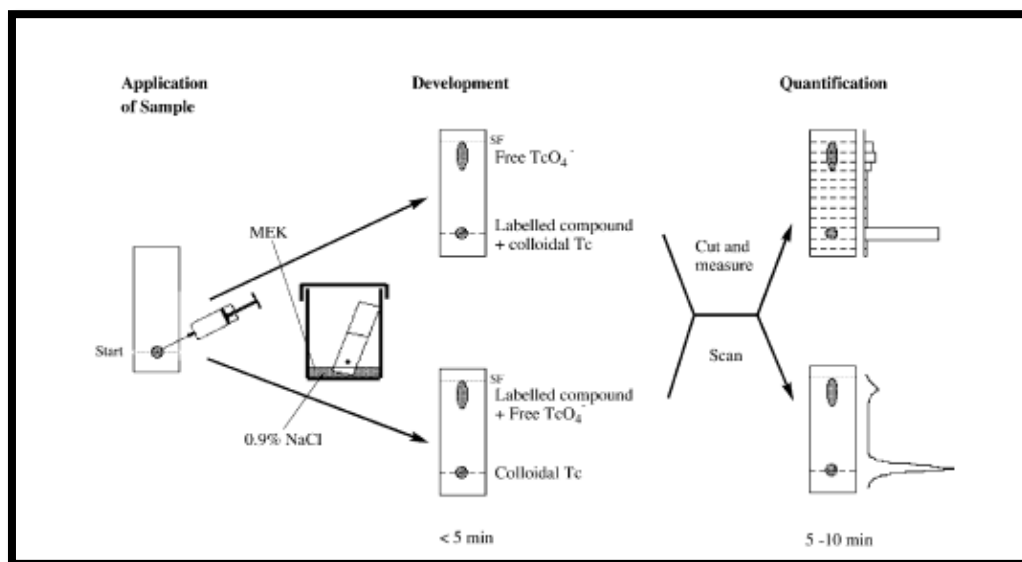
A preparação do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA por meio da reconstituição de conjuntos de reagentes liofilizados (*cold kits*) envolve, inicialmente, a estabilização da temperatura do frasco armazenado entre 2 a 8 °C para a temperatura ambiente, para que se possa reconstituir o liofilizado com a solução de pertecnetato  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Alguns *kits* requerem de 2 a 15 minutos de incubação para o processo de radiomarcção. A eficiência de marcação desse radiofármaco é equivalente a 90%. A estabilidade do radiofármaco após reconstituição é de 6 a 8 h, estando em temperatura ambiente ou, preferencialmente, a 2 ou 8 °C (SAHA, 2003).

Antes de retirar a dose especificada para o paciente, o conteúdo do frasco deve ser de agitados suavemente para homogeneizar a suspensão. Desse mesmo modo, a seringa contendo o radiofármaco deve ser homogeneizada suavemente antes da administração intravenosa desse radiofármaco. A dose injetada no paciente é equivalente a 2 ou 4 mCi (milicurie), o equivalente a 74 ou 148 MBq (megabecquerel). Pelo menos 95% da atividade administrada ao paciente fica retida no pulmão, sendo a meia vida efetiva para a depuração (*clearance*) pulmonar do MAA de aproximadamente 2 a 3 h. As partículas

são quebradas em partículas menores por meio dos movimentos mecânicos pulmonares e ação proteolítica enzimática, liberando os produtos da lise na circulação para posterior remoção destas por parte dos fagócitos no sistema retículo endotelial (SAHA, 2003). Os radiofármacos são produtos preparados a partir de *kits* industriais, porém apenas um percentual mínimo destes é entregue aos serviços de MN na sua forma pronta para uso. A manipulação dos radiofármacos, principalmente em hospitais, é, portanto, parte integrante do sistema pelo qual a qualidade desses produtos farmacêuticos é estabelecida (IAEA, 2008).

Para a determinação do grau de pureza radioquímica dos radiofármacos, diversas bibliografias descrevem a utilização da cromatografia em camada delgada (CCD ou ITLC, do inglês *Instant Thin Layer Chromatography*) (NORENBERG *et al.*, 2005; TSOPELAS *et al.*, 1996). A técnica de CCD tem sido o principal método empregado no controle de qualidade dos radiofármacos, por ser um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, mensurado pelo índice de retenção ( $R_f$ ) que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (IAEA, 2008).

A Figura 14 demonstra a determinação do grau de pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) usando diferentes solventes.



**FIGURA 14:** Esquema demonstrativo da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) para realização do controle radioquímico de radiofármacos (ZOLLE, 2007).

