

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

CRISTINA MARISA MOREIRA SERRA

**OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
 $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA
POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA
PERFUSÃO MIOCÁRDICA**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Antero Abrunhosa, do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), co-orientação científica do Professor Luís Metello, e orientação institucional da Professora Doutora Cristina Prudêncio, da escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESTSP).

Setembro, 2014

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Aos meus pais

“Quality is to a product, what character is to a man” – Steve Lentz

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento vai para o **Professor Luís F. Metello**, meu co-orientador de estágio, por ter acreditado nas minhas capacidades e me ter incentivado a descobrir a fantástica área da Medicina Nuclear. Agradeço, igualmente, por toda a disponibilidade e ajuda prestada sempre que necessitei.

Ao **Doutor Antero Abrunhosa**, meu orientador, agradeço a oportunidade de realizar o estágio no ICNAS, a carinhosa recepção na instituição, a boa disposição constante e o apoio disponibilizado.

Um agradecimento enorme e sentido à **Ângela Neves**, por ter sido incansável durante o período de estágio e fora dele, pela paciência, pela partilha de ideias e opiniões e pela simpatia, contribuindo para um ambiente de trabalho fantástico e para muita da aprendizagem que obtive no ICNAS.

A **Vítor Alves, Nuno Ferreira, Sérgio do Carmo e Ricardo Faustino** agradeço não só todo o auxílio prestado durante a execução de técnicas relevantes para os objectivos do trabalho, mas também a disponibilidade, atenção e paciência para esclarecerem as minhas dúvidas sempre que necessário.

Agradeço à **Lídia**, à **Joana**, ao **Pedro** e ao **Domingos** toda a carinhosa recepção no ambiente de trabalho da Medicina Nuclear, pelas palavras de incentivo e pela transmissão de conhecimentos, os quais contribuíram para um melhor entendimento desta área.

À Professora **Paula Gameiro**, por se ter mostrado disponível para me auxiliar, mesmo em tempo de férias, e pelas úteis dicas para este trabalho. À **Filipa** e à **Mariana** pela ajuda no laboratório.

Ao **Rui**, que contribuiu para que certos percalços técnicos fossem ultrapassados.

À **Professora Doutora Cristina Prudêncio**, minha orientadora institucional, e restantes elementos da **Área Técnico-Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas**, agradeço os conhecimentos transmitidos ao longo destes 2 anos de mestrado, o à-vontade com que sempre conviveram com os seus alunos e as lições que nos ensinaram.

Agradeço aos **colegas de mestrado** por todas as horas de convivência, partilha de experiências, pela companhia nas noites e dias de estudo na faculdade e pela amizade.

Um agradecimento aos meus amigos. Aos que estão longe devido à distância ou às circunstâncias e aos que estão aqui, bem perto. Aos que contribuem todos os dias para que cresça, amadureça e aprenda. Aos que me trazem carinho, sorrisos e abraços. Aos que me

apoiam. E àqueles que parecem surgir do nada, mas que estão sempre lá para mim. À **Cheila**, à **Élia**, ao **João Fernandes**, à **Vânia**, à **Bárbara** e ao **João**.

Ao **Vítor**, de forma carinhosa, pela felicidade que me proporciona, pelo apoio e pela paciência. Agradeço sinceramente a partilha de conhecimentos, de experiências e o companheirismo. Pelos sorrisos e gargalhadas constantes. Por tudo...

Por último, o mais especial agradecimento à minha família, principalmente aos meus **pais**, por sempre terem batalhado para que conseguisse alcançar os meus objectivos. Pelo apoio e amor incondicional. Ao meu **irmão** e às meninas dos meus olhos, **Lara** e **Luciana**.

Resumo

A par das patologias oncológicas, as doenças do foro cardíaco, em particular a doença arterial coronária, são uma das principais causas de morte nos países industrializados, devido sobretudo, à grande incidência de enfartes do miocárdio.

Uma das formas de diagnóstico e avaliação desta condição passa pela obtenção de imagens de perfusão miocárdica com radionuclídeos, realizada por Tomografia por Emissão de Positrões (PET). As soluções injectáveis de $[^{15}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$, $[^{82}\text{Rb}]$ e $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ são as mais utilizadas neste tipo de exame clínico.

No Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), a existência de um ciclotrão tem permitido a produção de uma variedade de radiofármacos, com aplicações em neurologia, oncologia e cardiologia. Recentemente, surgiu a oportunidade de iniciar exames clínicos com $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ para avaliação da perfusão miocárdica. É neste âmbito que surge a oportunidade do presente trabalho, pois antes da sua utilização clínica é necessário realizar a optimização da produção e a validação de todo o processo segundo as normas de Boas Práticas Radiofarmacêuticas.

Após uma fase de optimização do processo, procedeu-se à avaliação dos parâmetros físico-químicos e biológicos da preparação de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, de acordo com as indicações da Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) 8.2. De acordo com as normas farmacêuticas, foram realizados 3 lotes de produção consecutivos para validação da produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$. Os resultados mostraram um produto final límpido e ausente de cor, com valores de pH dentro do limite especificado, isto é, entre 4,5 e 8,5. A pureza química das amostras foi verificada, uma vez que relativamente ao teste colorimétrico, a tonalidade da cor da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ não era mais intensa que a solução de referência. As preparações foram identificadas como sendo $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, através dos resultados obtidos por cromatografia iónica, espectrometria de radiação gama e tempo de semi-vida. Por examinação do cromatograma obtido com a solução a ser testada, observou-se que o pico principal possuía um tempo de retenção aproximadamente igual ao pico do cromatograma obtido para a solução de referência. Além disso, o espectro de radiação gama mostrou um pico de energia 0,511 MeV e um outro adicional de 1,022 MeV para os fótons gama, característico de radionuclídeos emissores de positrões. O tempo de semi-vida manteve-se dentro do intervalo indicado, entre 9 e 11 minutos. Verificou-se, igualmente, a pureza radioquímica das amostras, correspondendo um mínimo de 99% da radioactividade total ao $[^{13}\text{N}]$, bem como a pureza radionuclídica, observando-se uma percentagem de impurezas inferiores a 1%, 2h após o fim da síntese. Os testes realizados para verificação da esterilidade e determinação da presença de endotoxinas bacterianas nas preparações de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ apresentaram-se negativos.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Os resultados obtidos contribuem, assim, para a validação do método para a produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, uma vez que cumprem os requisitos especificados nas normas europeias, indicando a obtenção de um produto seguro e com a qualidade necessária para ser administrado em pacientes para avaliação da perfusão cardíaca por PET.

Palavras-chave: Doença Arterial Coronária, Perfusão Miocárdica, $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, PET, ICNAS, Controlo de Qualidade, Validação

Abstract

Hand in hand with oncologic pathologies, cardiac diseases, in particular coronary artery disease, are one of the leading causes of death in industrialized countries, particularly due to the high probability of causing myocardial infarction.

A way to diagnose and evaluate this condition is obtaining images of myocardial perfusion with radionuclides, using Positron Emission Tomography (PET). Injectable solutions of $[^{15}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$, $[^{82}\text{Rb}]$ e $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ are the topmost used in this type of clinical exams.

The existence of a cyclotron at the Institute for Nuclear Sciences Applied to Health (ICNAS) has allowed the production of a variety of radiopharmaceuticals, with applications in the fields of neurology, oncology and cardiology. Recently, an opportunity to start clinical scans to evaluate myocardial perfusion has emerged. In this context arises the opportunity for this work, since it's necessary to optimize the production and validate all the process, according to Good Radiopharmaceutical Practices (GRRPs).

