



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E  
NUCLEARES

KETHYLLÉM MAYARA DE LIMA GONZALEZ CHAVES

**ANTIBIÓTICOS RADIOMARCADOS: potenciais agentes para o diagnóstico de  
processos infecciosos.**

Recife  
2020

**KETHYLLÉM MAYARA DE LIMA GONZALEZ CHAVES**

**ANTIBIÓTICOS RADIOMARCADOS: potenciais agentes para o diagnóstico de processos infecciosos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e na Medicina.

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

**Coorientadora:** Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

- C512a Chaves, Kethyllém Mayara de Lima Gonzalez.  
Antibióticos radiomarcados: potenciais agentes para o diagnóstico de processos infecciosos / Kethyllém Mayara de Lima Gonzalez Chaves. - 2020.  
76 folhas, il.; tab., abr. e sigl.
- Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.  
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2020.  
Inclui Referências, Apêndice e Anexo.
1. Engenharia Nuclear. 2. Radiodiagnóstico de infecção. 3. Antibióticos radiomarcados. 4. Cintilografia para infecção. I. Oliveira, Mércia Liane de (Orientadora). II. Guimarães, Fabiana Farias de Lima (Coorientadora). III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG/2022-97

KETHYLLÉM MAYARA DE LIMA GONZALEZ CHAVES

**ANTIBIÓTICOS RADIOMARCADOS: potenciais agentes para o diagnóstico de processos infecciosos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e na Medicina.

Aprovada em: 30/11/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Mércia Liane de Oliveira (Orientadora)  
Comissão Nacional de Energia Nuclear

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Mendonça de Albuquerque (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Juliana Batista da Silva (Examinador Externo)  
Comissão Nacional de Energia Nuclear

---

Dr<sup>a</sup>. Mariana Esposito Mendes (Examinador Externo)  
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Dedico este trabalho ao meu Deus, Jesus Cristo, por ensinar-me o caminho a seguir, guiando-me com seus olhos para finalização desta obra.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus Pai, que por meio do seu infinito amor e graça esteve comigo em todas as etapas deste curso, capacitando-me dia após dia e dando-me forças para suportar todo o processo. Glória.

Ao meu marido, Vinicius, por seu amor, compreensão, cuidado e companheirismo, por abdicar de alguns momentos para me ajudar sempre que foi preciso, por acreditar em mim e me tranquilizar dizendo: “não se preocupe meu amor, vai dar tudo certo.” Eu te amo minha vida.

À minha querida vó e a minha mãe, por me apoiarem e ficarem tão felizes com todas as minhas conquistas, por sempre demonstrarem orgulho e me incentivarem a conquistar novos horizontes. Minha eterna gratidão.

À Dra. Mércia Liane de Oliveira, pela orientação, pelo conhecimento transmitido com paciência e dedicação, pelas correções e sugestões e pela confiança que demonstrou ter no meu trabalho.

À Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães, pela oportunidade de tê-la como coorientadora, pelas contribuições e gentileza.

Aos doutores Ferdinand e Joelan, por terem se mostrado tão solícitos tornando este trabalho possível, meu muito obrigada.

Aos meus amigos do coração Cláudio e Islane, por compartilharem comigo tantos momentos e sentimentos, pelo apoio e incentivos constantes.

Aos amigos feitos na DIPRA, foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês. Em especial, Raquel e Osana, por terem ajudado na realização deste trabalho e por estarem presentes no meu dia a dia, tornando-os mais leves e confiantes.

Ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco e ao Centro Regional de Ciências Nucleares, pelo apoio institucional e oportunidade oferecida.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.” (ROMANOS, 11:36).

## RESUMO

Atualmente, segundo a Organização mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico precoce de processos infecciosos de origem bacteriana continua sendo um desafio na área médica, bem como a diferenciação entre processos inflamatórios assépticos e infecciosos. Sendo este último agravante de extrema importância para estabelecer um tratamento clínico ideal para o paciente. A Medicina Nuclear (MN) tem procurado auxiliar no diagnóstico e diferenciação desses processos, sendo considerada uma técnica precoce, segura e minimamente invasiva que utiliza agentes específicos para identificar diferentes doenças, incluindo infecção. Neste trabalho, os antibióticos Ciprofloxacina e Amoxicilina foram escolhidos para marcação ao Tecnécio-99m, devido ao amplo espectro de ação bacteriana associado a estes fármacos, onde o objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo de marcação com Tc-99m para diagnóstico de infecção bacteriana no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE). O planejamento fatorial foi a ferramenta estatística escolhida para tornar possível a otimização dos experimentos, diminuindo o número de repetições, custos e exposição as radiações ionizantes, onde a partir da definição de três variáveis principais (antibiótico, redutor e antioxidante), estabeleceram-se duas formulações de sínteses ideais, uma para cada radiofármaco testado. Estes complexos foram facilmente radiomarcados por meio da adição de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) em cada preparação, utilizando uma atividade máxima de 1mCi. Os radiofármacos sintetizados permaneceram estéreis, apresentando uma eficiência de marcação superior a 90%, estando de acordo com os compêndios oficiais para preparações radiofarmacêuticas complexadas ao tecnécio. A atividade microbiológica de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AMOX, avaliada por meio de internalização bacteriana a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mostrou que os antibióticos radiomarcados foram capazes de reconhecer tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, sugerindo preservação do amplo espectro de atividade mesmo após a marcação, alcançando uma alta taxa de ligação de aproximadamente 50%, durante 2h. Desta maneira, os resultados obtidos sugerem que  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AMOX poderiam ser utilizados para identificar focos inflamatórios e infecciosos além de diferenciar sítios assépticos de sépticos.

**Palavras-chave:** radiodiagnóstico de infecção; antibióticos radiomarcados; cintilografia para infecção.

## ABSTRACT

Currently, according to the World Health Organization (WHO), the early diagnosis of bacterial infectious processes remains a challenge in the medical field, as well as the differentiation between aseptic and infectious inflammatory processes, that is extremely important to establish an ideal clinical treatment for the patient. The Nuclear Medicine (MN) has tried to assist in the diagnosis and differentiation of these processes, being considered an early, safe and minimally invasive technique that uses specific agents to identify different diseases, including infection. In this work, Ciprofloxacin and Amoxicillin antibiotics were chosen for radiomarking the technetium-99m due to the broad spectrum of bacterial action associated with these drugs, and the objective of this work was to standardize a Tc-99m radiomarking protocol for diagnosis of bacterial infection at the Regional Center for Nuclear Sciences of the Northeast (CRCN-NE). The factorial design was the statistical tool chosen to make possible the optimization of the experiments, reducing the number of repetitions, costs and exposure to ionizing radiation, in which by the definition of three main variables (antibiotic, reducer and antioxidant), two ideal synthesis formulations were established, one for each radiopharmaceutical tested. These complexes were easily radiolabeled by adding sodium pertechnetate ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) to each preparation, using a maximum activity of 1mCi. The synthesized radiopharmaceuticals remained sterile, presenting a labeling efficiency greater than 90%, in accordance with the official compendiums for radiopharmaceutical preparations complexed to technetium. The microbiological activity of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIPRO and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AMOX, assessed through bacterial internalization to strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, showed that radiolabeled antibiotics were able to recognize both Gram-positive and Gram-negative bacteria, suggesting preservation of the broad activity spectrum even after marking, reaching a high connection rate of approximately 50% for 2 hours. Thus, the results obtained suggest that  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIPRO and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AMOX could be used to identify inflammatory and infectious foci in addition to differentiating aseptic from septic sites.

**Keywords:** radiodiagnosis infection; radiolabeled antibiotics; scintigraphy for infection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da formação dos radiofármacos	19
Figura 2 -	Ilustração da diferenciação de aquisição PET e SPECT	21
Figura 3 -	Esquema de decaimento do $^{99}\text{Mo}$ a $^{99}\text{Tc}$	22
Figura 4 -	Sistema representativo do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	23
Figura 5 -	Esquema de obtenção dos radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por processo de marcação	24
Figura 6 -	Biodistribuição dos quatro radiofármacos mais utilizados na clínica para diagnóstico de inflamação/infecção	27
Figura 7 -	Função dos diferentes grupos de ciprofloxacina e estrutura química: (1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-(1-piperazínil)-3-ácido quinolina carboxílico)	37
Figura 8 -	Estrutura dos núcleos de tecnécio, em sequência, dois núcleos oxo e um núcleo nitreto, complexados ao $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{v})$ . "L" representa os ligantes que coordenam com os núcleos de tecnécio para formar o ápice da estrutura e o oxigênio ou nitrogênio do núcleo f	37
Figura 9 -	Interação bidentada de fluoroquinolona com tecnécio. Estruturas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacina são mostradas usando núcleos $\text{TcO}_3^+$ e $\text{TcN}_2^+$	38
Figura 10 -	Imagens de infecção por sepse; onde na tíbia esquerda e no ombro direito são visualizados um aumento moderado ou grave da captação de Infecton	39
Figura 11 -	A) Amoxicilina; B) Estrutura proposta para amoxicilina marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ; C) Outra estrutura potencial para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -amoxicilina; D) Estrutura de cristal de um antibiótico $\beta$ -lactâmico semelhante (cloxacilina) ligado a peptidoglicano; E) Mecanismo de ligação da amoxicilina a um peptidoglicano	41
Figura 12 -	Incorporação do cloreto estano diidratado ao HCl 0,1N sob atmosfera de nitrogênio adaptada	46
Figura 13 -	Fluxograma das etapas de radiomarcagem de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AMOX	47
Figura 14 -	Esquema representativo de purificação por filtração: 1) Aspiração da amostra com seringa e agulha; 2) Retirada da	48

agulha e acoplamento do filtro à seringa; 3) Certificação que o filtro está bem encaixado; e 4) Filtração

Figura 15 -	Representação ilustrativa do sistema cromatográfico	49
Figura 16 -	Kit BioBall® MultiShot 550	51
Figura 17A -	Cromatograma referente ao radiofármaco 99mTc-CIPRO	57
Figura 17B -	Cromatograma referente ao radiofármaco 99mTc-AMOX	57
Figura 18 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “antibiótico” utilizada para aumento da % EM do antibiótico Ciprofloxacina	58
Figura 19 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “redutor” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Ciprofloxacina	58
Figura 20 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “antioxidante” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Ciprofloxacina	59
Figura 21 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/redutor para marcação da Ciprofloxacina	59
Figura 22 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis redutor/antioxidante para marcação da Ciprofloxacina	60
Figura 23 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/antioxidante para marcação da Ciprofloxacina	60
Figura 24 -	Teste ANOVA para Ciprofloxacina	61
Figura 25 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “antibiótico” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina	61
Figura 26 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “redutor” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina	62
Figura 27 -	Gráfico de análise do efeito principal da variável “antioxidante” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina	63
Figura 28 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/redutor para marcação da Amoxicilina	63
Figura 29 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis redutor/antioxidante para marcação da Amoxicilina	64
Figura 30 -	Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/antioxidante para marcação da Amoxicilina	64
Figura 31 -	Teste ANOVA para Amoxicilina	65
Figura 32 -	Ligação in vitro de 99mTc-CIPRO a S. aureus e P. aeruginosa	66
Figura 33 -	Ligação in vitro de 99mTc-AMOX a S. aureus e P. aeruginosa	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características físicas dos radionuclídeos utilizados no diagnóstico de inflamação/infecção.	26
Tabela 2 -	Valores atribuídos as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial de $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.	44
Tabela 3 -	Matriz de planejamento do experimento fatorial $2^3$ , com ponto central, para $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.	45
Tabela 4 -	Matriz do experimento fatorial $2^3$ para $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX com resultado final.	53
Tabela 5 -	Atividades mensuradas por activímetro e radiocromatógrafo durante a reprodução das sínteses de $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al <sup>3+</sup>	Óxido de alumínio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β <sup>+</sup>	Pósitron
β <sup>-</sup>	Beta/elétron
CRCN/NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CCD	Cromatografia de camada delgada
DOE	Experimental design
<i>et al.</i>	e outros
EP	Farmacopeia europeia
EM	Eficiência de marcação
<sup>18</sup> F	Flúor-18
F <sup>18</sup> -FDG	Fluorodesoxiglucoose complexada ao Flúor-18
FSA	Formamidina
<sup>67</sup> Ga/ <sup>68</sup> Ga	Gálio
HMPAO	Hexametilpropilenoamino oxima
HCl	Ácido clorídrico
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
In-111	Índio-111
keV	Quiloelétron-volt
Kit	Pó liofilizado
LET	Transferência Linear de Energia
Mo-99	Molibidênio-99
<sup>99m</sup> MO/ <sup>99m</sup> Tc	Molibidênio/Tecnécio
<sup>99</sup> MO <sup>2-</sup> <sub>4</sub>	Molibdato
MN	Medicina Nuclear
Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	Pertecnetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
<sup>18</sup> O	Oxigênio

pH	Potencial hidrogeniônico
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PDIE	Divisão de Pesquisa, Desenvolvimento, Inovação e Ensino
PBS	Tampão de fosfato salino
PC	Ponto central
$R_f$	Fator de retenção
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto estanoso diidratado
$^{99m}\text{Tc}$	Tecnécio-99-metaestável
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio livre
$^{99m}\text{TcO}_2$	Tecnécio hidrolisado
TSB	Caldo de caseína e soja
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
$\text{TcO}_3^+ \text{TcO}_2^+$	Núcleo de tecnécio (V)-oxo
$\text{TcN}^{2+}$	Núcleo de nitreto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USP	Farmacopeia americana
$^{235}\text{U}$	Urânio
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
$^{68}\text{Zn}$	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	MEDICINA NUCLEAR.....	19
<b>2.1.1</b>	<b>Aplicações do <sup>99m</sup>Tc na MN.....</b>	<b>21</b>
2.1.1.1	Vias de obtenção do <sup>99m</sup> Tc.....	22
2.1.1.1.1	Química do <sup>99m</sup> Tc.....	23
2.2	INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO.....	24
2.3	IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE INFLAMAÇÃO /INFECÇÃO.....	25
2.4	RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO/INFLAMAÇÃO.....	26
<b>2.4.1</b>	<b>Gálio (<sup>67</sup>Ga).....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Fluordesoxiglicose (2-desoxi-2-18Flúor-D-glicose) (<sup>18</sup>F- FDG).....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Leucócitos radiomarcados <i>in vitro</i>.....</b>	<b>31</b>
2.4.3.1	Leucócitos radiomarcados índio-111- oxina ( <sup>111</sup> In-oxima).....	31
2.4.3.2	Leucócitos radiomarcados tecnécio-99m-HMPAO ( <sup>99m</sup> Tc-HMPAO).....	33
<b>2.4.4</b>	<b>Antibióticos radiomarcados.....</b>	<b>35</b>
2.4.4.1	<sup>99m</sup> Tc-Ciprofloxacina ( <sup>99m</sup> Tc- CIPRO).....	36
2.4.4.2	<sup>99m</sup> Tc-Amoxicilina ( <sup>99m</sup> Tc- AMOX).....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	MATERIAIS.....	43
3.2	MÉTODOS.....	44
<b>3.2.1</b>	<b>Planejamento Fatorial.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Radiosíntese de <sup>99m</sup>Tc-CIPRO e <sup>99m</sup>Tc-AMOX.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Determinação da eficiência de marcação (%EM).....</b>	<b>47</b>
3.2.3.1	Determinação do percentual de <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> .....	48
3.2.3.2	Determinação do percentual de <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .....	49
<b>3.2.4</b>	<b>Teste de esterilidade.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Ressuspensão do Bioball.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Internalização bacteriana <i>in vitro</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO.....	53
4.2	ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	57

4.3	ESTERILIDADE .....	65
4.4	INTERNALIZAÇÃO BACTERIANA .....	65
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS...</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da saúde pública mundial, principalmente em países subdesenvolvidos, é o aumento da morbidade e a alta incidência de pessoas acometidas por quadros de infecção bacteriana, além da dificuldade relacionada a diferenciação entre infecção e inflamação estéril. Estes fatores elevam os empenhos e os custos direcionados para o diagnóstico e terapia dos pacientes (TOUAT *et al.*, 2019; AULETTA *et al.*, 2016).

Um outro agravante está associado ao aumento significativo da resistência microbiana a inúmeras classes de antibióticos utilizados na clínica, relacionada a automedicação. Isto limita a eficácia da maioria dos fármacos comercializados e dificulta a conduta clínica para estabilização e/ou erradicação de doenças infecciosas (NAQVI *et al.*, 2018).

Processos inflamatórios e infecciosos apresentam-se de forma sintomatológica semelhante. A inflamação pode ser definida como uma reação localizada na microcirculação do organismo, proveniente de algum tipo de dano tecidual. Este dano desencadeia o transporte de leucócitos e fluídos do sangue para o meio extracelular, por meio de mediadores, dando início aos sintomas cardinais da inflamação. A infecção se caracteriza quando a inflamação é originada no organismo por meio de microrganismos como bactérias, vírus, fungos, protozoários (CHEN *et al.*, 2017; ANDRADE, 2017).

Atualmente diferentes técnicas de imagens têm sido utilizadas em radiologia e medicina nuclear (MN), como por exemplo a radiomarcagem de células leucocitárias, considerada em muitos países como “padrão ouro” para diagnóstico de infecção. Todavia, nenhuma das técnicas usuais mostraram-se eficazes na diferenciação entre processos infecciosos e processos inflamatórios estéreis, bem como na especificação do patógeno envolvido (AULETTA *et al.*, 2016; AHMED *et al.*, 2019).

Antibióticos, como a Ciprofloxacina e a Amoxicilina que apresentam ligação específica a bactérias, podem ser associados a traçadores radiativos, como o tecnécio-99-metaestável ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Estes novos compostos podem proporcionar avanços na identificação, diferenciação, determinação da conduta

terapêutica e no acompanhamento do tratamento em pacientes acometidos por quadros de infecção (HARRIS *et al*, 2019; LOUREIRO *et al*, 2016).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi implementar um protocolo otimizado para radiomarcção de antibióticos no CRCN/NE. Diante do exposto, se fará necessário:

- Definir os protocolos de radiomarcção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX, a partir das análises das sínteses realizadas por meio do planejamento fatorial;
- Estabelecer procedimentos para quantificação da eficiência de marcação e demais testes de controle de qualidade;
- Comprovar a eficácia dos radiofármacos por meio de internalização a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

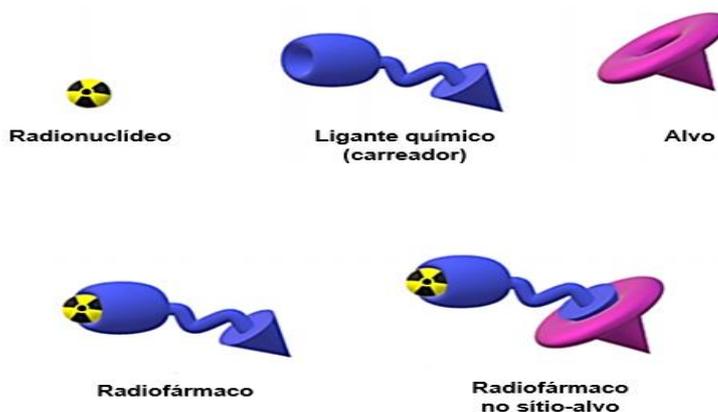
Como embasamento teórico, a seguir são detalhados temas correlacionados com a presente dissertação, a fim de permitir melhor compreensão acerca do assunto.