Para injeções de MAA marcada com tecnécio, segundo a Farmacopéia Americana (USP – 32), não menos de 90% do total de radioatividade é esperada na forma de  $^{99m}\text{Tc}$ -MAA. O método farmacopeico emprega dois métodos distintos:

- Sistema 1 - cromatografia ascendente: fase estacionária de papel cromatográfico (placa de 2,5 x 30 cm), e fase móvel contendo metanol/H<sub>2</sub>O diluída (7:10, v/v). O radiofármaco permanecerá no ponto de origem do sistema (Rf 0.0 – 1.0) e as impurezas presentes migrarão para a extremidade do sistema (Rf 0.7 – 1.0).
- Sistema 2 – centrifugação: aliquote uma porção do radiofármaco em um tubo de centrífuga, e centrifugue a 2000 rpm por 5 a 10 minutos. Separe o sobrenadante por aspiração e determine o percentual de radioatividade do sobrenadante em relação ao total de radioatividade. Não mais de 10% de impurezas radioquímicas dispersas são esperadas por esse método.

Segundo a Farmacopéia Britânica, não mais de 5% de impurezas radioquímicas são esperadas, em termos de pureza radioquímica. O método farmacopeico emprega dois sistemas cromatográficos:

- Sistema 1 - cromatografia ascendente: fase estacionária de sílica gel, e fase móvel de solução de metil-etil-cetona. Na corrida cromatográfica o radiofármaco deve percorrer de 10 a 15 cm em cerca de 10 minutos. O radiofármaco permanecerá no ponto de origem do sistema (Rf 0.0 – 1.0) e as impurezas presentes migrarão para a extremidade do sistema (Rf 0.7 – 1.0).
- Sistema 2 – cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de exclusão por tamanho: fase estacionária coluna de aço inoxidável de 0,6 x 7,5 mm de diâmetro interno empacotada com resina de sílica gel para exclusão por tamanho e fase móvel concentrada (1,12 g de diidrogenofosfato de potássio, 4,21 g de fosfato de hidrogênio dissódico, 1,17 g de cloreto de sódio e 0,10 g de azida de sódio em 100 mL de água). Solução teste, contendo 0,25 mL de fase móvel concentrada e 0,25 mL de amostra, carregada no injetor em *loop* que injeta 200 µL da solução em um fluxo de 0,6 mL/min por 48 minutos. O radiofármaco é detectado pelos detectores de radioatividade, e apresenta um cromatograma no qual 80% da radioatividade aplicada na coluna estará associada a 2 picos cromatográficos.

### **1.9. CARACTERÍSTICAS DE DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO <sup>99m</sup>Tc-MAA**

Por se tratar de um produto já descrito na literatura e em uso clínico, os dados de biodistribuição desse radiofármaco já são bem conhecidos. Cerca de 5 minutos após a injeção intravenosa, mais de 90% do <sup>99m</sup>Tc-MAA estão depositados nas arteríolas e capilares pulmonares. A seletividade do órgão em questão é um resultado direto do

tamanho de partícula do radiofármaco. Partículas entre 1 a 10  $\mu\text{m}$  são diretamente absorvidas pelo sistema retículo endotelial; partículas entre 10 a 150  $\mu\text{m}$  se depositam, por um processo puramente mecânico, nos capilares pulmonares (SAHA, 2003).

Em estudos de distribuição em tecidos de animais demonstram que a eliminação da albumina do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA dos pulmões ocorre com uma meia-vida física de cerca de 6,02 h. A eliminação do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA a partir dos pulmões humanos normais e anormais ocorre com uma meia-vida biológica de 10,8 h. A meia-vida eficaz foi estimada em 3,8 h para o pulmão. Estudos de excreção urinária cumulativa mostram uma média de cerca de 75% de eliminação da dose 24 h após a administração do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (USP PHARMACOPEIA, 2008).

#### **1.10. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS PARA PRODUÇÃO DO MAA**

O preparo meticuloso requer aquecimento controlado, ajuste de pH e resfriamento adequado para produção de quantidade apropriada de agregados particulados com tamanho entre 10 e 70  $\mu\text{m}$ , conforme especificações do FDA (FREEMAN, 2014). O processo de agregação é conduzido em pH ácido sob condições controladas, para obtenção de rendimentos produtivos de particulado. Geralmente, 2 mg de macroagregados correspondem a 1,5 – 2 milhões de partículas de MAA (ZOLLE, 2007).

#### **1.11. FORMULAÇÕES DE KITS FRIOS DE MAA DISPONÍVEIS NO MERCADO NACIONAL**

Em se tratando de um radiofármaco já descrito e com formulação conhecida e aplicada em diversos *kits* comerciais disponíveis no mercado nacional e internacional, o *kit* frio do radiofármaco MAA é apresentado na forma liofilizada contendo basicamente partículas de MAA e cloreto estanoso diidratado (SAHA, 2003). Todavia, é sabido que diferentes fabricantes adicionam a este produto outros excipientes inativos como acetato de sódio, albumina de soro humano (HSA), ácido succínico, glicose ou lactose entre outros com intuito de otimizar a formulação.

A Tabela 1 mostra as formulações dos principais produtos comercializados no mercado brasileiro.