After an optimization of the process, we proceeded to the evaluation of the physicochemical and biological properties of $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, according to specifications of European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 8.2. According to European radiopharmaceutical regulations, 3 consecutives batches were performed for validation of $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ production. Results showed a clear and colorless final product for all batches and pH values were within the limit allowed, i.e., between 4,5 e 8,5. The chemical purity of the samples was confirmed by the colorimetric test, since we obtained for the $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ solutions a color tone that was not more intense that the one for the reference solution. The samples were identified as $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, through the results obtained by ionic chromatography, gamma ray spectroscopy and half-life. The examination of the chromatogram obtained with the test solution revealed a principal peak with an approximate retention time as the principal peak of the chromatogram obtained with the reference solution. Besides, the gamma ray spectrum showed a peak of 0,511 MeV and an additional peak of 1,022 MeV for gamma photons, which is characteristic of beta positronic radionuclides. The half-life results were within the specified range, between 9 e 11 minutes. We also confirmed the radiochemical purity of the samples, corresponding a minimum of 99% of total radioactivity to $[^{13}\text{N}]$, as well as their radionuclidic purity, for which we observed a percentage of impurities less than 1%, 2 hours after the end of synthesis. Tests for sterility and for presence of bacterial endotoxins in $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ batches were also negative.

Thus, results contribute to the validation of the method for production of $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, since they comply with specifications of European regulations for radiopharmaceuticals, and allow the production of a safe product, with the necessary quality to be administrated to

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

patients with suspicion of having coronary artery disease or already diagnosed, in order to evaluate myocardial perfusion by PET.

Keywords: Coronary Artery Disease, Myocardial Perfusion, $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, PET, ICNAS, Quality Control, Validation

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Abreviaturas e Acrónimos	xv
Índice de Tabelas	xvii
Índice de Figuras	xix
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Tomografia por Emissão de Positrões (PET).....	7
1.1. Princípios Gerais.....	7
1.2. Perspectiva Histórica	8
1.2.1. A Descoberta do Positrão	8
1.2.2. A Construção do Ciclotrão	9
1.2.3. Da Descoberta da Radioactividade Artificial à Produção de Radionuclídeos Através do Ciclotrão.....	10
1.2.4. Desenvolvimento da Tecnologia PET em Medicina Nuclear	11
1.3. Aplicações.....	11
1.4. Radionuclídeos.....	13
1.4.1. Radionuclídeos para Avaliação da Perfusão Miocárdica	13
2. $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	14
2.1. Métodos de Produção.....	14
2.2. Metabolismo e Mecanismos de Retenção no Local Alvo.....	15
3. Controlo de Qualidade e Garantia de Qualidade de Radiofármacos.....	15
3.1. Princípios Actuais de Boas Práticas de Fabrico (cGMP) vs Boas Práticas de Radiofarmácia (cGRPP).....	16
3.2. Regulamentação para Radiofármacos – Farmacopeia Europeia.....	18
3.3. Critérios de Controlo de Qualidade	19
3.3.1. Aparência e pH.....	19
3.3.2. Pureza Química.....	19

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

3.3.3. Pureza Radioquímica.....	20
3.3.4. Pureza Radionuclídica.....	20
3.3.5. Esterilidade.....	21
3.3.6. Teste de Endotoxinas Bacterianas.....	21
Objectivos:.....	23
CAPÍTULO II - MÉTODOS.....	25
Introdução.....	27
1. Produção do Radionuclídeo e Síntese Radioquímica.....	27
2. Teste da Integridade do Filtro.....	28
3. Controlo de Qualidade da Solução Final de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	29
3.1. Controlo das Propriedades Físico-Químicas.....	29
3.1.1. Aparência.....	29
3.1.2. Valor de pH.....	29
3.1.3. Pureza Química.....	30
3.1.5. Identificação e Determinação da Pureza Radionuclídica da solução de $^{13}\text{N-NH}_3$ 34	
3.1.5.1. Determinação da Semi-vida.....	34
3.1.5.3. Impurezas após Decaimento.....	36
3.1.6. Determinação da Radioactividade.....	36
3.2. Controlo das Propriedades Biológicas.....	36
3.2.1. Esterilidade.....	36
3.2.2. Teste para Presença de Endotoxinas Bacterianas.....	37
4. Análise Estatística.....	37
CAPÍTULO III - RESULTADOS.....	39
1. Avaliação das Propriedades Físico-Químicas da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	41
1.1. Aparência da Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	41
1.2. pH da Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	41
1.3. Pureza Química.....	42
1.4. Identificação e Determinação da Pureza Radioquímica da Solução de $^{13}\text{N-NH}_3$...	43
1.5. Identificação e Determinação da Pureza Radionuclídica da Solução de $^{13}\text{N-NH}_3$.	48
1.5.1. Semi-Vida.....	48