### 2.1 MEDICINA NUCLEAR

A MN é uma especialidade médica com finalidade diagnóstica e terapêutica, segura e não invasiva, capaz de fornecer informações fisiológicas e metabólicas de órgãos e tecidos por meio da administração de traçadores radioativos (DIAS, 2015; SILVA, 2017; BOSCHI, *et al.*, 2019). Estes traçadores são denominados radiofármacos, “preparações farmacêuticas com ação farmacológica mínima que, enquanto retidos no corpo podem ser detectados fornecendo informações sobre a área estudada, proporcionando o mapeamento e aquisição de imagens”, segundo definem as resoluções da Anvisa RDC 38/2008 e RDC 301/2019 IN nº 37.

Os radiofármacos são compostos por um fármaco e um radionuclídeo e, quando administrados, seguem rotas metabólicas ou funcionais do organismo vivo, se depositando nos locais pelos quais há predileção específica, o que permite a realização de exames radiodiagnósticos, acompanhamento evolutivo de tratamentos e terapia (ROBILOTTA, 2006). Na Figura 1 é possível visualizar o esquema de formação dos radiofármacos.

Figura 1 - Representação da formação dos radiofármacos.



Fonte: Modificado de Boschi *et al.* (2019).

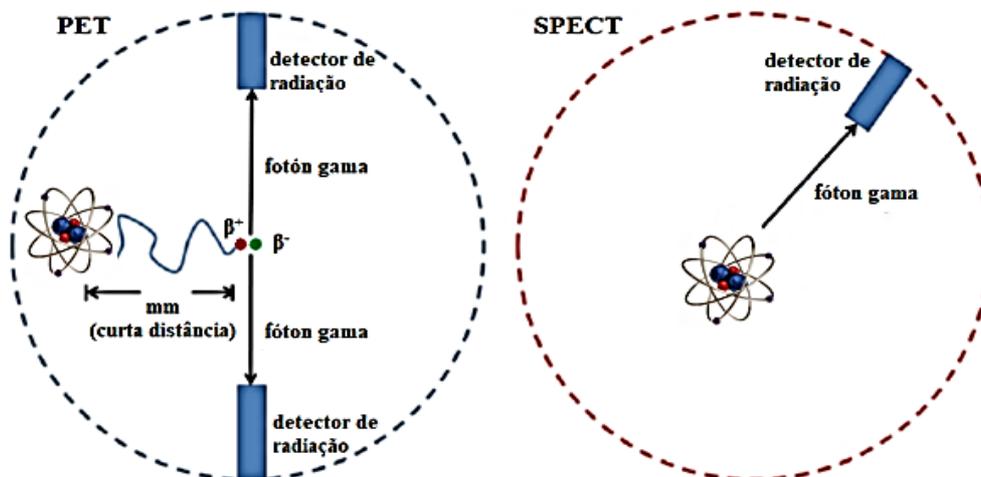
A utilização de medicações radiofarmacêuticas, assim como qualquer outra medicação, está sujeita a regulamentações. Por serem substâncias injetáveis devem ser estéreis, livres de elementos pirógenos e aprovados em ensaios de controles de qualidade. As características físico-químicas do fármaco determinam a fixação no tecido ou órgão em estudo, além da metabolização e eliminação, enquanto que as características físicas do radionuclídeo, tais como tempo de meia vida física e tipo de radiação emitida, determinarão a indicação diagnóstica ou terapêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SAHA, 2010).

Apesar de também ser indicada para terapia curativa, a MN contribui predominantemente no diagnóstico de doenças, sobressaindo-se aos métodos radiológicos convencionais, tais como raios X, tomografia computadorizada, ressonância magnética, além de métodos ultrassonográficos. Isto se dá pela capacidade de identificar precocemente processos patológicos que provavelmente só seriam identificados posteriormente pela radiologia convencional. Neste caso, estas técnicas convencionais fornecem informações baseadas nas alterações anatômicas resultantes dos estágios avançados relacionados a doença (ARAÚJO *et al.*, 2008; SILVA, 2017; REILLY, 2019).

Após a administração do radiofármaco ao paciente, a detecção da radioatividade presente no organismo é realizada utilizando um conjunto de detectores cintiladores, presentes em equipamentos tomográficos, que podem ser do tipo: tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou tomografia por emissão de pósitrons (PET) (KUBO, 2016; SILVA, 2017).

Estes métodos de aquisição de imagens se diferenciam principalmente pelo tipo de radionuclídeo complexado ao fármaco que será utilizado, resultando na detecção diferenciada da radiação emitida, como mostrado na Figura 2. Em equipamentos do tipo SPECT são utilizados radionuclídeos emissores de fóton único, ou seja, radionuclídeos que emitem um fóton gama por cada decaimento radioativo. Nos equipamentos do tipo PET, são utilizados radionuclídeos emissores de pósitrons; estes pósitrons percorrerão uma curta distância se aniquilando com elétrons presentes no meio, dando origem a dois fótons (com energia de 511 keV cada), propagando-se em sentido opostos (REIS, 2012; KUBO, 2016).

Figura 2 - Ilustração da diferenciação de aquisição PET e SPECT.



Fonte: Modificado de Xu et al. (2011).

Estes equipamentos detectam a radiação e determinam, baseados em coordenadas, sua origem e intensidade, convertem essas informações em sinais elétricos e direcionam esses dados para sistemas computacionais. Posteriormente, em monitores, as imagens são visualizadas e se faz possível classificá-las em áreas de alta atividade e áreas de baixa atividade, de acordo com a maior ou menor captação do radiofármaco na área em estudo (ZIESSMAN *et al.*, 2014).

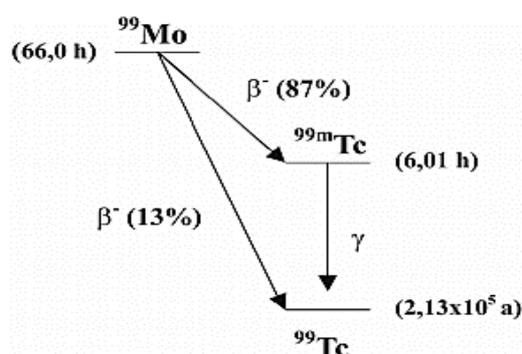
### 2.1.1 Aplicações do $^{99m}\text{Tc}$ na MN

Atualmente o  $^{99m}\text{Tc}$  é o radionuclídeo mais utilizado em MN para realização de imagens diagnósticas SPECT, associado a aproximadamente 80% dos procedimentos. Isto ocorre principalmente devido à sua alta disponibilidade, facilidade de obtenção e baixo custo associado, comparado a outros radionuclídeos. Possui características físicas e químicas apropriadas, tais como: tempo de meia-vida relativamente curto (6 horas); decaimento gama puro e baixa energia (140 keV), podendo atingir vários estados de oxidação e de coordenação, possibilitando sua ligação aos diferentes fármacos (OLIVEIRA, 2006; COSTA, 2019; BOSCHI, 2019).

### 2.1.1.1 Vias de obtenção do $^{99m}\text{Tc}$

O  $^{99m}\text{Tc}$  é um radionuclídeo derivado do decaimento do Molibdênio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), sendo geralmente obtido por meio de um gerador portátil ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ) sob a forma de pertecnetato-99m, como mostrado na Figura 3. O  $^{99}\text{Mo}$ , denominado radionuclídeo pai, possui meia vida-física de 66 horas, decaindo por emissão beta ( $\beta^-$ ), e é obtido em reatores nucleares, por meio de fissão em alvos de urânio-235 ( $^{235}\text{U}$ ) altamente enriquecidos (ROSS, 2015; BOSCHI, 2017).

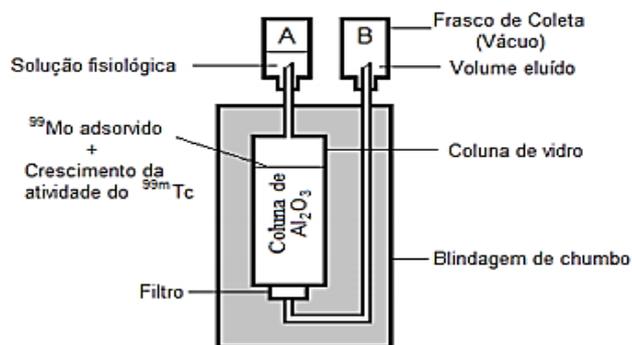
Figura 3 - Esquema de decaimento do  $^{99}\text{Mo}$  a  $^{99}\text{Tc}$



Fonte: MARQUES et al. (2001).

Por meio de uma coluna cromatográfica, envolta em óxido de alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ), as espécies advindas do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (pertecnetato metaestável ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ); pertecnetato ( $^{99}\text{TcO}_4^-$ ); íons  $\text{Al}^{3+}$ ; Molibdato ( $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ) e compostos de tecnécio com outros estados de oxidação) são separadas. No processo de eluição, o  $^{99}\text{Mo}$  (sob a forma de Molibdato,  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ), fica retido na coluna, enquanto o pertecnetato metaestável e seu isômero em estado fundamental, que apresentam menos afinidade pela coluna, são facilmente eluídos por meio da passagem de solução fisiológica em frascos a vácuo.

Antes da preparação dos radiofármacos se faz necessário realizar testes de controle de qualidade do eluato produzido, a fim de identificar e quantificar possíveis impurezas, como níveis elevados de íons de  $\text{Al}^{3+}$ ,  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  e espécies de pertecnetato com estado de oxidação indesejáveis (MARQUES *et al.*, 2001; BOSCHI, 2019). O sistema do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 - Sistema representativo do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Fonte: ANDRADE (2012).

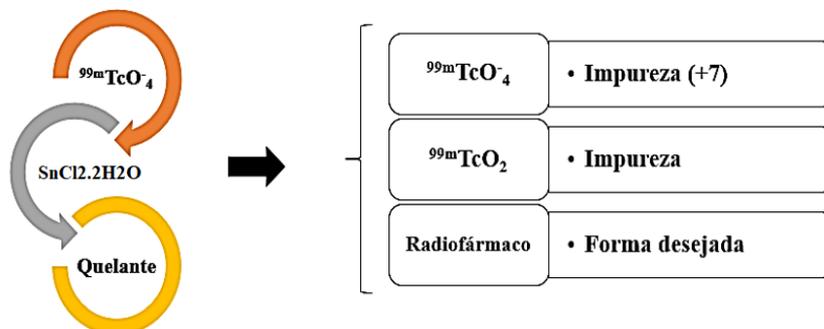
#### 2.1.1.1.1 Química do $^{99\text{m}}\text{Tc}$

O elemento químico Tecnécio ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), de número atômico 43, é um metal localizado no grupo 7 (7B) da tabela periódica. Por ser um metal de transição, existe em vários estados de oxidação (-1 a +7), apresentando configurações eletrônicas distintas. O eluato de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está no estado de oxidação mais estável (+7), não reativo. Desta forma, para fins de radiomarcagem a fármacos se faz necessário a redução deste elemento a níveis mais baixos de oxidação. Nos últimos anos, vários foram os esforços em busca de um agente redutor ideal, sendo atualmente o cloreto estanoso dihidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) é o redutor mais utilizado em sínteses de radiofármacos complexados a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (SHAHZADI *et al.*, 2015; BOSCHI, 2019).

Geralmente os componentes envolvidos na síntese de radiofármacos marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  são:  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , um agente redutor e um ligante. Para constituição de radiofármacos, o pertecnetato é reduzido a níveis mais baixos de oxidação e em seguida é complexado ao ligante/quelante. Ou seja, após o pertecnetato ser oxireduzido, vacâncias são formadas em sua órbita, deixando-o reativo para se ligar aos pares de elétrons dos ligantes/quelantes (COSTA, 2019), formando complexos que podem ser utilizados para fins radiodiagnósticos por meio de imagens cintilográficas. Após a síntese são obtidos no mínimo três formas químicas: radiofármaco, tecnécio hidrolisado ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) e  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  livre. Na Figura 5, são mostradas as espécies de tecnécio formadas e sua respectiva oxiredução, sendo  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  indesejada nas preparações, uma vez que altos percentuais dessas impurezas podem prejudicar a qualidade do radiofármaco e

formar moléculas marcadas que interferem na biodistribuição e na imagem (VEIGA, 2013; COSTA, 2019).

Figura 5 - Esquema de obtenção dos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  por processo de marcação



Fonte: A autora (2020).

## 2.2 INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma reação de defesa do organismo a algum tipo de dano tecidual, ocasionados por diversos fatores, tais como: imunológicos (alergias, alimentação), físicos (cortes, insolação, trauma, radiação), químicos (substâncias corrosivas, tóxicas, agentes irritantes) e endógenos (CHEN *et al*, 2018).

A resposta inflamatória tem por objetivo proteger o organismo por meio de diluição, destruição ou neutralização de agentes prejudiciais ao organismo, sendo responsável por estimular eventos que curam e reparam os sítios de lesão celular. Sem inflamação, as infecções avançariam sem controle e, em nenhum momento as feridas cicatrizariam (ROBBINS, 2013; ABDULKHALED *et al*, 2018).

No entanto, quando a inflamação ocorre no organismo devido a presença de microrganismos, denomina-se infecção, esta por sua vez, necessita obrigatoriamente da presença de um patógeno envolvido, como bactérias, fungos, vírus, protozoários. Esta contaminação pode ocorrer por rompimento epitelial, inalação, ingestão ou transmissão sexual. Normalmente a resposta inflamatória atua contra os microrganismos contribuindo para regeneração da área lesada, reparo e cicatrização. No entanto, dependendo do patógeno atuante e da imunidade do indivíduo acometido pela infecção a resposta inflamatória pode se apresentar ineficaz (DIAS, 2015; ABDULKHALED *et al*, 2018).

Continuamente um dos grupos de microrganismos que se destaca como sendo o principal causador de doenças infecciosas são as bactérias que constituem a microbiota humana, onde geralmente, em condições normais, devido a sua baixa virulência, não oferecem riscos à saúde. No entanto podem causar sérias complicações em pessoas com quadros clínicos comprometidos e imunodeprimidas (DIAS, 2015; LAKHUNDI, ZHANG, 2018).

Dentre as principais bactérias oportunistas causadoras de infecções em hospedeiros humanos, segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), encontram-se as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (OMS, 2017). Esses agentes microbianos são considerados desafiadores na área médica devido à alta incidência hospitalar, disseminação e resistência medicamentosa. Normalmente essas bactérias estão presentes na água, no solo ou na microbiota, transitando nos indivíduos em comensalismo e, quando existem lesões ou falha no sistema imunológico aproveitam-se do hospedeiro trazendo-os complicações (DUIJKEREN *et al.*, 2018; JANG *et al.*, 2017 (b); POOLMAN, ANDERSON, 2018).

### 2.3 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE INFLAMAÇÃO /INFECÇÃO

A diferenciação entre processos inflamatórios e processos infecciosos é de extrema importância para estabelecer a conduta clínica ideal a ser adotada para o paciente, evitando desta forma que o quadro infeccioso evolua para estágios mais graves como por exemplo sepse (DIAS, 2015; PATEL *et al.*, 2019).

Existindo suspeitas de infecção, no processo de investigação da doença, exames laboratoriais microbiológicos são requeridos, indicando ou excluindo a presença de agentes bacterianos no organismo, bem como identificando o patógeno envolvido. No entanto, estas técnicas são limitadas, uma vez que nem sempre conseguem identificar a localização exata dos sítios de inflamação/infecção para obtenção de amostras para cultura ou a biopsia pode ser muito invasiva, além disto por meio destas técnicas não se consegue

delimitar a extensão da patologia, bem como acompanhar a eficácia do tratamento (LAWAL *et al.*, 2017).

Exames tradicionais de imagens radiológicas são frequentemente utilizados para detectar alterações anatômicas resultantes de processos inflamatórios/infecciosos, mas sem diferenciá-los (LAWAL, *et al.*, 2017), uma vez que alterações anatômicas estão relacionadas diretamente ao avanço dessas condições patológicas no organismo (PALESTRO, 2019). Diante disso, quando existe indicação, exames com maior sensibilidade, como as cintilografias realizadas em MN, são indicados, sendo possível por meio deles a realização de varreduras de corpo inteiro, contribuindo de forma positiva na identificação e localização de processos inflamatórios e infecciosos (TAÏEB *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2019).

#### 2.4 RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO/INFLAMAÇÃO

Existem no mercado uma variedade de radiofármacos com diferentes respostas empregados rotineiramente para identificação e localização de focos inflamatórios assépticos e infecciosos. Estes medicamentos são complexados a diversos radionuclídeos, com características diferentes, sendo os mais utilizados: gálio-67, índio-111, flúor-18 e tecnécio-99m (PALESTRO, 2019). Estes compostos possuem mecanismos de acúmulo específico que compreendem um número de possíveis interações entre o radiofármaco e o alvo. Algumas características físicas desses elementos são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físicas dos radionuclídeos utilizados no diagnóstico de inflamação/infecção

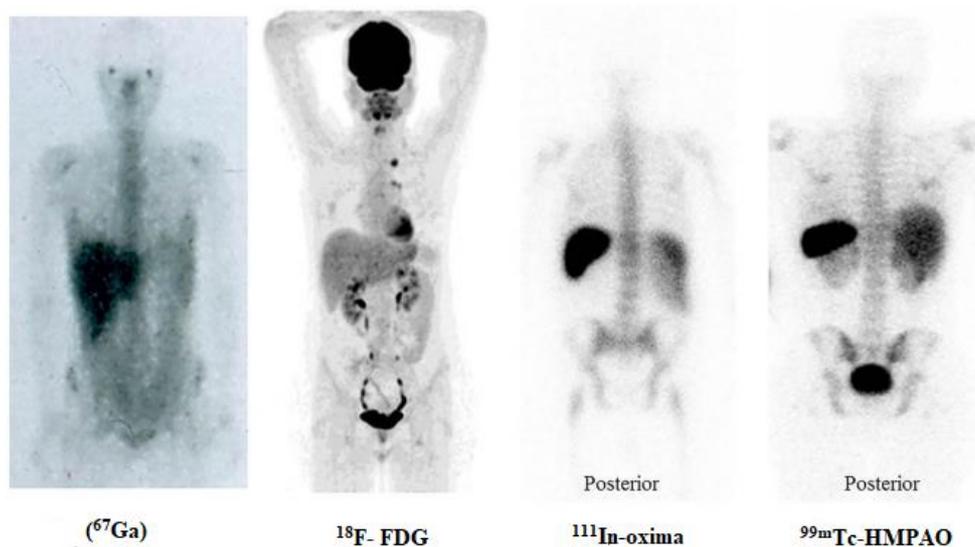
RADIONUCLÍDEO	T <sub>1/2</sub>	DECAIMENTO	(keV)
<sup>67</sup> Ga	78 h	Captura eletrônica	93, 185, 300, 394
<sup>111</sup> In	67 h	Captura eletrônica	171, 245
<sup>99m</sup> Tc	6 h	Transição isomérica	140
<sup>18</sup> F	110 min	Emissão de pósitrons	511

Fonte: Modificado de OLIVEIRA (2006).