**TABELA 1:** Formulação (composição química) dos principais *cold kits* comercializados no mercado nacional.

<b>Princípio Ativo / Excipientes</b>	<b>Pulmocis – IBA</b>	<b>Macro-Tec – IPEN</b>	<b>TechneScan - Mallinckrodt</b>
Macro-Agregado de Albumina	2 mg	2,2 mg	2 mg
Albumina	7 mg	X	0,5 mg
Cloreto Estanoso	0,2 mg	0,22 mg	0,12 mg
Cloreto de Sódio	8,7 mg	8,1 mg	X
Acetato de Sódio	X	22 mg	1,4 mg
Glicose	X	18,7 mg	X
Lactose	X	X	80 mg
Ácido Ascórbico	X	4,6 mg	X
Ácido Succínico	X	X	1,0g

### 1.12. MANUFATURA DO MAA

Macro-agregados são obtidos pela desnaturação de soro albumina humano (HSA). O procedimento básico de obtenção do MAA contempla a desnaturação proteica por aquecimento e subsequente processo de precipitação com ajuste de pH (HAMADA *et al.*, 1991); podendo também ser preparado pelo aquecimento, por 30 minutos a 80 – 90 °C, da mistura de Albumina do Soro Humano (HSA) e Cloreto Estanoso em tampão acetato pH 5 (ponto isoelétrico da albumina) (SAHA, 2003). Recentes experimentos empregaram métodos de aquecimento a 70°C, por 20 minutos, da mistura de albumina e cloreto estanoso em tampão acetato (pH 5,4) (HUNT *et al.*, 2005).

O MAA com tamanho de partícula entre 10 e 45 µm pode ser obtido a partir de HSA, por meio do tratamento térmico da solução alcalina da HSA e da acidificação desta a pH 5,2 (SAHA, 2003). Microesferas com tamanho de partícula entre 5 e 75 µm também podem ser produzidas pelo tratamento térmico da solução alcalina de HSA, pela desnaturação completa da solução (IAEA, 2008). Excipientes como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio são adicionados para o ajuste do pH. O frasco é selado sob uma atmosfera inerte de nitrogênio. Cada frasco contém cerca de  $8 \pm 4 \times 10^6$  partículas de

MAA. A forma das partículas é irregular e a faixa de tamanho está entre 10 e 90  $\mu\text{m}$ , sem conter partículas maiores que 150  $\mu\text{m}$ . O produto deve apresentar aproximadamente 90% das partículas com tamanho entre 10 e 40  $\mu\text{m}$ . As partículas são então lavadas com solução salina para remoção de íons de estanho livres, e ressuspensas em salina. O produto da ressuspensão é então particionado em alíquotas utilizando frascos para uso posterior como *kits* (SAHA, 2003).

Procedimentos para a obtenção do MAA para marcação com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foram inicialmente descritos por Taplin e colaboradores, em 1964. Desde então, diferentes abordagens metodológicas descritas em literatura (JOVANOVIC *et al.*, 1978; ROBBINS *et al.*, 1979; AL-JANABI *et al.*, 1983; AL-JANABI *et al.*, 1990; HAMADA *et al.*, 1991; HUNT *et al.*, 2005) foram empregadas para a manufatura deste radiofármaco.

O radiofármaco MAA é um dos agentes mais difíceis de preparar (FREEMAN, 2014). Com intuito de aprimorar a técnica e otimizar a produção de lotes do radiofármaco MAA, visando mitigar as dificuldades inerentes à manufatura deste produto, o qual sabidamente possui baixo rendimento de produção de lotes viáveis (de 10 a 30% dos lotes produzidos não atendem a especificação e devem ser descartados) (FREEMAN, 2014), o presente trabalho justifica-se por meio da proposição de uma melhoria de processo através de uma nova metodologia para obtenção do MAA.

### **1.13. ASPECTOS DE MERCADO DO MAA**

Um aspecto relevante se refere ao interesse mercadológico para a produção deste *cold kit* em âmbito nacional e posterior exportação do produto para países norte-americanos. As dificuldades de fabricação do produto, com os seus muitos lotes falhados e falta de rentabilidade em função de ser um radiofármaco relativamente barato, levaram progressivamente as indústrias farmacêuticas a descontinuarem este produto. Em 2011 a indústria farmacêutica Pharmalucence descontinuou a produção do radiofármaco MAA em virtude da baixa contagem de partículas oriundas dos lotes manufaturados. A Mallinckrodt, que manufatura e distribui o produto na Europa, descontinuou o fornecimento para os Estados Unidos por considerar um empreendimento de baixo rendimento. Atualmente manteve-se apenas um fornecedor do produto para o mercado norte-americano (DraxImage) e, conseqüentemente, os preços deste *cold kit* foram elevados (de U\$ 15 – U\$ 20 para U\$ 411 o frasco de produto liofilizado) ocasionando reflexos imediatos sobre o mercado norte-americano de medicina nuclear (FREEMAN, 2014).