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

1.5.2.	Espectro das Radiações Gama.....	49
1.5.3.	Impurezas Emissores Gama.....	49
2.	Controlo Biológico da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	50
2.1.	Esterilidade.....	50
2.2.	Teste de Endotoxinas Bacterianas.....	51
2.2.1.	Confirmação da Sensibilidade Declarada do Lisado.....	51
2.2.2.	Gelificação nas Amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	51
3.	Outros Testes de Controlo de Qualidade da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	51
3.1.	Integridade do Filtro.....	51
3.2.	Radioactividade.....	52
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO.....		53
CONCLUSÃO.....		63
Conclusão e Perspectivas Futuras.....		65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		67
Referências Bibliográficas.....		69

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Abreviaturas e Acrónimos

CAS - Cromazurol S

cGMP (do inglês *current Good Manufacturing Practices*) - Boas Práticas de Fabrico actuais

cGRPP (do inglês *current Good RadioPharmacy Practice*) - Boas Práticas de Radiofarmácia actuais

CQ - Controlo de Qualidade

HPIC (do inglês *High-Pressure Ion Chromatography*) - Cromatografia Iónica de Alta Pressão

EANM (do inglês *European Association of Nuclear Medicine*) - Associação Europeia de Medicina Nuclear

EDQM (do inglês, *European Directorate for Quality of Medicines*) - Direcção Europeia para a Qualidade dos Medicamentos

FDA - *Food and Drug Administration* – Autoridade Americana da Alimentação e do Medicamento

FPV - *Final Product Vial* – Frasco para injectáveis com o produto final

GQ - Garantia de Qualidade

ICNAS - Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde

LAL (do inglês *Limulus Amebocyte lysate*) - lisado dos amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*

LPS - Lipopolissacarídeos

NIR – *Near Infra-red* – Infra-vermelho próximo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PET (do inglês *Positron Emission Tomography*) - Tomografia por Emissão de Positrões

pH - Potencial de Hidrogénio

Ph. Eur. – Farmacopeia Europeia

ppm - partes por milhão

SOPs (do inglês *Standard Operating Procedures*) – Procedimentos operacionais padrão

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

TBA - *tetrabutylammonium*

t_{1/2} - Tempo de semi-vida

EU – União Europeia

UE – Unidades de Endotoxina

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

Índice de Tabelas

Tabela I - Composição das soluções utilizadas para determinação da pureza química das amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	31
Tabela II - Resumo das condições experimentais utilizadas durante a execução do trabalho, em comparação com as especificações indicadas na farmacopeia.	33
Tabela III -Valores de pH obtidos para os diferentes lotes de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	42
Tabela IV - Dados obtidos para o tempo de retenção e percentagem de área dos picos adquiridos com as amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e o respectivo padrão, utilizando detectores de condutividade e de radioactividade, para análise num sistema de HPIC.	43
Tabela V - Resultados adquiridos para a comparação entre o pico principal dos cromatogramas obtidos com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e o pico principal do cromatograma obtido com a solução de referência (NH_3).....	45
Tabela VI - Valores obtidos para o $T_{1/2}$ das amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e respectivos desvios para o $t_{1/2}$ alvo (9,96 min).....	48
Tabela VII - Percentagem de impurezas radionuclídicas presentes nas amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	50
Tabela VIII - Pressão à qual ocorre formação de bolhas de água, obtida para os filtros utilizados nos três últimos ensaios.....	52
Tabela IX - Valores de actividade obtidos para os três últimos ensaios, medidos através de calibrador de doses, no fim da síntese (EOS).....	52