A escolha do radiofármaco para o diagnóstico de infecção é baseado na situação clínica do paciente, na reação do organismo e nas particularidades dos sintomas. Além disso, o percurso e o efeito da medicação também são considerados para certificar que sua utilização implica na identificação do processo nos sítios de inflamação/infecção (DIAS, 2015).

Os radiofármacos destinados para diagnosticar processos infecciosos agem acumulando-se nos sítios de infecção pelo aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular ou devido à migração de células leucocitárias (SALMANOGLU, 2017). A Figura 6 mostra a biodistribuição normal de alguns radiofármacos destinados a este fim.

Figura 6 - Biodistribuição dos quatro radiofármacos mais utilizados na clínica para diagnóstico de inflamação/infecção.



Fonte: Modificado de SALMANOGLU, et al. (2017).

Apesar da ampla oferta, dentre os radiofármacos usuais não existe um que atenda todas as especificações desejadas, dentre elas: baixa dose de radiação, rápida e segura manipulação, capacidade de distinguir inflamação de infecção, capacidade de identificar o patógeno envolvido, rápida liberação sanguíneo e do corpo, rápida depuração, alta disponibilidade comercial e custo reduzido, entre outros (SAHA, 2010).

Devido às limitações encontradas nos radiofármacos usuais, os empenhos para a descoberta de novos radiotraçadores mais específicos para o diagnóstico de infecção continuam mundialmente, onde pesquisas

envolvendo a utilização de agentes como: antibióticos, peptídeos, lipossomas, imunoglobinas, quimiotáticos, citocinas, vitaminas, têm sido realizadas. Dentre os compostos mencionados, os antibióticos foram os primeiros a serem radiomarcados ao  $^{99m}\text{Tc}$ , pois apresentavam-se de forma promissora na formação das imagens de infecção. A hipótese seria que o antibiótico seria internalizado e metabolizado pelas bactérias atuantes nos sítios de infecção presentes no organismo, sendo possível dessa forma mapear com precisão a localização desses sítios, bem como delimitar sua extensão de forma precoce, por meio de exames cintilográficos (PALESTRO, 2019; AULETTA, *et al.*, 2016).

#### 2.4.1 Gálio ( $^{67}\text{Ga}$ )

Os serviços de MN têm utilizado há décadas o gálio ( $^{67}\text{Ga}$ ), em estudos oncológicos, para diagnóstico, estadiamento e acompanhamento da reposta terapêutica. Além disso, este radiofármaco é utilizado na localização de processos inflamatórios e infecciosos agudos e crônicos, apresentando elevada sensibilidade para detecção dessas patologias (SALMANOGLU, *et al.*, 2017; SEGARD, *et al.*, 2018). Este elemento é produzido em ciclotron por meio do bombardeamento de prótons em zinco enriquecido ( $^{68}\text{Zn}$ ) eletrodepositado em placa de cobre niquelada (SEGARD, *et al.*, 2018).

O  $^{67}\text{Ga}$ , quando administrado, encontra-se predominantemente no plasma ligado principalmente a transferrina, devido a sua forma iônica de ligação análoga ao ferro, sendo em processos tumorais, de inflamação ou infecção direcionado por meio da vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade dos vasos e migração leucocitária para o local do dano (SALMANOGLU, *et al.*, 2017).

Em processos infecciosos, o  $^{67}\text{Ga}$  liga-se a lactoferrina, devido à alta concentração dessa proteína nesses processos. Isto ocorre porque o radiofármaco tem mais afinidade pela lactoferrina do que pela transferrina. A lactoferrina encontra-se nos grânulos secundários dos leucócitos polimorfonucleares. E estas células leucocitárias, principalmente os neutrófilos, chegam aos sítios de infecção e podem, alternativamente, perder seus grânulos

específicos, excretando no meio extracelular lactoferrina, que atua contra os microrganismos evitando multiplicação por meio da retenção de íons férrico. Além disso, a lactoferrina presente no sítio de infecção pode ligar-se aos receptores de lactoferrina também presentes em leucócitos mononucleares, ligando-se inclusive a ferritina intracelular que por sua vez também possui grande afinidade pelo  $^{67}\text{Ga}$  (DIAS, 2015).

O  $^{67}\text{Ga}$  tem tempo elevado de meia-vida biológica, 25 dias, sendo eliminado por via renal (SALMANOGLU, *et al.*, 2017). A captação fisiológica principal do radiofármaco é hepática, no entanto também se observa captação nos ossos, medula óssea, córtex renal, baço e trato digestivo (VEIGA, 2013).

As desvantagens deste radiotraçador iniciam-se pela falta de especificidade, sendo captado indiferentemente por tumores, processos inflamatórios e infecciosos. Além disso, as diferentes energias do espectro advindas do  $^{67}\text{Ga}$  não são consideradas as mais adequadas para o SPECT, uma vez que os fótons de baixa energia resultam em alta porcentagem de espalhamento, atrapalhando a detecção dos fótons usuais. Os fótons de alta energia, por sua vez, são difíceis de colimar e de serem detectados eficientemente, devido à espessura fina dos cristais utilizados nas gamas câmaras, além de possível emissão de elétrons Auger.

No entanto, apesar das altas doses associadas e as desvantagens já citadas, exames com  $^{67}\text{Ga}$  continuam sendo requisitados, principalmente devido sua alta sensibilidade na identificação de linfomas, muitas vezes relacionados a inflamação crônica (VEIGA, 2013; DIAS, 2015; SALMANOGLU, *et al.*, 2017; SEGARD, *et al.*, 2019).

#### **2.4.2 Fluordesoxiglicose (2-desoxi-2- $^{18}\text{F}$ Flúor-D-glicose) ( $^{18}\text{F}$ - FDG)**

No cenário mundial são utilizados em MN inúmeros radionuclídeos emissores de pósitrons, no entanto o  $^{18}\text{F}$  continua sendo o elemento mais escolhido para ligação a radiofármacos PET. Isto ocorre devido a algumas de suas características, tais como: tempo de meia vida favorável na clínica e também na distribuição; facilidade de obtenção por meio de profissionais qualificados; reação facilitada a diferentes compostos orgânicos e inorgânicos,

eletrofílicos e nucleofílicos; curto alcance tecidual, devido a sua baixa energia (0,64 MeV), o que contribui na alta resolução espacial (SANTOS, 2017).

A rota mais utilizada para produção de  $^{18}\text{F}$  consiste em bombardeamento de prótons em átomos de oxigênio-18 ( $^{18}\text{O}$ ) utilizando, como material alvo, água enriquecida com  $^{18}\text{O}$ , em ciclotrons (SANTOS, 2017). Dentre preparações radiofarmacêuticas que utilizam  $^{18}\text{F}$  destaca-se a 2-desoxi-2- $^{18}\text{F}$ Flúor-D-glicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG), molécula análoga a glicose que age no organismo atravessando as membranas celulares, por difusão facilitada, sendo captado por células que apresentam metabolismo glicólico aumentado (SILVA, BOLOGNESI, 2017; SANTOS, 2017).

Nos processos inflamatórios, o  $^{18}\text{F}$ -FDG age atravessando a membrana das células presentes nos sítios de inflamação, por difusão facilitada, principalmente neutrófilos e macrófagos, uma vez que devido às tentativas de eliminação dos agentes agressores estas células tendem a gastar mais energia, aumentando seu metabolismo glicólico. Dessa forma, se torna possível o mapeamento desses focos por meio da utilização desse radiofármaco, sendo a intensidade de sua captação diretamente proporcional a atividade da inflamação, favorecendo o rastreamento da doença e acompanhamento da eficácia terapêutica (SANTOS, 2017; SILVA, BOLOGNESI, 2017).

Para localização de processos inflamatórios e infecciosos, o  $^{18}\text{F}$ -FDG pode ser administrado *in vivo* no paciente, injetado endovenosamente para ação subsequente, ou pode ser manipulado previamente *in vitro*, onde é incorporado a células leucocitárias autólogas, para reinjeção no paciente. Ressalta-se que os resultados da avaliação diagnóstica podem ser influenciados pela alimentação, sendo necessário jejum prévio, bem como em caso de doenças pré-existentes como a diabetes o paciente precisa ser monitoradas antes da administração do radiofármaco, evitando resultados falso-positivos (SALMANOGLU, *et al.*, 2017).

Em indivíduos sadios o radiofármaco é distribuído por todo o organismo, constatando-se maior captação cerebral e cardíaca, devido ao alto gasto glicólico desses órgãos, e menor distribuição pulmonar e hepática. Seu tempo de meia vida biológica é de aproximadamente 12 minutos, sendo eliminado principalmente por via renal (IPEN, 2010).

No entanto, o  $^{18}\text{F}$  está longe de ser o radiomarcador ideal para rastreamento de processos inflamatórios e infecciosos, pois sua meia-vida curta não permite tempo suficiente para aquisição de imagens de migração leucocitária. Suas desvantagens também estão relacionadas a necessidade de possuir um ciclotron para sua fabricação ou estar perto de um centro produtor de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Um outro problema está relacionado a energia muito mais elevada do  $^{18}\text{F}$  em relação as provenientes de fótons emitidos por radionuclídeos SPECT utilizados em MN, contribuindo em altas doses de radiação para os pacientes e para as células. Além disso, devido à falta de especificidade, existe a possibilidade de resultados falso-positivos, uma vez que células com alta atividade glicolítica também captam este radiofármacos (SALMANOGLU *et al.*, 2018; IAEA, 2015; MIÑANA *et al.*, 2015).

### **2.4.3 Leucócitos radiomarcados *in vitro***

A utilização de células sanguíneas autólogas radiomarcadas no diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos é considerado “padrão ouro” em MN. Os leucócitos podem ser radiomarcados *in vitro* usando  $^{111}\text{In}$ -oxina ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hexametil-propileno-amino-oxima (HMPAO), sob condições estéreis, uma vez que serão reinjetados no paciente. De uma forma geral, a imagem de inflamação/infecção deriva do seu curso fisiopatológico no organismo, sendo possível diagnosticar estas condições em estágios precoces por meio da MN. No entanto, estas técnicas são demoradas e laboriosas e envolvem a manipulação de material potencialmente contaminado, o que expõe o operador a vários riscos. Outros agravantes estão relacionados a falta de especificidade na diferenciação entre inflamação e infecção, além da inviabilização na identificação do patógeno envolvido no processo infeccioso atuante (IAEA, 2015; SIGNORE *et al.*, 2018; LAWAL *et al.*, 2017; PALESTRO, 2019).

#### **2.4.3.1 Leucócitos radiomarcados índio-111- oxina ( $^{111}\text{In}$ -oxima)**

A cintilografia com  $^{111}\text{In}$ -oxima foi o primeiro método utilizado para marcação *in vitro* de células leucocitárias, sendo amplamente utilizada a muitos

anos por alguns países para o diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos. O radiofármaco atua no organismo formando um complexo lipofílico neutro capaz de atravessar a membrana celular por difusão passiva (SALMANOGLU, *et al.*, 2017). Geralmente a produção do radionuclídeo índio-111 se dá por meio de bombardeamento de prótons em alvos de Cádmi-111 ou Cádmi-112 em um ciclotron. Sob a forma de sal de tricloreto em solução de ácido clorídrico, o índio-111 pode ser complexado a oxima, sendo para marcação de células leucocitárias, tamponado com hidroximetilaminometano (IAEA, 2015).

O  $^{111}\text{In}$  atua ligando-se às proteínas do núcleo e ao citoplasma das células; a oxima, entretanto é capaz de marcar todas as células sanguíneas, uma vez que não apresenta uma ligação específica. Para aumentar a eficiência de marcação, os leucócitos devem ser separados previamente do sangue total (uma vez que o  $^{111}\text{In}$  apresenta maior afinidade pela transferrina do que pela oxima).

O protocolo de separação do sangue total, consiste, basicamente, em coleta de um volume pré-definido de sangue total do paciente, sedimentação dos eritrócitos e centrifugação do plasma rico em leucócitos para aquisição do pellet. Após a realização deste processo, o plasma resultante deve ser desprezado e o protocolo de radiomarkação a  $^{111}\text{In}$ -oxima deve ser realizado com tampão de fosfato salino (PBS), solução salina tamponada com fosfato isotônico ou soro fisiológico ao invés de plasma. Estas medidas contribuem para a redução de impurezas e aumento da eficiência de marcação (SALMANOGLU, *et al.*, 2017).

Após administração endovenosa, o  $^{111}\text{In}$  é rapidamente depurado do sangue. A distribuição fisiológica ocorre no baço, fígado e medula óssea, sendo sua eliminação realizada principalmente por via renal. O radiofármaco  $^{111}\text{In}$ -oxima apresenta tempo de meia-vida biológica de 6 horas (SALMANOGLU, *et al.*, 2017).

As desvantagens da utilização deste radionuclídeo no radiodiagnóstico iniciam-se pelas altas doses de radiação envolvidas, comparadas a métodos semelhantes (como por exemplo os leucócitos radiomarcados ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), bem como maior toxicidade as células radiomarcadas. Além disso, o  $^{111}\text{In}$  decai emitindo elétrons Auger, elétrons caracterizados por produzirem múltiplas ionizações com alta transferência linear de energia (LET), aumentando a

probabilidade de possíveis danos biológicos, sendo mais interessante para terapias oncológicas, assim como os usuais tratamentos com partículas  $\alpha$  (BOLCHACOV, *et al.*, 2015).

Outra desvantagem está relacionada ao aumento do tempo de aquisição nos equipamentos SPECT para obtenção de imagens de boa qualidade, pois, para minimizar os efeitos citados, empregam-se baixas atividades radiativas (AULETTA, *et al.*, 2018). Por fim, o  $^{111}\text{In}$ -oxima não é produzido e comercializado em muitos países, inclusive no Brasil, tornando a importação inviável devido aos altos custos envolvidos. No entanto, apesar do exposto em alguns países, o radiofármaco ainda é utilizado quando há indicação e disponibilidade (ROCA, *et al.*, 2010; SALMANOGLU *et al.*, 2017).

#### 2.4.3.2 Leucócitos radiomarcados tecnécio-99m-HMPAO ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO)

A utilização do radionuclídeo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para marcação de leucócitos *in vitro* apresenta vantagens quando comparados aos marcados com  $^{111}\text{In}$  no diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos, uma vez que o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está disponível em forma de gerador a um custo reduzido, enquanto o  $^{111}\text{In}$  precisa ser importado. Outro aspecto importante e favorável relacionado ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , principalmente para pacientes pediátricos, é a dose de radiação associada às células e ao paciente que é significativamente menor, quando comparado ao  $^{111}\text{In}$  e a outros radionuclídeos disponíveis, como o  $^{67}\text{Ga}$  e o  $^{18}\text{F}$ . Além disso, os serviços de MN utilizam colimadores cintilográficos de baixa energia e alta resolução no SPECT, específico para  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , o que contribui em melhor resolução de imagens e diminuição do tempo de aquisição (VRIES, *et al.*, 2010; ROCA *et al.*, 2010; TSOPELAS, 2015).

O Hexametilpropileno amino oxima (HMPAO) complexado ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi originariamente utilizado para exames *in vivo* de perfusão cerebral e, posteriormente, começou a ser implementado de forma *in vitro* na identificação de focos inflamatórios/infecciosos substituindo em muitos países a  $^{111}\text{In}$ -oxima.

O HMPAO está disponível comercialmente sob a forma de pó liofilizado (kit) e dispõe de duas formas estereoisómeras (d-l e meso). No entanto, apenas a forma d-l é indicada para radiomarcagem de células sanguíneas, apresentando-

se lipofílica neutra e sem carga, facilitando a entrada e retenção na membrana celular por difusão passiva; a forma meso não apresenta utilidade clínica e sua quantidade deve ser limitada na preparação final (IAEA, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2016).

Biologicamente o tecnécio livre tem afinidade por órgãos como a tireoide e as glândulas salivares, enquanto que o HMPAO é capaz de marcar todas as células sanguíneas, ligando-se às mitocôndrias e ao núcleo das células. Dessa forma, se faz necessário isolar *in vitro* as células de interesse, leucócitos, antes da realização do protocolo de radiomarcção ao  $^{99m}\text{Tc}$  (COSTA *et al.*, 2019; MARTINEZ *et al.*, 2016).

Após a separação dos leucócitos do sangue total, a marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO, diferentemente dos leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$ -oxima, pode ser realizada na presença de plasma, uma vez que este radiofármaco tem preferência por granulócitos, constituindo uma vantagem para identificação de processos purulentos agudos. De uma forma sucinta, o protocolo de marcação dos leucócitos consiste em sedimentação, centrifugação diferenciada e radiomarcção, durando aproximadamente de 90 a 120 minutos (VRIES *et al.*, 2010; PALESTRO, 2019).

Em menos de uma hora o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO começa a assumir sua forma iônica hidrofílica, no entanto a causa dessa mudança não é totalmente conhecida (VEIGA, 2013; VRIES *et al.*, 2010; IAEA, 2015). Dessa forma, uma vez que o HMPAO não é estável, o radiofármaco deve ser utilizado nos primeiros 20 minutos após marcação. O  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO é liberado das células em uma proporção de 7% por hora, voltando para corrente sanguínea (VRIES, *et al.*, 2010).

Os leucócitos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO tem distribuição fisiológica na bexiga, vesícula biliar, medula óssea e sistema gastrointestinal, além de captação inespecífica nos rins. Apresenta também maior captação pulmonar precoce, depurado com o passar do tempo. Sua meia-vida biológica é menor que 4 horas, sofrendo eliminação principalmente pelo sistema gastrointestinal (SALMANOGLU *et al.*, 2017; PALESTRO 2019).