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Índice de Figuras

Figura I - Imagem obtida por CT e PET/CT com $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, respectivamente, para avaliação de carcinoma de células escamosas bucal (Syed et al. 2005).	8
Figura II - Representação esquemática do modo de operação do ciclotrão patenteado por Lawrence, em 1934 (Lawrence, 1934).	10
Figura III - Representação esquemática do processo de produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	28
Figura IV - Representação do processo de averiguação da integridade do filtro aplicado na filtração da amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (Adaptado de Millipore, n.d.).	29
Figura V - Estrutura química do Cromazurol S (Adaptado de Sigma-Aldrich, n.d.).	31
Figura VI - Representação da interface principal de um contador de poço (Adaptado de Capintec, 2013).	35
Figura VII - Imagem representativa do aspecto da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, analisada por inspeção visual, através de vidro plumbíneo.	41
Figura VIII - Imagem representativa do resultado obtido no teste colorimétrico utilizado para determinação da presença de alumínio nas amostras (n=6). 1 – Solução de referência; 2 – Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$	42
Figura IX - Radiocromatograma representativo da injeção de uma solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, no sistema de HPIC, para uma corrida de 20 minutos. Tempo de retenção = 6.30 minutos.	43
Figura X - Cromatograma representativo da injeção de uma solução de referência (NH_3), no sistema de HPIC, para uma corrida de 20 minutos. Tempo de retenção = 5,94 minutos.	44
Figura XI - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NaNO_2 no sistema de HPIC, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção – 4,67 minutos.	46
Figura XII - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NaNO_2 no sistema de HPIC, utilizando o detector UV. UVA – Comprimento de onda de 210 nm. UVB – Comprimento de onda de 254 nm. Tempo de retenção UVA – 5.02 minutos; Tempo de retenção UVB – 5.00 minutos.	46

- Figura XIII** - Cromatograma obtido após injeção de 20 μL no sistema HPIC de uma solução de NaCl 0,9%, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção – 4,17 minutos.47
- Figura XIV** - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NH_3 no sistema de HPIC, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção NH_3 – 4,91 minutos; Tempo retenção impureza – 4,12 minutos.....48
- Figura XV** - Imagem representativa do espectro de radiação gama do produto final. Pico principal a 0,511 MeV e adicional correspondente a 1,022 MeV.49
- Figura XVI** - Imagem representativa do espectro de radiação gama obtido 2h após a síntese radioquímica, para as amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$50

INTRODUÇÃO

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Introdução

As patologias cardiovasculares e oncológicas constituem, actualmente, as duas principais causas de morte em toda a Europa e a nível mundial (WHO, 2012; CDC, 2013). Fundamental para o sucesso da terapêutica nestas afecções é a sua detecção precoce e uma correcta avaliação das condições fisiológicas subjacentes. Neste contexto, a Medicina Nuclear - inicialmente através da técnica SPECT (do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*) e, actualmente, também através da PET (*Positron Emission Tomography*) - assume uma particular relevância, directamente reflectida no maior e mais consistente crescimento na história da Imagiologia Médica, verificado especificamente por esta última técnica – PET. Sendo não invasiva, esta técnica, no caso particular da oncologia, providencia não só uma excelente ferramenta de diagnóstico, de estadiamento e de localização de metástases, como possui, igualmente, um papel cada vez mais relevante no planeamento do tratamento em Radioterapia (Zheng et al., 2014), auxiliando tanto na selecção da terapêutica mais adequada, como na monitorização dos resultados obtidos. Além das vantagens supracitadas, a utilização da Medicina Nuclear em geral e da tecnologia PET em particular permite ainda a redução do número e da extensão das intervenções cirúrgicas e, consequentemente dos custos e problemas associados.

A PET tem sido amplamente utilizada não só em oncologia (Hutchings et al. 2006), mas igualmente em neurologia, para diagnóstico e caracterização de doenças como a de Alzheimer (Rabinovici et al., 2007) ou de Parkinson (Peng et al., 2013), e cardiologia, onde é utilizada para estudos de perfusão miocárdica e consequente diagnóstico, avaliação da extensão e prognóstico de doença cardíaca, principalmente da doença arterial coronária (Namdar et al., 2005). Outras áreas têm beneficiado, igualmente, dos estudos efectuados com PET, nomeadamente a avaliação e monitorização de inflamação e infecção, como o que pode acontecer em doentes com fibrose cística (Klein et al., 2009).

Os radioisótopos emissores de positrões utilizados em PET são raramente produzidos por um dispositivo médico específico (designado por “gerador de radioisótopos”) e mais frequentemente produzidos em ciclotrão, um tipo de acelerador de partículas, e depois combinados com vectores fisiológicos, geralmente num módulo de síntese automatizado, para dar origem ao produto final, o radiofármaco. No caso específico da doença cardíaca, um dos radiofármacos que pode ser utilizado para avaliação da perfusão miocárdica é a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$. Tal como o que está definido para todos os produtos farmacêuticos, antes da sua administração ao paciente, a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e os restantes radiofármacos devem ser sujeitos a um processo de controlo de qualidade, de modo a garantir a segurança do paciente e a obtenção de um produto que satisfaz aos objectivos para os quais é gerado.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

No Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS) a produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ para fins comerciais ou para utilização em exames realizados nas instalações ainda se encontra em desenvolvimento. Para esse efeito, é necessário efectuar, primeiramente, a validação do seu método de produção, através de um processo de controlo dos parâmetros físico-químicos e biológicos, de modo a tornar possível a avaliação da perfusão miocárdica por PET, sem recorrer a outros radiofármacos cuja imagem pode possuir uma precisão e qualidade menor, comparativamente a imagem obtida através do uso de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Numa primeira fase deste estudo procedeu-se à optimização do processo de produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, e, posteriormente, à sua validação, através dos testes indicados na Ph. Eur..

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

1. Tomografia por Emissão de Positrões (PET)

1.1. Princípios Gerais

A Tomografia por Emissão de Positrões (PET) é uma técnica imagiológica não invasiva da Medicina Nuclear, que fornece informação tridimensional acerca dos processos funcionais de um ou mais órgãos ou sistemas. É, normalmente, constituído por uma série de detectores dispostos em forma de anel à volta da zona de interesse do indivíduo que efectua o exame. O sistema baseia-se na detecção simultânea de um par de fotões de radiação gama de 511 KeV que circulam em direcções opostas, resultantes da aniquilação entre um positrão emitido por um radionuclídeo e um electrão do meio. Uma quantidade elevada de eventos de aniquilação constitui condição necessária para a obtenção de dados relevantes. Através de equações matemáticas e algoritmos, os dados recolhidos referentes ao local onde ocorrem estes eventos num determinado espaço de tempo são reconstruídos por um sistema informático dedicado, permitindo a obtenção de imagens bi e tridimensionais. O radionuclídeo é administrado juntamente com uma molécula biologicamente activa, o traçador, que funciona como sonda para o local onde se pretende obter informação dos processos bioquímicos que aí ocorrem.

Uma parte da via metabólica (ou do processo bioquímico) é traçada, de modo a que uma análise cinética possa ser utilizada para obter uma estimativa da concentração dos produtos iniciais e finais ao longo do tempo e, no fim, uma imagem da taxa a que o processo ocorre. Em casos de doença, podem ser identificadas alterações funcionais que levam ao seu diagnóstico, prognóstico e avaliação da eficácia e adequação da terapêutica, nomeadamente. O radiofármaco é produzido utilizando isótopos de elementos de baixa massa atómica, facilmente encontrados biologicamente, como azoto (N), carbono (C) e oxigénio (O), pelo que o processo biológico não sofre interferência. A disseminação generalizada de versões cada vez mais simplificadas, fiáveis e automatizadas do ciclotrão, assim como o aparecimento e a adopção de sistemas automatizados de síntese radioquímica tem permitido a produção mais rápida e simples de radiofármacos para PET.

A hibridação da PET com a Tomografia Computadorizada – CT (do inglês *Computed Tomography*) num só aparelho e exame representa uma valiosa vantagem na obtenção de imagem através desta tecnologia, uma vez que reúne as imagens com informação funcional obtidas por PET com as imagens anatómicas fornecidas por CT (adquiridas através do processamento por computador de secções do corpo submetidas a vários raios X), levando à formação de um terceiro tipo de imagem com maior resolução e contraste, onde se pode observar facilmente a actividade metabólica e o local onde as lesões ou anormalidades se

encontram (Syed et al. 2005), contribuindo, conseqüentemente, para um melhor diagnóstico e avaliação médica da condição do paciente (Figura I).