As principais desvantagens na utilização de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO em comparação a  $^{111}\text{In}$ -oxima estão relacionadas a menor eficiência de marcação,

de estabilidade e de biodistribuição normal da radiação em um número maior de órgãos, o que contribui para resultados falsos-positivos e exposição desnecessária as radiações. Um outro agravante está relacionado a interrupção da produção e comercialização do HMPAO no Brasil, tornando a importação inviável devido aos custos altos envolvidos (IAEA, 2015; DIAS, 2015; SALMANOGLU *et al.*, 2017).

Diante do exposto, percebemos as limitações dos radiofármacos frequentemente utilizados em MN para rastreamento de processos infecciosos, tornando o estudo de radiotraçadores mais eficientes extremamente necessário. Por esta razão é importante a padronização de uma técnica específica, de fácil e segura manipulação no CRCN, o que poderá vir a contribuir na prática clínica com aplicações na MN, proporcionando avanços na identificação, diferenciação, determinação da conduta terapêutica e acompanhamento da eficácia do tratamento em pacientes acometidos por quadros de infecção.

#### **2.4.4 Antibióticos radiomarcados**

Antibióticos são fármacos de origem natural (obtidos a partir de organismos vivos), sintético ou semissintético (produzidos em indústrias farmacêuticas), utilizados principalmente para o tratamento de infecções por bactérias ou fungos em humanos e animais. Estas medicações são divididas em diferentes grupos funcionais, diferenciando-se umas das outras devido a suas propriedades físicas e químicas e seus respectivos mecanismos de ação. Esses fármacos por sua vez apresentam-se nas formas bactericida (causando morte) ou bacteriostática (causando inibição) dos microrganismos indesejáveis atuantes no organismo (AULETTA, *et al.*, 2016; COSTA, SILVA JUNIOR, 2016).

Para ação contra processos infecciosos no organismo, os antibióticos necessitam que exista um alvo (ligante) na célula bacteriana. Outros fatores importantes para sua eficácia estão relacionados a concentração que chegará até os sítios de infecção, bem como a integridade estrutural desse fármaco, além do seu processo de ativação local. Para ser considerado um agente antimicrobiano ideal, os antibióticos precisariam apresentar algumas características, tais como: rápida ação bactericida, diferentes vias de

administração, não afetar a microbiota do hospedeiro, baixo nível de toxicidade, elevados níveis terapêuticos, poucos efeitos colaterais, alta distribuição nos sítios de infecção, estar acessível financeiramente. No entanto, a obtenção de todas estas características em uma única medicação ainda não foi alcançada, uma vez que a relação antibióticos/bactérias não se apresenta de forma linear (COSTA, 2016).

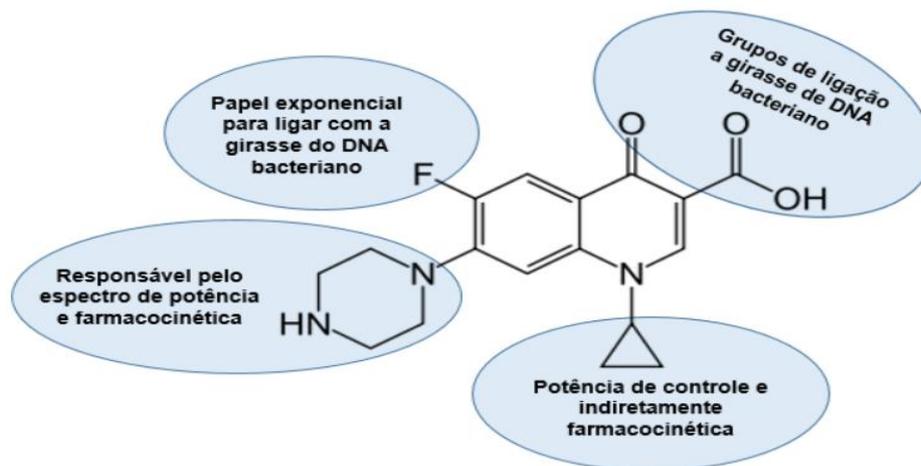
Devido à ligação específica dos antibióticos às bactérias, estudos envolvendo a marcação deste fármaco aos elementos radioativos foram iniciados mundialmente, o que seria uma possibilidade que contribuiria para o diagnóstico, localização e acompanhamento da eficácia do tratamento de uma forma mais sensível e específica do que as utilizadas na clínica. O antibiótico Ciprofloxacina sob a forma de *infecton*, foi o primeiro antibiótico radiomarcado ao  $^{99m}\text{Tc}$  comercializado, testado em humanos para diagnóstico de infecções por imagens (SOLANKI *et al.*, 1993; VINJAMURI *et al.*, 1996). Posteriormente, estudos envolvendo novos antibióticos, como por exemplo a Amoxicilina, foram iniciados (MIRSHOJAEI, 2015; LAWAL, *et al.*, 2017).

#### 2.4.4.1 $^{99m}\text{Tc}$ -Ciprofloxacina ( $^{99m}\text{Tc}$ - CIPRO)

Ciprofloxacina é um antibiótico bactericida sintético do grupo das fluoroquinonas (ou quinolonas), sendo amplamente distribuída entre espécies bacterianas, o que permite ter atividade de amplo espectro. Sua ação resulta na inibição das enzimas topoisomerase II (DNA girase, gyrA e B) e topoisomerase IV (grlA e B), necessários para a replicação do DNA bacteriano, transcrição, reparo e recombinação (AULETTA *et al.*, 2016; SALMANAGLU *et al.*, 2017; NAQVI *et al.*, 2018). Sendo listada pela OMS como um medicamento essencial na saúde mundial.

Na Figura 7 é demonstrado os grupos pertencentes a estrutura química da ciprofloxacina, onde o grupo flúor aumentou consideravelmente a atividade desta classe de compostos; o grupo piperazinil aumentou acentuadamente sua atividade contra bactérias Gram negativas, e o grupo ciclopropil parece aumentar a atividade da molécula (VALLET, 2012).

Figura 7 - Função dos diferentes grupos de ciprofloxacina e estrutura química: (1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-(1-piperazinil)-3-ácido quinolina carboxílico).



Fonte: Modificado de NAQVI *et al.* (2018).

Embora complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacina tenham sido usados no radiodiagnóstico desde a década de 90, a estrutura do radiofármaco permanece mal definida. Para a maioria dos compostos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  usados clinicamente, incluindo as fluoroquinonas, o estado de oxidação +5 pode ser estabilizado formando um núcleo de tecnécio(V)-oxo ( $\text{TcO}^{3+}$   $\text{TcO}^{2+}$ ) ou formando um núcleo de nitreto  $\text{TcN}^{2+}$  por meio de um ligante tetradentado ou por meio de um par de ligantes bidentados (NAQVI *et al.*; 2017), como mostrado na Figura 8.

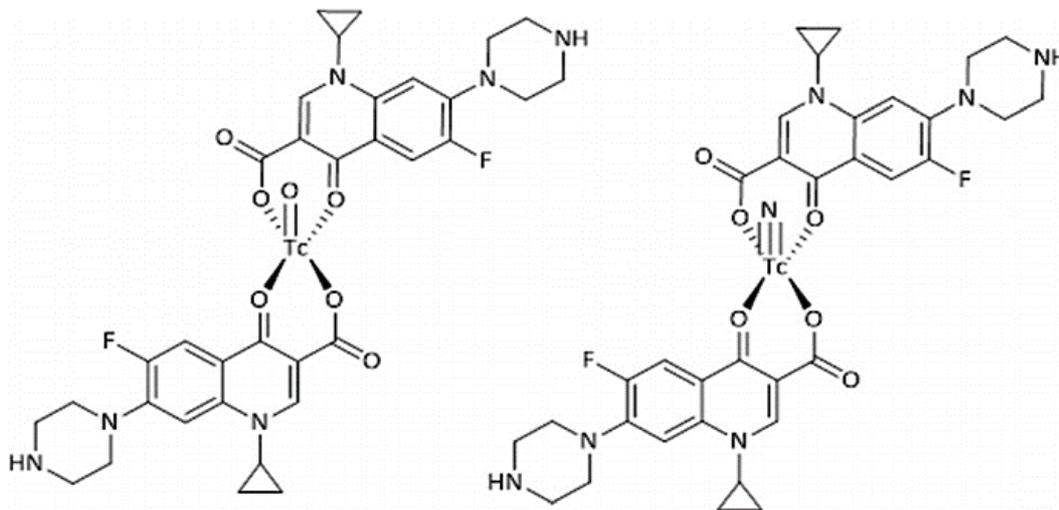
Figura 8 - Estrutura dos núcleos de tecnécio, em sequência, dois núcleos oxo e um núcleo nitreto, complexados ao  $^{99m}\text{Tc}(v)$ . "L" representa os ligantes que coordenam com os núcleos de tecnécio para formar o ápice da estrutura e o oxigênio ou nitrogênio do núcleo f



Fonte: NAQVI *et al.* (2017).

Técnicas de cristalografia de raios-X e análise espectroscópica de outras estruturas de metal-quinolona indicam que a ciprofloxacina está ligada de forma bidentada ao  $^{99m}\text{Tc}$  por meio do oxigênio carbonil do anel e um dos oxigênios, onde as formas químicas dos complexos são mostradas na Figura 9.

Figura 9 - Interação bidentada de fluoroquinolona com tecnécio. Estruturas de  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacina são mostradas usando núcleos  $\text{TcO}^{3+}$  e  $\text{TcN}^{2+}$ .

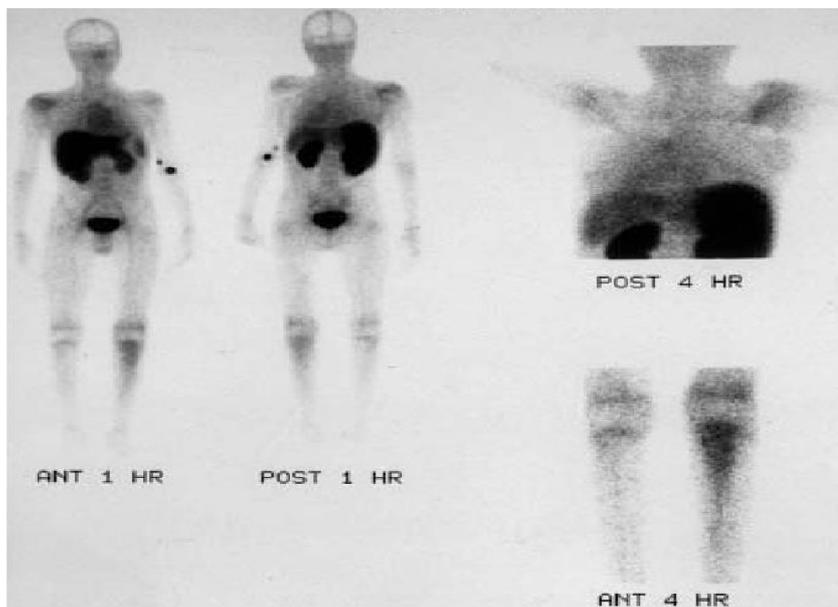


Fonte: NAQVI *et al.* (2017).

Este antibiótico é transportado para os locais de infecção por meio do encapsulamento de células leucocitárias, neutrófilos, possuindo a capacidade de atravessar a fibrina, proteína fundamental na resposta inflamatória, e também por meio de fluídos corporais, uma vez que devido ao seu baixo peso molecular e baixa ligação as proteínas plasmáticas (25-30%), pode ser rapidamente difundido e direcionado a processos infecciosos atuantes por meio do aumento da permeabilidade capilar e transporte de líquidos para tecidos extracelulares resultantes desses processos (NAQVI *et al.*, 2018; TAVARES, 2014).

A biodistribuição normal do medicamento se dá em grande parte no fígado, rins e próstata, sendo acumulados em menor nível no líquido cefalorraquidiano ou no pulmão.  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacina é indicada para o tratamento de infecções do trato urinário, gastroenterite com diarreia grave, infecções na próstata, infecções de pele e tecidos moles, osteomielite, infecções intra-abdominais e pneumonia devido a bactérias Gram negativas, sendo metabolizado no fígado e eliminada pela bÍlis e excreção renal (VALLET, 2012). Na Figura 10 é possível observar um exame cintilográfico envolvendo  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacina em projeções anteriores e posteriores.

Figura 10 - Imagens de infecção por sepse; onde na tíbia esquerda e no ombro direito são visualizados um aumento moderado ou grave da captação de *Infecton*.



Fonte: YAPAR *et al.* (2001).

As fluoroquinonas são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem em sua composição uma parte hidrofílica (solúvel em água) e uma parte hidrofóbica (não solúvel em água), podendo dessa forma atravessar facilmente a membrana de bactérias Gram positivas por difusão passiva, enquanto que em bactérias Gram negativas precisam do suporte de proteínas, denominadas porinas, que atravessam a membrana externa e por meio destas moléculas pequenas como ciprofloxacina podem atravessar (NEVES *et al.*, 2005).

$^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO apresentou muitas vantagens comparadas a outros métodos diagnósticos usuais, dentre elas: diferenciação entre processos inflamatórios estéreis e infecção, ausência de captação na medula óssea (contribuindo para obtenção de imagens ortopédicas e diminuição da exposição nesta região), facilidade de manipulação, custos reduzidos e principalmente por não envolver a manipulação de material potencialmente contaminado (AULETTA *et al.*, 2016, MIRSHOJAEI, 2015).

De acordo com a literatura, este radio fármaco foi extensivamente estudado, por meio de diferentes sínteses e inúmeros testes de controle de qualidade, por muitos pesquisadores em diferentes países, apresentando-se como um método sensível e específico para o diagnóstico e localização a uma

ampla variedade de lesões bacterianas no organismo (OH *et al.*, 2002; BRITTON *et al.*, 2002).

Apesar de *infecton* ter se mostrado um agente diagnóstico promissor, contribuindo na identificação de muitos processos patológicos envolvendo bactérias no organismo por um longo período de tempo, devido à resistência bacteriana muitos autores discordaram dos seus benefícios em razão da falta de especificidade para algumas doenças de origem bacteriana ao qual o fármaco é indicado na clínica (AULETTA *et al.*, 2016; SALMANAGLU *et al.*, 2017).

Este fator envolve algumas hipóteses, além da própria resistência bacteriana, como por exemplo os protocolos de manipulação e insumos utilizados na síntese do radiofármaco. Desta forma, novos empenhos em relação as fluoroquinonas, bem como a radiomarcagem de outros grupos de antibióticos continuam sendo estudados (AULETTA *et al.*, 2016; SALMANAGLU *et al.*, 2017).

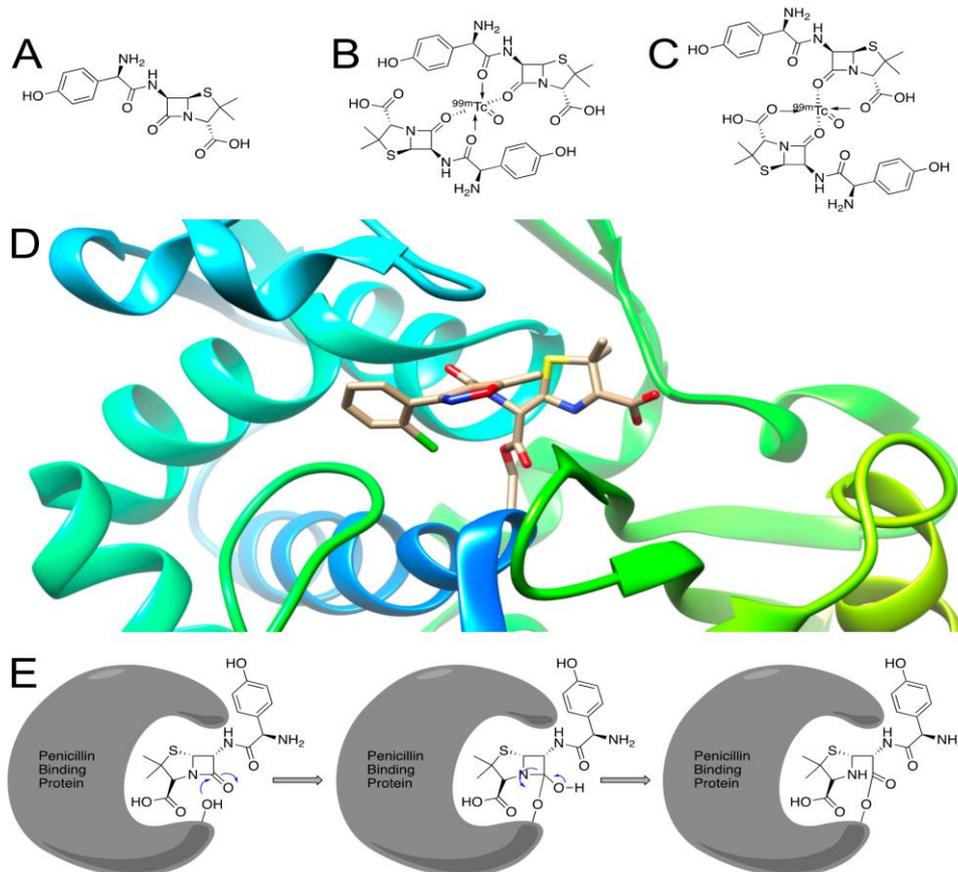
#### 2.4.4.2 $^{99m}\text{Tc}$ -Amoxicilina ( $^{99m}\text{Tc}$ - AMOX)

A amoxicilina é um antibiótico semissintético do tipo penicilina, derivado da ampicilina, de amplo espectro, devido ao seu grupo amino que possibilita atividade bactericida contra muitos microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Este fármaco age por meio da inibição da biossíntese do peptidoglicano das paredes das células procariotas, estruturas essenciais para mantê-las íntegras, prevenindo-as de lise osmótica e, conseqüentemente, morte (AZEVEDO, 2014).

A estrutura química deste fármaco (Figura 11A), é formada por várias espécies doadoras de elétrons, como oxigênio, nitrogênio e enxofre, o que elege este antibiótico como traçador específico para infecção, visto que o  $^{99m}\text{Tc}$  pode interagir e formar complexos com estes átomos. Além disto, amoxicilina é amplamente prescrita e, como tal, parece ser uma escolha atraente para a funcionalização de um radiotraçador, contudo a estrutura exata de  $^{99m}\text{Tc}$ -amoxicilina ainda é desconhecida (SHAHZADI *et al.*, 2015; AZEVEDO, 2014). No entanto, JAVED *et al.* 2015, propôs uma estrutura possível (Figura 11B), mas existe outra estrutura possível (Figura 11C). No entanto, ambas estruturas têm

a possibilidade de impedir estericamente a ligação da amoxicilina a peptidoglicano (Figura 11D, E).