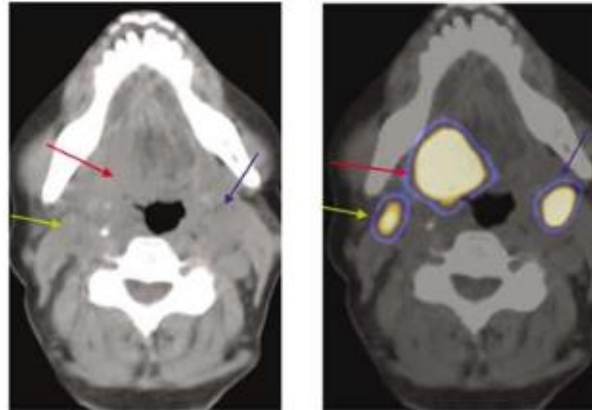


Figura I - Imagem obtida por CT e PET/CT com $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, respectivamente, para avaliação de carcinoma de células escamosas bucal (Syed et al. 2005).

1.2. Perspectiva Histórica

1.2.1. A Descoberta do Positrão

Em 1928, o físico britânico Paul Dirac postulou a existência de partículas com a mesma massa do electrão, mas com carga oposta, os electrões positivos, com base em equações de mecânica quântica e na teoria da relatividade de Einstein (Dirac, 1930). Propôs, igualmente, que estas partículas poderiam transitar para um estado não ocupado de energia negativa, provocando o seu desaparecimento e o dos electrões, sendo a energia libertada sob a forma de radiação. Quatro anos depois, em 1932, o físico experimental Carl D. Anderson provou a veracidade das previsões teóricas de Dirac, quando permitiu que raios cósmicos passassem através de um detector de partículas, a câmara de Wilson (*Wilson cloud chamber*) e de uma placa de chumbo, sob a acção de um forte campo magnético. Anderson verificou que o rasto deixado pelos positrões apareciam na placa fotográfica com uma curvatura correspondente a uma razão massa/carga igual à de electrões, mas na direcção da parte da placa carregada negativamente, indicando a sua carga positiva (CD Anderson, 1932). A estas partículas, Anderson denominou de positrões (electrões positivos) e alegou que derivavam da acção de protões. No entanto, meses antes, Frédéric e Irène Joliot-Curie tinham já obtido evidências da sua existência em placas fotográficas, mas fracassaram o mesmo propósito por falha na interpretação do significado do rasto produzido pelo movimento da partícula na

câmara de Wilson, uma vez que os identificaram como partículas semelhantes a electrões (Leone & Robotti, 2010).

1.2.2. A Construção do Ciclotrão

Ainda antes da descoberta do positrão e da construção do ciclotrão, foram realizadas tentativas no sentido de acelerar partículas. Em 1919, no Laboratório Cavendish, em Cambridge, Ernest Rutherford conseguiu converter um núcleo de azoto em oxigénio, através do bombardeamento com partículas alfa (Eisenberg, 1992), isto é, com núcleos de átomo de hélio, compostos por 2 neutrões e 2 protões. A partir deste método, outros isótopos de elementos comuns foram obtidos. O grupo de trabalho de Rutherford descobriu, igualmente, que as partículas alfa induziam mais transmutações, através de reacções nucleares, à medida que a sua velocidade de movimento aumentava (Heilbron & Seidel, 1989), pelo que a partir daqui se começou a investigar a construção de aceleradores de partículas.

O uso de um tubo de raios x com altas voltagens foi a primeira tentativa de provocar a aceleração de partículas. Mais tarde, em 1932, John Cockcroft e Ernest Walton desenvolveram um tipo de acelerador de partículas de alta voltagem capaz de produzir protões com uma energia suficiente para uma transformação nuclear. Com este equipamento, conseguiram obter berílio, por bombardeamento de lítio com um protão (Eisenberg, 1992). O berílio depois dividia-se em dois núcleos de hélio (com dois protões cada).