Figura 11 - A) Amoxicilina; B) Estrutura proposta para amoxicilina marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ ; C) Outra estrutura potencial para  $^{99m}\text{Tc}$ -amoxicilina; D) Estrutura de cristal de um antibiótico  $\beta$ -lactâmico semelhante (cloxacilina) ligado a peptidoglicano; E) Mecanismo de ligação da amoxicilina a um peptidoglicano.



Fonte: NORTHROP *et al.* (2019).

Após a administração, amoxicilina age atravessando a membrana celular por transporte ativo ou por difusão passiva, sendo amplamente distribuído nos líquidos e tecidos corporais com uma baixa ligação a proteínas plasmáticas, aproximadamente 18% (SOUZA, 2006; RAMOS, 2008). Sua metabolização ocorre por meio de hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, onde posteriormente é transformada em ácidos secundários, sendo eliminada por via renal, após secreção tubular e filtração glomerular (RAMOS, 2008). Sendo indicada principalmente para o tratamento de infecções urinárias, de ouvido ou respiratórias, amigdalite, sinusite ou vaginite etc.

O antibiótico amoxicilina é considerado seguro e inócuo para utilização clínica devido ao seu mecanismo de ação, uma vez que interage especificamente com peptidoglicano, proteína encontrada nas paredes celulares bacterianas, possuindo dessa forma baixa toxicidade direta, sendo um dos antibióticos mais receitados nos dias atuais. No entanto, a sua desvantagem principal está relacionada a existência das betalactamases, enzimas produzidas pelas bactérias, com capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos, causando resistência bacteriana (AZEVEDO, 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica, CAAE: 26306019.0.0000.5208, (Apêndice A), da Universidade Federal de Pernambuco para realização dos testes do controle de qualidade, envolvendo componentes do sangue. O estudo foi realizado com um único indivíduo do sexo feminino, com idade igual a 30 anos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Todos os ensaios de radiosíntese e testes posteriores dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX foram realizados nos laboratórios da Divisão de Pesquisa, Desenvolvimento, Inovação e Ensino (PDIE) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), vinculado a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

#### 3.1 MATERIAIS

Os principais reagentes utilizados foram: Ciprofloxacina e Amoxicilina (Sigma); Pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ); Solução de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$  a 0,9%), estéril; Cloreto Estanoso hidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (MERK); Solução de Ácido Ascórbico Glacial (0,01N/ 0,2M); Ácido Clorídrico (0,1 N); Tampão de fosfato de sódio ( $\text{Na-PB}$ ) (0,1N/0,2M); Hidróxido de sódio (0,1 N); Água MILIQ; Papel Whatman 3mm; Papel indicador de pH (MERK); Cubas cromatográficas; Micropipetas (2 a 1000 $\mu\text{L}$ ) e ponteiros de tamanhos variados; Tubos de ensaio e tubos Falcon; Metil Etil Cetona (Butanona); Seringas 3ml e agulhas; Frascos de vidro tipo penicilina; Membranas filtrantes 0,22 $\mu\text{m}$ ; Estirpes padronizadas BioBall Multishot 550 (Biomérieux), contendo cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*; Caldo de caseína de soja (TSB) e Tioglicolato.

Os principais equipamentos utilizados foram: balança analítica, centrífuga com desaceleração; estufas; capela de fluxo laminar; activímetro modelo Curiementor da PTW (Freiburg im Breisgau, Alemanha); radiocromatografo, modelo 1200 (Agilent Technologies, EUA); detector de germânio hiperpuro (HPGe), modelo CG1020 da Canberra (Meriden, EUA).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Planejamento Fatorial

Para realização do desenho experimental (MONTGOMERY, 1991), primeiramente, se fez necessário estudar nas literaturas de apoio quais seriam os principais reagentes utilizados para radiomarcção com tecnécio dos antibióticos escolhidos neste trabalho. Posteriormente, baseado nos valores de concentrações desses reagentes comumente utilizados nestes trabalhos, foram determinados todos os parâmetros a serem testados, a fim de padronizar a marcação mantendo os percentuais de eficiência de marcação elegíveis segundo os compêndios oficiais para radiofármacos complexados ao tecnécio.

Para as sínteses dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX, as concentrações de antibiótico, agente redutor e antioxidante utilizadas foram as apresentadas na Tabela 2. Além disso, a tabela também apresenta um ponto adicional (0), chamado ponto central (PC), que é utilizado com a finalidade de aumentar a precisão dos resultados e diminuir o erro experimental.

Tabela 2 - Valores atribuídos as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

Nível	Antibiótico (mg)	Cloreto Estanoso ( $\mu\text{g}$ )	Ácido Ascórbico (mg)
	Ciprofloxacina		
(+1)	8,0	150	2,0
(-1)	2,0	50	1,0
(0)	5,0	100	1,5
	Amoxicilina		
(+1)	10	200	3,0
(-1)	2,0	50	1,5
(0)	6,0	125	2,25

Fonte: A autora (2020).

As variáveis de entrada (ou independentes) utilizadas neste trabalho foram: concentração de antibiótico (ciprofloxacina ou amoxicilina), concentração de agente redutor (cloreto estanoso dihidratado) e concentração de antioxidante (ácido ascórbico). Os níveis das variáveis são representados por (+1) e (-1), sendo estas as maiores e menores concentrações testadas, respectivamente

(BRITTON *et al.*, 1997; OH *et al.*, 2002; SHAHZADI *et al.*, 2015; OZDEMIR *et al.*, 2015). Este design de experimentos foi escolhido por permitir a redução do número de ensaios experimentais e, conseqüentemente, dos custos envolvidos e da exposição do operador à radiação ionizante (MONTGOMERY, 1991).

O delineamento fatorial para este estudo resultou em uma matriz  $2^3$  (onde o número dois representa a quantidade de níveis e o número três representa a quantidade de variáveis), com repetição do ponto central, conforme mostrado na Tabela 3. A variável de saída (ou dependente) estabelecida foi o percentual de eficiência de marcação, definido como a fração da radioatividade total que está na forma química desejada (excluindo-se os percentuais de radioatividade sob a forma de impurezas).

Tabela 3 - Matriz de planejamento do experimento fatorial  $2^3$ , com ponto central, para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

	Ordem do teste	Antibiótico	Redutor	Antioxidante
$^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO	7	-1	+1	+1
	9 (PC)	0	0	0
	3	-1	+1	-1
	6	+1	-1	+1
	1	-1	-1	-1
	2	+1	-1	-1
	4	+1	+1	-1
	10 (PC)	0	0	0
	5	-1	-1	+1
	11 (PC)	0	0	0
$^{99m}\text{Tc}$ -AMOX	8	+1	+1	+1
	7	-1	+1	+1
	10 (PC)	0	0	0
	5	-1	-1	+1
	8	+1	+1	+1
	6	+1	-1	+1
	1	-1	-1	-1
	4	+1	+1	-1
	9 (PC)	0	0	0
	11 (PC)	0	0	0
	3	-1	+1	-1
	2	+1	-1	-1

PC- Ponto central

Fonte: A autora (2020).

Apesar das matrizes poderem ser construídas manualmente, por meio de arranjo de combinações, neste trabalho utilizou-se o ambiente do software

STATISCA (versão 13.3). Neste software, por meio do comando “experimental design (DOE)”, foram informadas as quantidades de variáveis a serem testadas e a quantidade de níveis, bem como também foi adicionado do ponto central, resultando em onze experimentos para cada radiofármaco. Os experimentos foram realizados de forma a seguir a ordem para cada teste.

### 3.2.2 Radiosíntese de $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX

Os antibióticos foram radiomarcados em frascos do tipo penicilina. A estes frascos foram adicionados o antibiótico (2 a 8 mg de ciprofloxacina; ou 2 a 10 mg de amoxicilina), em 1 ml de NaCl a 0,9%, o agente redutor (numa faixa de 50  $\mu\text{g}$  a 200  $\mu\text{g}$  de cloreto estanoso dihidratado) em uma solução de (1:1) de HCl 0,1 N, previamente nitrogenado, como mostrado na Figura 12, e o ácido ascórbico (1 a 3 mg) seguindo os planejamento fatorial.

Figura 12 - Incorporação do cloreto estanoso dihidratado ao HCl 0,1N sob atmosfera de nitrogênio adaptada.

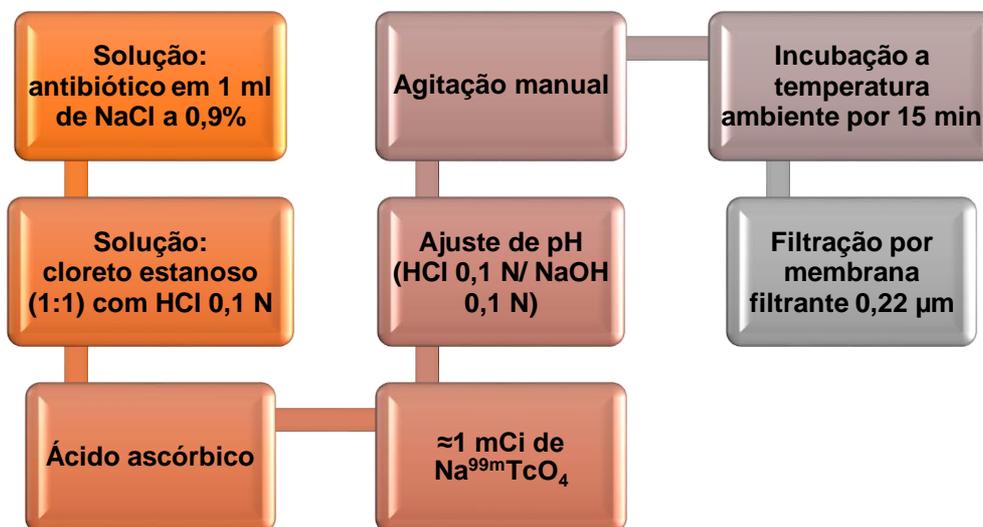


Fonte: A autora (2020).

A estes compostos foram adicionados aproximadamente 1 mCi de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  em cada frasco e os valores referentes ao pH das soluções obtidas foram ajustados para 5, valor próximo ao pH sanguíneo, utilizando-se concentrações variáveis de NaOH 0,1 N. Posteriormente, as preparações foram agitadas manualmente e incubadas a temperatura ambiente por 15 min, seguindo de filtração por membrana filtrante com poros de diâmetro 0,22  $\mu\text{m}$ ,

sendo o volume final de cada frasco aproximadamente 2 ml. O esquema de marcação pode ser observado no fluxograma da Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma das etapas de radiomarcção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.



Fonte: A autora (2020).

### 3.2.3 Determinação da eficiência de marcação (%EM)

Eficiência de marcação (% EM), ou pureza radioquímica, é definida como o percentual da radioatividade da solução na forma química de interesse. No caso dos radiofármacos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ , é necessário quantificar as três formas químicas de interesse na preparação final: o  $^{99m}\text{Tc}$  ligado ao fármaco (forma química de interesse), o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , que corresponde ao tecnécio livre; e o  $^{99m}\text{TcO}_2$  ou tecnécio hidrolisado.

A eficiência de marcação (%EM) foi calculada pela Equação 1.

$$\%EM = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_2 + \%^{99m}\text{TcO}_4^-) \quad (1)$$

Fonte: OZDEMIR *et al.* (2015).

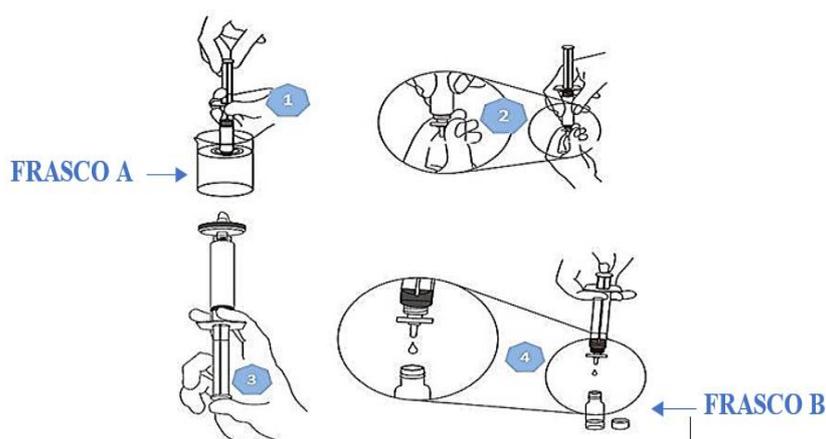
Para estudar as possíveis impurezas no produto final de marcação foram realizadas previamente análises com dois sistemas cromatográficos, duas fases móveis, acetona e butanona, em papel whatman 3mm (fase estacionária). Para

ambos os solventes, foi possível separar o tecnécio livre ( $R_f = 1$ ), mas não o tecnécio reduzido, sendo que este permanecia no mesmo  $R_f$  que o antibiótico radiomarcado ( $R_f = 0$ ). Desta forma, por conveniência, o sistema cromatográfico butanona/papel whatman foi escolhido para avaliação da pureza radioquímica por CCD neste trabalho.

### 3.2.3.1 Determinação do percentual de $^{99m}\text{TcO}_2$

Para a retirada do  $^{99m}\text{TcO}_2$  da preparação final, foi utilizado o método da filtração por membrana estéril de  $0,22\ \mu\text{m}$  de poro (filtro MILLEX-GV, Millipore), baseado nos estudos realizados por SHIN *et al.* (2013); FERNANDES *et al.* (2015) e MONTEIRO *et al.* (2017). Dessa forma, as amostras foram aspiradas por seringas (3 ml) dos frascos de preparação (FRASCO A); em seguida, as agulhas foram retiradas e trocadas pelo filtro já citado, que foi rosqueado às extremidades das seringas, e as preparações foram filtradas em novos frascos (FRASCO B). Na Figura 14, é possível visualizar passo a passo o esquema de filtração. Neste sistema,  $^{99m}\text{TcO}_2$  fica retido no filtro, enquanto o radiofármaco e o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  são filtrados livremente.

Figura 14 - Esquema representativo de purificação por filtração: 1) Aspiração da amostra com seringa e agulha; 2) Retirada da agulha e acoplamento do filtro à seringa; 3) Certificação que o filtro está bem encaixado; e 4) Filtração



Fonte: Membrane Solutions Corp (2020).

As atividades das soluções radioativas contidas nos frascos A e B (frasco de preparação e final, respectivamente), bem como a atividade que ficou retida

na membrana filtrante, na agulha e o residual no frasco A, foram determinadas por meio de medições feitas no activímetro. As atividades medidas na agulha e o residual no frasco A foram consideradas como perdas (devido ao processo de filtração) e subtraídas da atividade inicial presente no frasco A. O percentual de  $^{99m}\text{TcO}_2$  foi estimado de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2 = \frac{\textit{Atividade}_{\textit{membrana filtrante}}}{\textit{Atividade}_{\textit{frasco A}} - \textit{Perdas}_{\textit{Seringa e residual}}} \times 100 \quad (2)$$

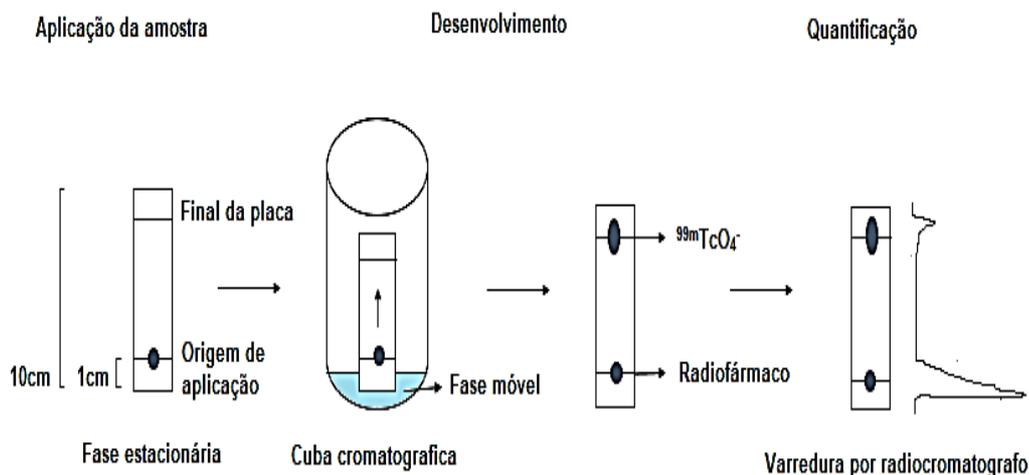
Fonte: A autora (2020).

### 3.2.3.2 Determinação do percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$

Para a determinação do percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  na solução filtrada, procedeu-se à análise por meio da cromatografia em papel, utilizando-se butanona, como fase móvel, e papel Whatman 3 mm, como fase estacionária. Neste sistema cromatográfico, o radiofármaco complexado fica retido no ponto de aplicação ( $R_f = 0$ ), enquanto o tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) migra até o fim do papel ( $R_f = 1,0$ ).

Uma alíquota de cada amostra, 2  $\mu\text{l}$  de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO ou  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX, foi aplicada a 1 cm da base do papel cromatográfico (cortado em tiras de 10 cm x 1,5 cm). As tiras foram acomodadas em cubas fechadas, contendo a fase móvel butanona, cujo nível esteve abaixo do ponto de aplicação da amostra. Aguardou-se até que a fase móvel percorresse todo o papel, até o limite desenhado no mesmo, conforme é ilustrado na Figura 15.

Figura 15 - Representação ilustrativa do sistema cromatográfico.



Fonte: A autora (2020).

Findada a corrida cromatográfica, as tiras de papel Whatman foram lidas em radiocromatógrafo, por dois minutos. Os percentuais de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  nas amostras foram calculados pela Equação 3.

$$\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- = \frac{\text{Contagens no fim da tira (Rf=1,0)}}{\text{Contagens totais na tira}} \times 100 \quad (3)$$

Fonte: NAQVI *et al.* (2018).

### 3.2.4 Teste de esterilidade

O teste de esterilidade dos radiofármacos foram analisados de acordo com os compêndios oficiais, por meio de inoculação direta. Diante disto, sob capela de fluxo laminar e materiais de apoio estéreis, 1 ml de cada amostra (após decaimento radioativo) foi aspirado e incorporado a tubos de ensaios contendo 10 ml de meio Caldo Triptona Soja - TSB (para cultura de bactéria aeróbicas, leveduras e fungos) e em meio líquido de tioglicolato (para cultivo de bactérias anaeróbicas e/ou aeróbicas). Posteriormente as amostras foram incubadas em estufa a  $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e  $33^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivamente, por um período de 14 dias. No final do processo de incubação a ausência do crescimento de microrganismos e turbidez claramente visíveis nos tubos de ensaio demonstram a esterilidade do teste.

### 3.2.5 Ressuspensão do Bioball

Foram utilizadas cepas dos micro-organismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*, liofilizadas e padronizadas (kit BioBall® MultiShot 550, bioMerieux), contendo de 500 a 600 unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 16).

Figura 16 - Kit BioBall® MultiShot 550.



Fonte: A autora (2020).

Para ressuspensão, as cepas liofilizadas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram vertidas em tubos falcon identificados com 10 ml de meio de cultivo TSB. Em seguida, os tubos foram homogeneizados manualmente e incubados em estufa a  $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 48 horas para crescimento bacteriano, como indicado pelo fabricante.

### 3.2.6 Internalização bacteriana *in vitro*

Os testes de internalização foram baseados nas metodologias descritas por OH *et al.* (2002) e por Shahzadi *et al.* (2015) para ciprofloxacina e para amoxicilina, respectivamente.

Em tubos do tipo Falcon contendo 70  $\mu\text{Ci}$  de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Antibiótico, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (Na-PB) em molaridades distintas: 0,1 M para ciprofloxacina e 0,2 M para amoxicilina. Em seguida, a estes tubos foram acrescidos 800  $\mu\text{L}$  de culturas bacterianas pré-estabelecidas contendo colônias entre 500 e 600 UFC de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ressuspensas em solução 50% (v/v) de ácido acético-NaPB (respeitando-se a molaridade descrita anteriormente). Incubou-se as amostras em estufa por 1

hora a 41°C, seguindo de centrifugação (15 min para *S. aureus* e 10 min para *P. aeruginosa*), a 2000 G.

Após esta primeira centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o pellet celular bacteriano foi ressuspendido em 1 ml de tampão Na-PB gelado, seguindo novamente para centrifugação, como citado acima. Para análise quantitativa, os sobrenadantes obtidos desta última centrifugação foram separados do pellet celular (cada fração em tubos falcon distintos) e a radioatividade de ambos foi medida em HPGe. Os percentuais de ligação das bactérias aos radiofármacos foram encontrados pela Equação 4.

$$\% \text{ Internalização} = \frac{\text{Contagens no pellet}}{\text{Contagens no sobrenadante} + \text{Contagens no pellet}} \times 100 \quad (4)$$

Fonte: SHAHZADI *et al.* (2015).

### 3.2.7 Análise estatística

Neste trabalho foram utilizados os softwares Excel 2013<sup>®</sup> e STATISTICA<sup>®</sup> versão 13.3, para análises estatísticas.

O Excel 2013<sup>®</sup> foi utilizado para obtenção de tabelas referentes a %EM e gráficos da taxa de internalização bacteriana.

O STATISTICA<sup>®</sup> foi utilizado para análise estatística dos dados referentes ao planejamento fatorial, por meio de gráficos (relacionados aos resultados das análises dos efeitos principais, de interação) e do teste ANOVA, descrevendo o comportamento das variáveis de controle e a relação entre elas, além de estimar os efeitos produzidos nas respostas observadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO

Para definição do procedimento de radiomarcção, foram feitas pesquisas de literatura a fim de definir os parâmetros mais importantes e determinantes para o rendimento de marcação. Estes parâmetros foram as concentrações de antioxidante, redutor e antibiótico. As buscas na literatura também permitiram o estabelecimento da faixa de variação para cada uma das variáveis. O experimento seguiu conforme desenho mostrado na Tabela 3.

A Tabela 4 mostra os resultados das sínteses para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e para  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX. As sínteses que obtiveram um maior percentual de EM encontram-se destacadas, sendo estas por sua vez escolhidas para realização dos testes subsequentes.

Tabela 4 - Matriz do experimento fatorial  $2^3$  para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX com resultado final.

	Ordem do teste	Antibiótico (mg)	Redutor ( $\mu\text{g}$ )	Antioxidante (mg)	(%) EM
$^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO	1	2	50	1	74,0
	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>50</b>	<b>1</b>	<b>90,2</b>
	3	2	150	1	18,3
	4	8	150	1	49,0
	5	2	50	2	72,0
	6	8	50	2	87,0
	7	2	150	2	36,2
	8	8	150	2	47,3
	9 (PC)	5	100	1,5	28,0
	10 (PC)	5	100	1,5	33,5
	11 (PC)	5	100	1,5	29,0
$^{99m}\text{Tc}$ -AMOX	1	2	50	1,5	90,3
	2	10	50	1,5	85,3
	3	2	200	1,5	58,9
	4	10	250	1,5	42,2
	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>92,4</b>
	6	10	50	3	86,9
	7	2	200	3	59,5
	8	10	250	3	65,0
	9 (PC)	6	125	2,25	57,0
	10 (PC)	6	125	2,25	58,0
	11 (PC)	6	125	2,25	55,9

Fonte: A autora (2020).

Assim, os maiores percentuais de eficiência de marcação alcançados foram de 90,2 e 92,4 para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e para  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX. Estes valores estão em acordo com às farmacopeias Americana (USP) e Europeia (EP), que preconizam que produtos radiofarmacêuticos radiomarcados ao elemento radioativo tecnécio podem apresentar impurezas de até 10% para fins radiodiagnósticos.

Estes valores também corroboram a conclusão de que desde a radiomarcação e comercialização de ciprofloxacina (SOLANKI *et al.*, 1993), até estudos mais recentes realizados por AULETTA *et al.*, (2019), altos rendimentos, >90%, para este radiofármaco são esperados. A mesma conclusão pode ser aplicada a marcação da Amoxicilina, segundo os achados de OZDEMIR *et al.*, (2015) e SHAHZADI *et al.*, (2015), onde altos rendimentos para este antibiótico também foram alcançados.

Quando tecnécio é eluído, está disponível com número de oxidação +7, não sendo capaz de se complexar diretamente aos fármacos, sendo necessária sua redução a níveis mais baixos de oxidação.

Inicialmente, para radiomarcação da ciprofloxacina, sob a forma de *infecton*, utilizou-se o agente redutor ácido sulfônico formamidina (FSA). Este redutor por sua vez quando utilizado para esta finalidade se fazia necessário uma etapa adicional de aquecimento. Além disso, por competir com o fármaco adicionado na preparação, resultava na formação de mais de uma forma química, sendo necessário realizar purificação por filtração, afim de aumentar a eficiência de marcação (BRITON *et al.*, 2002).

Devido a estas desvantagens de etapas adicionais no protocolo de marcação, que contribuía diretamente no aumento do tempo de manipulação, o agente redutor FSA foi substituído nos kit's comercializados pelo agente redutor tartarato estanoso, eliminando assim a etapa de aquecimento e purificação no processo de marcação.

O tartarato estanoso, por sua vez, também foi amplamente utilizado na clínica, no entanto, devido sua utilização estar associada a uma etapa adicional para utilização, aumentando o tempo de preparo, este redutor logo foi substituído por cloreto estanoso, sendo este o mais utilizado até os dias atuais para radiomarcação de fármacos com tecnécio. Isso se dá devido a fácil

disponibilidade, altos percentuais de eficiência de marcação atribuídos e por não necessitar de fases adicionais nos protocolos de marcação.

A quantidade de agente redutor presente nos protocolos de marcação de radiofármacos complexados ao tecnécio deve ser suficiente para que todo radionuclídeo seja reduzido e complexado, não se apresentando na forma de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Se faz importante ressaltar que a presença de oxigênio na preparação pode levar a oxidação do íon estanoso, de maneira que sua quantidade de interação com o tecnécio diminui, levando conseqüentemente ao aumento dos percentuais de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  no radiofármaco. Além disso, altas atividades de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  na presença de oxigênio podem causar radiólise da água ou de outros compostos como hidróxidos e peróxidos, aumentando a probabilidade de impurezas (ZIESSMAN *et al.*, 2014).

Caso o redutor seja adicionado em excesso na preparação reduzirá um percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  ao estado de oxidação +4 para formação do complexo, entretanto o restante poderá formar  $^{99m}\text{TcO}_2$ . Em contrapartida, a quantidade de redutor na preparação também deve ser a menor possível, já que este reagente se apresenta de forma tóxica quando utilizado em grandes proporções (ZIESSMAN *et al.*, 2014).

Em todas as sínteses desenvolvidas nesse trabalho, para os dois radiofármacos testados, as concentrações do agente redutor utilizadas mostraram-se suficientes para a redução de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Na Tabela 5 estão expressos todos os valores mensurados por activímetro para cada síntese, juntamente aos resultados encontrados nos cromatogramas obtidos por radiocromatógrafo (percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ).

Tabela 5 - Atividades mensuradas por activímetro e radiocromatógrafo durante a reprodução das sínteses de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

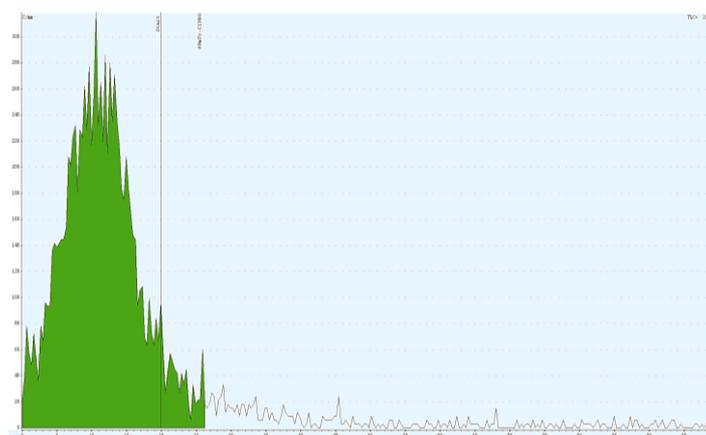
	Síntese	$A_i$ ( $\mu\text{Ci}$ )	$A_0$ ( $\mu\text{Ci}$ )	Filtro ( $\mu\text{Ci}$ )	Seringa ( $\mu\text{Ci}$ )	Frasco ( $\mu\text{Ci}$ )	% $^{99m}\text{TcO}_2$	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$
$^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO	1	612	363	136	10	80	26	0
	<b>2</b>	<b>620</b>	<b>584</b>	<b>60</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>9,8</b>	<b>0</b>
	3	620	62	474	10	30	81,7	0
	4	639	230	270	0	110	51	0
	5	553	397	130	0	90	28	0
	6	756	597	95	10	20	13	0
	7	570	121	314	0	78	63,8	0
	8	624	154	274	0	105	52,7	0
	9	561	121	298	51	98	72	0
	10	574	144	280	48	105	66,5	0
	11	553	125	274	45	122	70,9	0
$^{99m}\text{Tc}$ -AMOX	1	685	550	64	0	30	9,7	0
	2	610	527	90	0	0	14,7	0
	3	503	263	207	0	0	41,1	0
	4	511	261	290	0	10	57,8	0
	<b>5</b>	<b>683</b>	<b>641</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>7,6</b>	<b>0</b>
	6	757	660	94	0	40	13,1	0
	7	624	273	237	0	40	40,5	0
	8	725	555	247	10	10	35	0
	9	760	374	293	10	69	43	0
	10	788	393	297	10	72	42	0
	11	750	360	296	20	60	44,1	0

Onde:  $A_i$  = atividade inicial;  $A_0$  = atividade final.

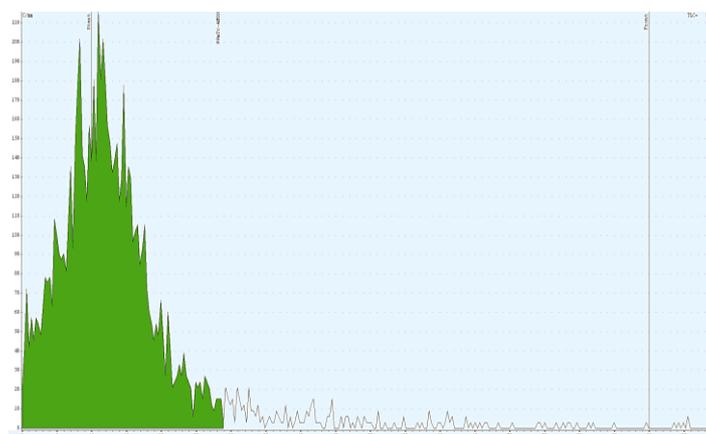
Fonte: A autora (2020).

Dessa forma, considerando-se os resultados obtidos neste estudo, o uso da massa de  $50\mu\text{g}$  de cloreto estano resultou uma eficiência de marcação  $>90\%$  para os dois radiofármacos testados, reduzindo a níveis mais baixos de oxidação todo o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  presente na preparação. Desta forma, esta concentração de redutor escolhida para continuidade dos estudos de marcação.

Como exemplos dos resultados obtidos neste trabalho, na Figura 17 são mostrados os cromatogramas referentes a  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e a  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX (Figura 17 A e Figura 17 B, respectivamente).

Figura 17 A - Cromatograma referente ao radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO.

Fonte: A autora (2020).

Figura 17 B - Cromatograma referente ao radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

Fonte: A autora (2020).

Nestes cromatogramas é possível identificar um único pico no ponto de aplicação da solução filtrada na placa cromatográfica, correspondendo ao antibiótico radiomarcado. Além disso, no final da placa, não são observados picos referentes à impureza  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ .

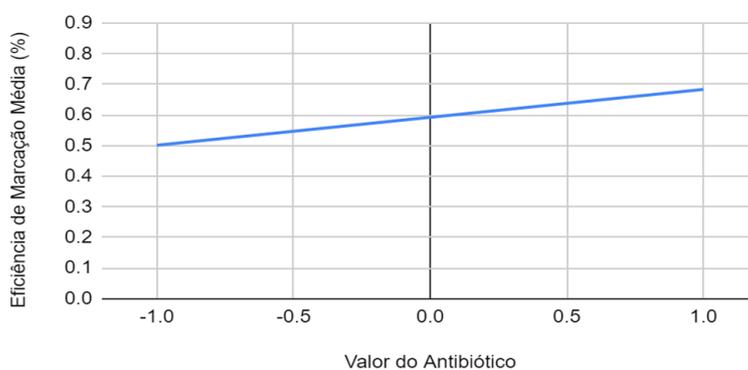
## 4.2 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Após a definição das combinações de variáveis, níveis e a quantidade de experimentos, as sínteses foram reproduzidas e o rendimento de cada reação foi calculado. Os resultados obtidos por meio do planejamento fatorial a partir das variáveis independentes estudadas na % EM dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e

$^{99m}\text{Tc}$ -AMOX foram processados no ambiente do software STATISTICA, expressos por meio de gráficos e pelo teste ANOVA.

Observando o gráfico da Figura 18, referente ao efeito da concentração do antibiótico ciprofloxacina na %EM, nota-se pela análise de inclinação da curva (coeficiente angular igual a 0,1825) do efeito que os maiores rendimentos foram observados com o valor do antibiótico em (8 mg), o que resultou em um efeito positivo no processo de síntese.

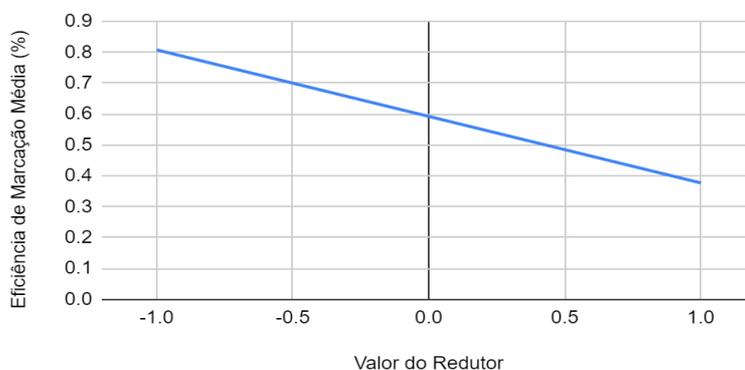
Figura 18 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “antibiótico” utilizada para aumento da % EM do antibiótico Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

Os resultados referentes a análise do efeito do redutor na %EM (Figura 19), demonstrou que quando este varia do limite inferior -1 (50  $\mu\text{g}$ ), para o limite superior +1 (150  $\mu\text{g}$ ), a %EM diminui (caracterizado pelo coeficiente angular da curva igual a -0,431), caracterizando um efeito negativo para esta variável.

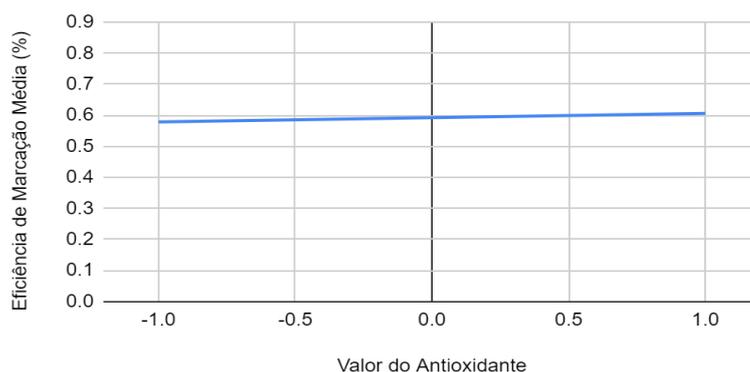
Figura 19 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “redutor” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

Contudo, a análise do efeito da variável antioxidante (Figura 20), indica uma reta (cujo coeficiente angular é igual a 0,0275) praticamente paralela ao eixo horizontal. Desta forma, pode-se concluir que o efeito desta variável foi nulo, ou seja, a variação do limite inferior -1 (1 mg) para o limite superior +1 (2 mg), não apresentou resultados positivos ou negativos no efeito de marcação.

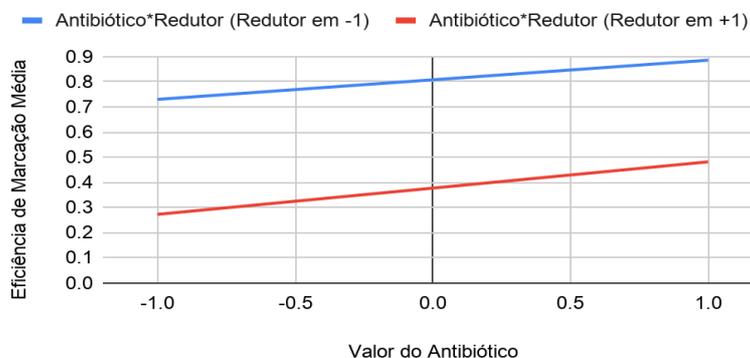
Figura 20 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “antioxidante” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

Em relação aos efeitos de interação, a Figura 21 demonstra a inclinação das curvas dos efeitos da combinação antibiótico/redutor nas sínteses. Desta forma, observa-se que devido ao paralelismo entre as retas (com redutor fixo em -1 e a outra fixo em +1) o efeito de interação entre estas duas variáveis não foram significativos.

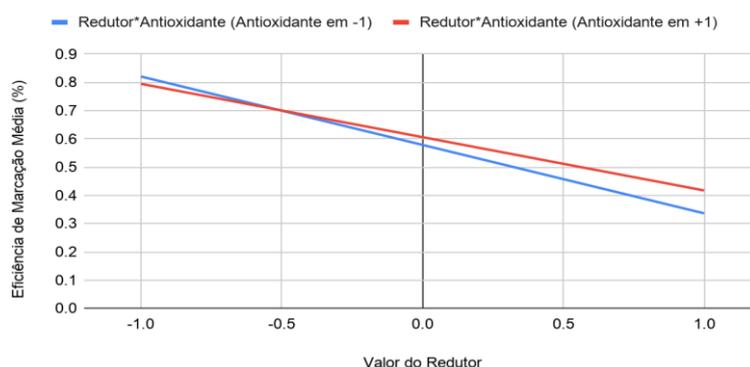
Figura 21 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/redutor para marcação da Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

A análise visual do efeito de interação do redutor/antioxidante, referente a Figura 22, embora as retas não sejam paralelas, não permite afirmar que há efeito desta interação, com o antioxidante fixo em -1 e +1. As incertezas do processo de medição podem estar influenciando este resultado, de modo que análises estatísticas complementares são necessárias.

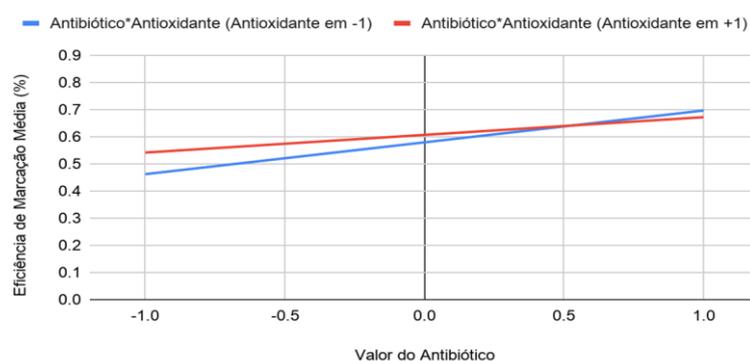
Figura 22 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis redutor/antioxidante para marcação da Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

Por fim, a última combinação foi realizada por meio das variáveis independentes antibiótico/antioxidante, como mostrado na Figura 23. Observa-se uma situação semelhante a da Figura 22.

Figura 23 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/antioxidante para marcação da Ciprofloxacina.



Fonte: A autora (2020).

Para concluir objetivamente quais efeitos são de fato significativos no planejamento fatorial foi realizado o cálculo da análise de variância (ANOVA) no ambiente do *software* STATISTICA. Neste trabalho foi considerado um limite de

confiança de 95%. Na Figura 24 são mostrados os resultados obtidos para Ciprofloxacina.

Figura 24 - Teste ANOVA para Ciprofloxacina.

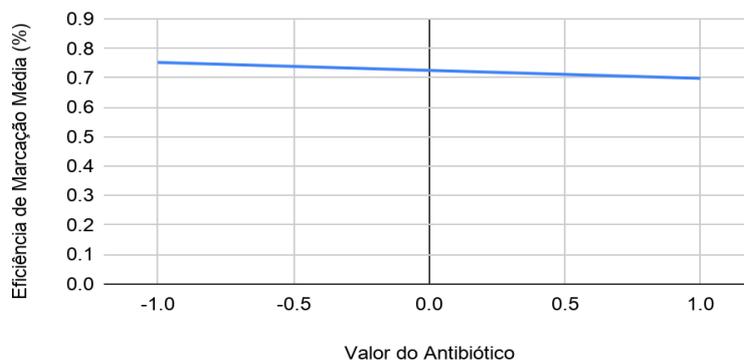
ANOVA; Var.:%E.M.; R-sqr=,70408; Adj: ,2602 2**(3) design CIPRO; MS Residual=475,1255. DV: %E.M.					
Fator	SS	df	MS	F	p
Antibiótico	666,125	1	666,125	1,401998	0,301943
Redutor	3715,220	1	3715,220	7,819451	0,048995
Antioxidante	15,125	1	15,125	0,031834	0,867065
Antibiótico*Redutor	14,045	1	14,045	0,029561	0,871839
Antibiótico*Antioxidante	54,080	1	54,080	0,113823	0,752794
Redutor*Antioxidante	57,245	1	57,245	0,120484	0,746003
Error	1900,502	4	475,125		
Total SS	6422,342	10			

Fonte: A autora (2020).

Por meio do teste ANOVA, observa-se que, embora as análises gráficas anteriores indicassem a possibilidade de significância de mais de um efeito, apenas a variável “reductor” apresentou um efeito significativo na síntese do antibiótico Ciprofloxacina, com valor de  $p$  menor que 0,05 ( $p = 0,048995$ ).

Em relação as análises realizadas para a Amoxicilina, a Figura 25, referente ao efeito da concentração da variável principal antibiótico, demonstrou pela inclinação da curva do efeito (-0,0542) que sua significância é praticamente nula, ou seja, a variação do limite inferior -1 (2mg) para o limite superior +1 (10mg), resultou em discreta variação no aumento da %EM.

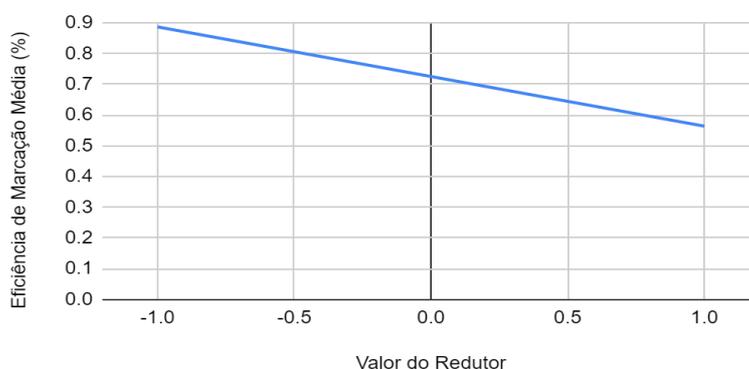
Figura 25 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “antibiótico” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

A análise do efeito da variável principal redutor para a síntese da amoxicilina apresentou resultados semelhantes aos obtidos para a síntese da ciprofloxacina, como mostrado na Figura 26. Ou seja, quando este varia do limite inferior -1, (50 µg), para o limite superior +1, (200 µg), a %EM diminui, caracterizando um efeito negativo. O que provavelmente indica que ao se utilizar menores concentrações do agente redutor nas sínteses, os percentuais de EM alcançam valores mais representativos.

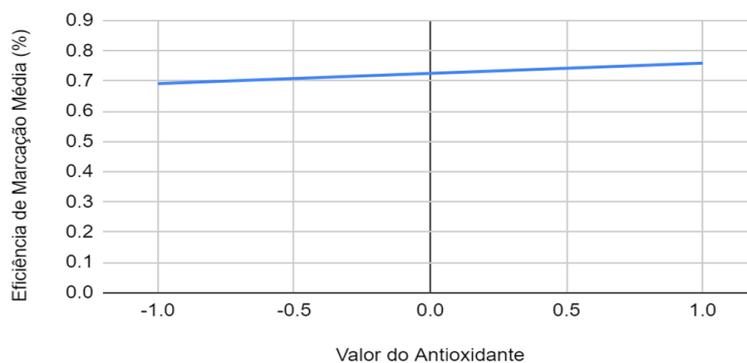
Figura 26 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “redutor” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

Outra variável principal que se comportou de forma similar a síntese da Ciprofloxacina foi a variável antioxidante, referente a Figura 27. Esta por sua vez também apresentou uma reta com discreta inclinação (coeficiente angular de 0,0678) com relação ao eixo horizontal, indicando provavelmente que a variação do limite inferior -1 (1,5mg) para o limite superior +1 (3mg) não resulta em importante variação no efeito de marcação, ou seja, o efeito foi praticamente nulo.

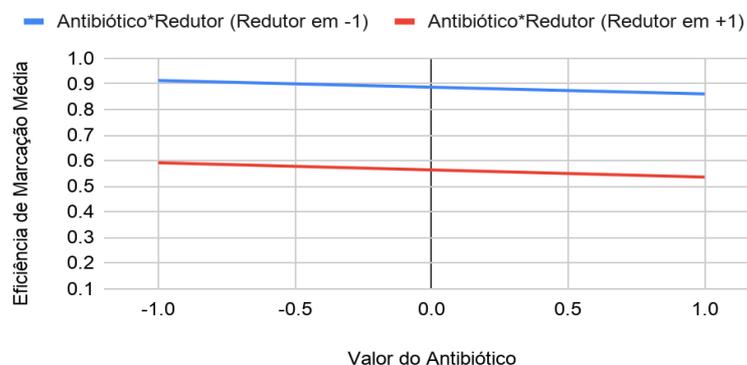
Figura 27 - Gráfico de análise do efeito principal da variável “antioxidante” utilizada para aumento da % E.M. do antibiótico Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

Em relação aos efeitos de interação, a Figura 28 demonstra a inclinação das curvas dos efeitos da combinação antibiótico/redutor. Por meio da análise gráfica, observa-se que o efeito dessa interação não foi significativo (com redutor fixo em -1 e fixo em +1), resultando em um efeito de interação nulo.

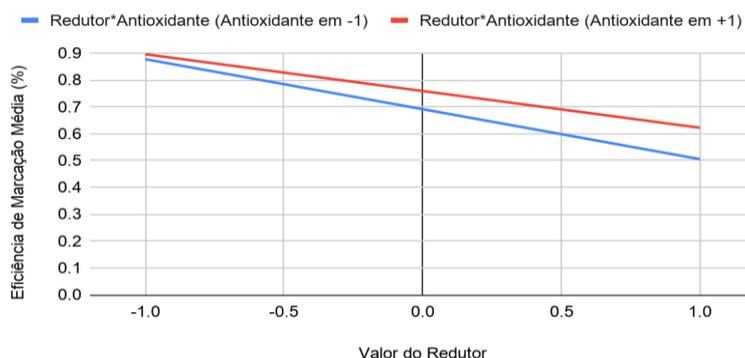
Figura 28 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiótico/redutor para marcação da Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

As análises do efeito de interação referentes a combinação redutor/antioxidante, Figura 29, também se apresentaram de forma muito parecida a síntese da Ciprofloxacina, ou seja, apenas pela análise visual, não se pode afirmar que há um efeito referente a essa combinação (nível do antioxidante fixo em -1 e +1).

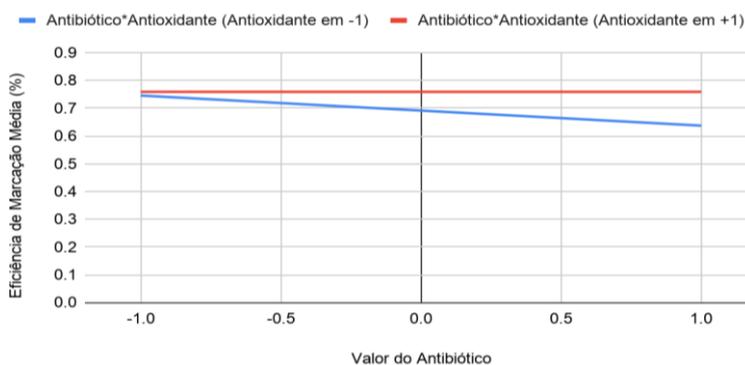
Figura 29 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis redutor/antioxidante para marcação da Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

Por fim, a análise de combinação das variáveis antibiotico/antioxidante é visualizada na Figura 30. Por meio desta, uma vez que as retas não são paralelas, não se pode descartar efeito dessa combinação, sendo necessários testes estatísticos complementares.

Figura 30 - Gráfico de análise dos efeitos combinados das variáveis antibiotico/antioxidante para marcação da Amoxicilina.



Fonte: A autora (2020).

A partir dos resultados dos percentuais de síntese alcançados para amoxicilina, foi feito o cálculo de ANOVA, utilizando o *software* STATISTICA, onde o valor  $p < 0,05$  também foi considerado como aceitável, resultando nos dados contidos na Figura 31.

Figura 31 - Teste ANOVA para Amoxicilina.

ANOVA; Var.:DV_ %E.M.; R-sqr=,7972; Adj:,49299 2**(3) design AMOX; MS Residual=149,3254 DV: %E.M.					
Fator	SS	df	MS	F	p
Antibiótico	58,861	1	58,861	0,39418	0,564171
Redutor	<b>2089,811</b>	<b>1</b>	<b>2089,811</b>	<b>13,99502</b>	<b>0,020104</b>
Antioxidante	91,801	1	91,801	0,61477	0,476825
Antibiótico*Redutor	0,061	1	0,061	0,00041	0,984812
Antibiótico*Antioxidante	58,861	1	58,861	0,39418	0,564171
Redutor*Antioxidante	48,511	1	48,511	0,32487	0,599183
Error	597,302	4	149,325		
Total SS	2945,209	10			

Fonte: A autora (2020).

É possível observar pelas análises gráficas anteriores e com confirmação do cálculo da análise de variância que unicamente a variável “reductor” teve efeito significativo ( $p = 0,020104$ ). Ao contrário do que a análise visual das figuras 30 e 31 poderiam indicar, nenhuma das demais variáveis principais ou efeitos de interação apresentaram efeitos significativos, uma vez que não alcançaram um valor de  $p$  menor do que 0,05.

#### 4.3 ESTERILIDADE

O teste de esterilidade apresentou resultados negativos para crescimento de microrganismos após 14 dias de incubação e monitoramento, tanto para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO, quanto para  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX. Isso permite assegurar que o radiofármaco se manteve isento de contaminação(estéril) após preparo.

#### 4.4 INTERNALIZAÇÃO BACTERIANA

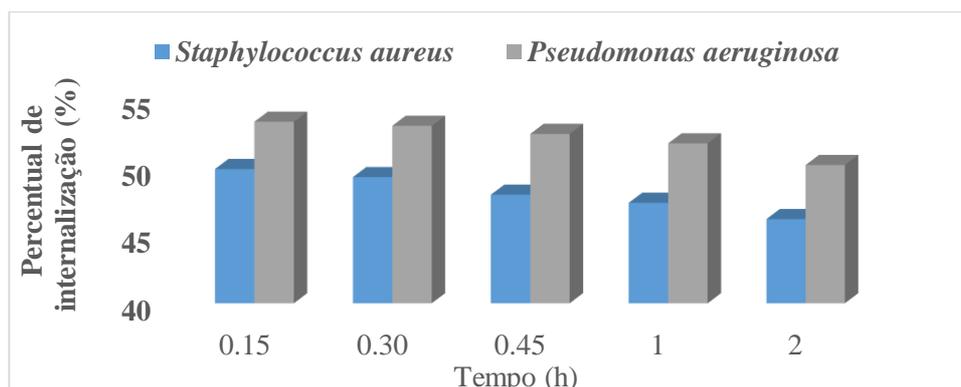
O comportamento dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX foram estudados *in vitro*, por meio de incorporação a cepas bacterianas de *S. aureus* e *P. aeruginos*, visando quantificar a taxa de ligação dos complexos em estudo a estes microrganismos. Estas bactérias foram escolhidas por se destacarem como sendo uma das principais ameaças a saúde mundial, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Na Figura 32 estão mostrados os resultados

obtidos para  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO, enquanto, na Figura 33, são apresentados os resultados para  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

Em relação a internalização do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO a *S. aureus*, foi alcançado um percentual de internalização superior a >50%; este percentual está acima dos reportados na literatura, por Auletta et al. (2019), Oh et al. (2002) e Sierra et al. (2008), iguais a 1,6%, 40% e 47,62%, respectivamente.

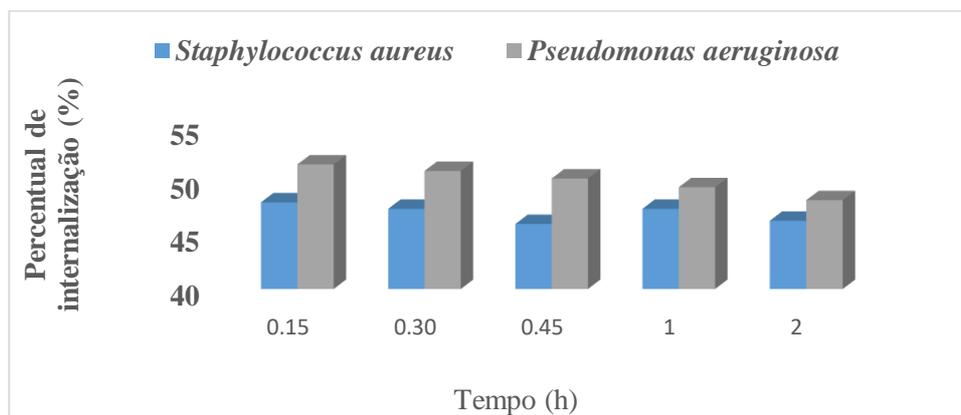
Para *P. aeruginosa*, os resultados obtidos foram inferiores aos encontrados nos estudos de Sierra et al. (2008), de 68,7%; no presente trabalho foi alcançando um percentual de aproximadamente 54%. Esta diferença pode ser justificada pela diferença nas linhagens de bactérias utilizadas ou mesmo pequenas diferenças nas condições empregadas nos ensaios de ligação e metodologias de centrifugação das bactérias.

Figura 32 - Ligação in vitro de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.



Fonte: A autora (2020).

Em contrapartida, a internalização do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX, foram obtidos percentuais de internalização próximos ou superiores a 50%. Entretanto, não foram encontrados artigos para comparação dos valores alcançados, mesmo a busca sendo expandida para outros antibióticos do mesmo grupo de beta-lactâmicos.

Figura 33 - Ligação in vitro de  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Fonte: A autora (2020).

## 5 CONCLUSÃO

A realização do planejamento fatorial neste trabalho otimizou o número de ensaios experimentais e conseqüentemente reduziu exposições desnecessárias as radiações ionizantes. Ciprofloxacina e amoxicilina são antibióticos de fácil aquisição, sendo susceptíveis de marcação rápida e eficiente ao  $^{99m}\text{Tc}$ , apresentando percentuais satisfatórios de internalização *in vitro* às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Neste trabalho, amoxicilina apresentou melhores resultados comparado a ciprofloxacina, atingindo uma eficiência de marcação de 92,4%. Convém destacar, entretanto, que durante as medidas para a determinação das eficiências de marcação, os valores referentes a radiação de fundo (BG) não foram considerados, sendo esta uma possível limitação deste estudo. Os ensaios de internalização a cepas bacterianas demonstraram que, possivelmente, ambos antibióticos, quando radiomarcados, podem ser utilizados para sinalizar processos infecciosos *in vivo*.

Como continuidade deste trabalho, sugere-se o estudo da estabilidade a fim de determinar o prazo de validade das soluções radiomarcadas bem como estudos *in vivo*, utilizando-se modelos animais de infecção.

## REFERÊNCIAS

AULETTA, S.; GALLI, F.; LAURI, C.; MARTINELLI, D., et al. **Imaging bacteria with radiolabelled quinolones, cephalosporins and siderophores for imaging infection: a systematic review**. *Clinical and Translational Imaging*. vol. 4, issue 4, pp 229–252, aug 2016.

ARAÚJO, E.B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.T.; MENGATTI, J. **Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 1, jan./mar. 2008.

ANDRADE, A. S. R. **Radiofármacos para diagnóstico de infecção**. Anais da 69ª Reunião Anual da SBPC - Belo Horizonte - MG - julho/2017. Disponível em: [http://www.sbpcnet.org.br/livro/69ra/PDFs/arq\\_5141\\_2681.pdf](http://www.sbpcnet.org.br/livro/69ra/PDFs/arq_5141_2681.pdf). Acesso em: 15 de jul. 2019.

AULETTA, S.; GALLI, C.; LAURI, C.; MARTINELLI, D., et al. **Imaging bacteria with radiolabelled quinolones, cephalosporins and siderophores for imaging infection: a systematic review**. *Clin Transl Imaging*. 4: 229-252. 18 jul, 2016.

AHMED, N.; FATIMA, S.; SAEED, M. A.; ZIA, M., et al.  **$^{99m}\text{Tc}$ -Ceftizoxime: synthesis, characterization and its use in diagnosis of diabetic foot osteomyelitis**. *J Med Imaging and Radiat Oncol*. 63 (1): 61-68. fev, 2019.

ABUDALKHALEQ L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M. et al. **The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review**. *Vet World*. 11(5): 627–635, may 2018.

AULETTA, S.; IODICE, V.; GALLI, F.; LEPAREUR, N. **Study of Binding Kinetics and Specificity of  $^{99m}\text{Tc}$ -SSS-Complex and  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO to Blood Cells**. *Contrast Media & Molecular Imaging*. Out, 2018.

AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmaceuticas). Universidade Fernando Pessoa, 2014.

BÍBLIA SAGRADA. Carta de Paulo aos Romanos. Traduzida em Português. João Ferreira de Almeida. Novo e Velho Testamento. Pág. 1230. Cap. 11. Vers. 36.

BOSCHI, A., UCCELLI, L., MARTINI, P. **A Picture of Modern Tc-99m Radiopharmaceuticals: Production, Chemistry, and Applications in Molecular Imaging**. *Journal Applied Sciences*. 21 jun, 2019.

BOSCHI, A.; MARTINI, P., PASQUALI, M.; UCCELLI, L. **Recent achievements in Tc-99m radiopharmaceutical direct production by medical cyclotrons**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(9), 1402–1412. 2017.

BRITTON, K. E.; WAREHAM, D. W.; DAS, S.S.; SOLANKI, K.K. et al. **Imaging bacterial infection with  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton)**. J Clin Patol. 55 (11):817-823. Nov, 2002.

BOLSHAKOV, A.; GARAPATSK, A.; GOLOVKOV, V. **Peculiarities Obtaining of 111 in using 120 cm Cyclotron**. Indian Journal of Science and Technology, Vol 8(36), dez, 2015.

COSTA, B.; ILEM-ÖZDEMİR, D.; OLIVEIRA, R. S. **Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: old chemistry for new products**. Journal of Coordination Chemistry. 09 jul, 2019.

COSTA, A.L.P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J. et al. **Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs**. Oncotarget. 23; 9(6): 7204–7218, jan 2018.

DIAS, L. A. P. **Desenvolvimento de um radiofármaco para marcação com Tc-99m para a identificação de infecção utilizando um peptídeo catiônico sintético**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, 2015.

DUIJKEREN, V.; SCHINK, E.; ROBERTS, A-K.; WANG, M. C., et al. **Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents**. Microbiology Spectrum, 6 (2), 2018.

**FLUORDESOXIGLICOSE- 18F: Radiofármaco**. São Paulo: IPEN, 2010. Bula.

FERNANDES, R. S.; SILVAA, J. O.; LOPES, S. C. A.; CHONDROGIANNIS, S. et al. **Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification**. Nuclear Medicine Communications. 23 out, 2015.

HARRIS, A.; CHANDRAMOHAN, S.; AWALI, R. A.; GREWAL, M., et al. **Physicians' attitude and knowledge regarding antibiotic use and resistance in ambulatory settings**. Am J Infect Con-trol. 26 mar, 2019.

IAEA- International Atomic Energy Agency. **Radiolabelled Autologous Cells: Methods and Standardization for Clinical use**. IAEA Human Health Series. No 5, 2015.

JANG, J.; HUR, H.-G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N. **Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review**. Journal of Applied Microbiology. mar, 2017 (b).

KONG, G.; SCHENBERG, T.; YATES, C. J.; TRAINER, A., et al. **The role of 68Ga-DOTA-Octreotate (GaTate) PET/CT in follow-up of SDH-associated pheochromocytoma and paraganglioma (PPGL).** J Clin Endocrinol Metab. 2019.

KUBO, A. L. S. L. **Avaliação crítica da exposição ocupacional externa nos serviços de medicina nuclear do brasil.** Tese (Doutorado em Radioproteção e Dosimetria) Instituto de Radioproteção e Dosimetria, Rio de Janeiro, dec, 2016.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T., et al. **O uso de anti-bióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução.** Rev Port Sau Pub. Vol 34, n 1. Mar, 2016.

LEE, H.H. **Basic Science of Nuclear Medicine – The bare bone Essentials,** SNMMI, 2015.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. **Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology.** Clinical Microbiology Reviews, 31 (4), 12 sep, 2018.

LAWAL, I.; ZEEVAART, J.; EBENHAN, T.; ANKRAH, A., et al. **Metabolic Imaging of Infection.** Journal of Nuclear Medicine. 17 ago, 2017.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL C. A. **Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de Tecnécio-99m e seus controles de qualidade.** Radiologia Brasileira, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MIÑANA, E.; ROLD, M.; CHIVATO, T.; MARTI, T. et al. **Quantification of the chromosomal radiation damage induced by labelling of leukocytes with [18F]FDG.** Nucl Med Biol. 42:720–723, 2015.

MARTINEZ, T.; GALLEGO P. M.; SANCHEZ, C. J.; PEREZ A. F., et al. **Validation of the leukocyte labeling procedure with a new kit for the preparation of technetium-99m exametazime injection.** Nuclear Medicine Communications. Vol 37 - Issue 4 - p 432–434, abr, 2016.

MIRSHOJAEI, S. F. **Advances in infectious foci imaging using 99mTc radiolabelled antibiotics.** J Radioanal Nucl Chem. 304:975–988, 17 mar, 2015.

MONTEIRO, L, O F.; FERNANDES, R.S.; CASTRO, L. C.; CARDOSO, V, N. et al. **Technetium-99 m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer *in vivo*.** Biomed Pharmacother. 89: 146–151, mai, 2017.

MONTGOMERY, D. C. **Diseño y análisis de experimentos.** Trad. por Jaime Delgado Saldivar. Mexico, Iberoamérica. 1991.

NAQVI, S. A. R., ROOHI, S., IQBALL, A., SHERAZI, T. A. et al. **Ciprofloxacin: from infection therapy to molecular imaging.** Molecular Biology Reports. 45 (5): 1457-146804, oct, 2018.

NAQVI, S. A. R.; DRLICA, K. **Fluoroquinolones as imaging agents for bacterial infection**. Dalton Transactions. Agost 2017.

NEVES, P.; BERKANE, E., GAMEIRO, P., WINTERHALTER, M., et al. **Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF**. Biophys.Chem. 113, 123-128, 2015.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. et al. **Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

OZDEMIR, D. I.; ORUMLU, O. C.; ASICOGLU, M.; OZKILIE, H. **Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-amoxicillin sodium as an infection imaging agent in bacterially infected and sterile inflamed rats**. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 308(3). Oct, 2015.

OH, S. J.; RYU, J-S.; SHIN, J.W.; YOON, E. J. et al. **Synthesis of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin by different methods and its biodistribution**. Applied Radiation and Isotopes. 57, 193-200, 2002.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Antibacterial agents in clinical development**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258965/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf;jsessionid=4544AE>. Acesso: 04 de jul, 2020.

POOLMAN, J. T.; ANDERSON, A. S. **Escherichia coli and Staphylococcus aureus: leading bacterial pathogens of health-care associated infections and bacteremia at older age**. Expert Review of Vaccines, 17 (7), 607-618, 2018.

PALESTRO, C. J. **Molecular Imaging of Infection: The First 50 Years**. Seminars in Nuclear Medicine. 25 out, 2019.

PATEL, P.; WALBORN, A.; RONDINA, M.; FAREED, J. ET AL. **Markers of Inflammation and Infection in Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation**. Clin Appl Thromb Hemost. 25:1076029619843338, dez 2019.

REILLY, R. M. Nuclear Medicine Imaging Technology. **Nuclear Medicine Imaging Technology**. Edit John Wiley and Sons Ltd. Cap. 3. P 27,37,38. Mar, 2019.

REIS, A. R. R. **Aquisição, Processamento e Análise de Imagens de Medicina Nuclear**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica e Biofísica Engenharia Clínica e Instrumentação Médica). Universidade de Lisboa, 2012.

ROSS, C. A.; DIAMOND, W. T. **Predictions regarding the supply of <sup>99</sup>Mo and <sup>99m</sup>Tc when NRU ceases production in 2018**. Phys. Can., 71, 131–138, 2015.

ROCA, M.; VRIES, E. F. J.; JAMAR, F.; ISRAEL, O. et al. **Guidelines for the labelling of leucocytes with <sup>111</sup>In-oxine**. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37(4): 835–841, apr. 2010.

RABILOTTA, C. C. **A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira.** Ver. Panam. Salud. Publica. V.20, n.23, p. 134-42, 2006.

RAMOS, D. R. **Aplicação de métodos quimiométricos em estudos de bioequivalência do antibiótico amoxicilina.** Dissertação (Mestrado em química). Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, 2008.

SILVA, C. C. O. **Dosimetria pré-clínica no desenvolvimento de novos radiofármacos através de simulações MONTE CARLO.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear (COPPE)) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisas em Engenharia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, fev, 2017.

SAHA, G. **Fundamental of Nuclear Pharmacy.** New York: Springer; 6<sup>th</sup> ed, nov. 2010.

SAHA, G. B. **Radiofármacos e Métodos Gerais de Radiomarcção.** In: **Fundamentos da Farmácia Nuclear.** Springer, Cham, 2018.

SEGARD, T.; LAURENCE M. J. A. M.; DUNNE, M. L.; ROBINSON, J. O. **Comparison between gallium-68 citrate positron emission tomography-computed tomography and gallium-67 citrate scintigraphy for infection imaging.** International Medicine Journal. Dec, 2018.

SALMANOGLU, E.; KIM, S.; THAKUR, M. L. **Currently Available Radiopharmaceuticals for Imaging Infection and the Holy Grail.** Seminars in Nuclear Medicine. 48 (2), 86-99. 2017.

SANTOS, P. A. A. L. M. **PET/CT em oncologia: contributo para a avaliação do seu interesse clínico usando moléculas marcadas com flúor-18.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde – Ramo Medicina), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, set. 2017.

SILVA, A. F.; BOLOGNESI, L. **PET com FDG-F<sup>18</sup>: administração da dose e preparo do paciente.** Tekhne e Logos, v.8, n.1, Botucatu, São Paulo, abr. 2017.

SILVA, A. F.; BOLOGNESI, L. **PET com FDG-F<sup>18</sup>: Administração da dose e preparo do paciente.** Tekhne e Logos, v.8, n.1, SP, abr, 2017.

SIGNORE, A.; ANZOLA, K. L.; AULETTA, S.; VARANI, M. **Current Status of Molecular Imaging in Inflammatory and Autoimmune Disorders.** Curr Pharm Des. 24(7):743-753, 2018.

SHAHZADI, S. K.; QADIR, M. A.; SHAHZAD, S.; JAVED, M. **<sup>99m</sup>Tc-amoxicillin: A novel radiopharmaceutical for infection imaging.** Arabian Journal of Chemistry. 29, abr, 2015.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibiótico Antibacterianos**. Porto, Fundação Fernando Pessoa. 2006.

SOLANKI, K. K.; BOMANJI J; SIRAJ Q. et al. **Tc-99m-Infecton: A new class of radiopharmaceutical for imaging infection**. *J Nucl Med*. 34. (supl): 119P, 1993.

SHIN, S. J.; BEECH, J. R.; KELLY, K. A. **Targeted nanoparticles in imaging: paving the way for personalized medicine in the battle against cancer**. *Integr Biol*. 5:29–42, 2013.

SIERRA, J. M.; RODRIGUEZ-PUIG, D.; SORIANO, A.; MENSA, J. et al. **Accumulation of <sup>99m</sup>Tc-Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(7): 2691–2692. Jul, 2008.

TOUAT, M.; OPATOWSKI, M.; BRUN-BUISSON, C. COSKER, K., et al. **A payer perspective of the hospital inpatient additional care costs of antimicrobial resistance in france: a matched case–control study**. *Applied Health Economics and Health Policy*. Vol. 17, issue 3, PP 381–389, jun 2019.

TAHARA, S. **Planejamento de experimentos** (doe). Disponível em: <http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/> Acesso em: 25 de out, 2020.

TSOPELAS, C. **Radiotracers Used for the Scintigraphic Detection of Infection and Inflammation**. *The Scientific World Journal*. vol. 2015, article ID 676719, fev. 2015.

VEIGA, J. M. P. **Conceitos e artefatos da marcação de células sanguíneas com Radiotraçadores e Radiofarmácos**. Disponível em: [https://www.apfh.pt/xFiles/scContentDeployer\\_pt/docs/articleFile184.pdf](https://www.apfh.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/articleFile184.pdf). Acesso: 09 de jul, 2019.

VRIES, E. F. J.; ROCA, M.; JAMAR, F; ISRAEL, O. et al. **Guidelines for the labelling of leucocytes with 99mTc-HMPAO**. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37:842–848, 2010.

VALLET, C. **Characterization of the active efflux of fluoroquinolones in eukaryotic cells**. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas e Biomédicas) - Université catholique de Louvain, 2012.

VINJAMURI, S.; HALL, A. V.; SOLANKI, K. K. et al. **Comparison of 99mTc infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection**. *Lancet*. 347(8996):233-235, 1996.

ZIESSMAN H. A.; O'MALLEY, J. P.; THRALL J. H.; FAHEY, F. H. **Medicina Nuclear**. Tradução da 4ª edição. Editora Elsevier Ltda. jun, 2014.

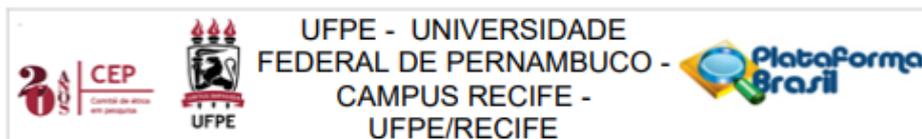
## APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Foram estudados diversos modelos cromatográficos para melhor definir os picos de diferentes espécimes radioativos que poderiam integrar a marcação dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX. Para esta finalidade, sistemas envolvendo fases móveis e fases estacionárias comumente utilizadas para avaliação de produtos radiofarmacêuticos complexados ao  $^{99m}\text{Tc}$  foram testadas. Na Tabela A são demonstrados as fases móveis, fases estacionárias e os fatores de retenção (Rf) dos espécimes radioativos da marcação dos radiofármacos.

Tabela A: Relação das fases móveis e fases estacionárias para determinação da Pureza Radioquímica de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO e  $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX.

	Rf Eluato	Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	Rf $^{99m}\text{TcO}_2$	Rf $^{99m}\text{Tc}$ -CIPRO	Rf $^{99m}\text{Tc}$ -AMOX
Papel Whatman 3mm/Acetona	0,8	0,7 – 0,9	0	0	-
Papel Whatman 3mm/Butanona	0,8 – 1	0,8 – 1	0	0 - 0,1	0 - 0,1
Placas de vidro TLC SilicaGel 60G/Gradiente (Etanol:H <sub>2</sub> O: NH <sub>2</sub> O (2:5:1))	1	0,9	0 – 0,05	0 – 0,06	-
Placas de vidro TLC SilicaGel 60G/Acetona	1	0,9	0 – 0,06	0 – 0,07	-

## ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDOS IN VITRO DE RADIOMARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS COM O TECNÉCIO-99M: APLICAÇÕES NA MEDICINA NUCLEAR

**Pesquisador:** OSANA DINIZ FERREIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26306019.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.824.434

#### Apresentação do Projeto:

O projeto para Dissertação de Mestrado intitulado "Estudos in vitro de radiomarcagem de células sanguíneas com o tecnécio-99m: aplicações na medicina nuclear" foi apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, pela estudante Osana Diniz Ferreira, sob a orientação da Profa Mércia Liane de Oliveira. Pesquisa experimental (in vitro), com delineamento do tipo explicativo/analítico e de cunho quantitativo e transversal. O projeto propõe estabelecer e aperfeiçoar protocolos e procedimentos de radiomarcagem de populações celulares (leucócitos totais e hemácias) com  $^{99m}\text{Tc}$ , a fim de, detectar precocemente sítios infecciosos e ocorrências de infarto (cardiopatias) de forma não invasiva. Para isolamento e radiomarcagem, será seguido o protocolo adaptado do guia "Células autólogas radiomarcadas: métodos e padronização para uso clínico" da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2015). Serão coletados com seringas estéreis, 18 ml de sangue periférico total, de 20 voluntários sadios (sem sintomatologia ou quadro clínico comprovado de cardiopatia e/ou hipertensão arterial). Realizar ensaios de isolamento (separação) e radiomarcagem in vitro das células do pool sanguíneo, a partir de amostras do sangue periférico total, a fim de constatar a eficiência de marcação, a viabilidade celular amostral e o rendimento total do estudo. Todos os ensaios de síntese e controle de qualidade da biomolécula  $^{99m}\text{Tc}$ -célula serão realizados na Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA) em colaboração com o Laboratório de Dosimetria

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br