Contudo, em 1931, o físico norte-americano Ernest Lawrence tinha já desenvolvido o ciclotrão em Berkeley, Universidade da Califórnia um acelerador cíclico de partículas que permitia a sua aceleração numa trajectória espiral. Da sua constituição fazia parte duas estruturas condutoras cilíndricas em forma de “D”, colocadas sob a acção de um campo magnético uniforme, perpendicular a elas. As partículas eram aceleradas numa trajectória espiral, com vista à obtenção de partículas de alta energia, utilizando baixas voltagens (Lawrence & Livingston, 1932). Estas partículas poderiam ser utilizadas para bombardear elementos químicos e explorar o seu núcleo.

O ciclotrão original sofreu diversos aperfeiçoamentos ao longo do tempo, principalmente ao nível do seu tamanho, com a utilização de estruturas condutoras cada vez maiores, permitindo o aumento da velocidade de aceleração.

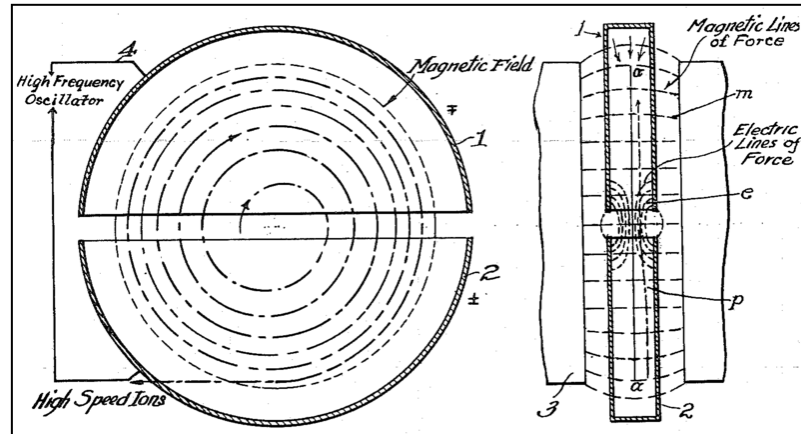


Figura II - Representação esquemática do modo de operação do ciclotrão patenteado por Lawrence, em 1934 (Lawrence, 1934).

1.2.3. Da Descoberta da Radioatividade Artificial à Produção de Radionuclídeos Através do Ciclotrão

Pouco tempo após a descoberta de Anderson, Patrick Blackett e Giuseppe Occhialini comprovaram a existência dos positrões e relacionaram-na com a hipótese do anti-electrão postulada por Dirac (Blackett & Occialini, 1933). Irène e Frédéric Joliot-Curie demonstraram que os positrões derivavam da absorção de raios gama por parte da placa de chumbo que tinha sido colocada na câmara de Wilson em frente a uma fonte de Polônio/Berílio (Curie & Joliot, 1933). Estes resultados foram explicados à luz do processo que ficou conhecido como produção de pares. Este processo caracteriza-se pela criação simultânea de uma partícula e da sua anti-partícula, neste caso de um par de electrões positivo e negativo, resultante da interacção entre um fotão de alta energia e o núcleo de um átomo. Para tal ocorrer, é necessária uma energia superior a 1,022 MeV. O positrão encontra facilmente na matéria um electrão, ocorrendo a sua aniquilação e consequente libertação de dois fotões gama, cada um com uma energia 0,511 MeV, de acordo com a equação formulada por Einstein, $E= mc^2$.

Em 1934, o casal Joliot-Curie verificou que após o bombardeamento de alumínio, boro e magnésio com partículas alfa, os positrões continuavam a ser emitidos, mesmo após a remoção da fonte de bombardeamento (Curie & Joliot, 1934). Deduziram, para o caso do núcleo de alumínio, que o seu bombardeamento com partículas alfa levava à formação de um núcleo instável de fósforo, com emissão de um neutrão como radiação. Foi a primeira produção artificial de um isótopo. A partir daqui, utilizando o ciclotrão, começaram a ser produzidos, em quantidades significativas, isótopos radioactivos, como carbono-11, azoto-13,

flúor-18 e oxigénio-15 (Wagner, 1998), que constituem, até hoje, alguns dos principais isótopos utilizados ao nível da medicina e da investigação.

Quatro anos depois, em 1938, a equipa de Lawrence, em Berkeley, teve acesso a financiamento para a construção de um “ciclotrão médico”, o que permitiu a produção eficiente de grandes quantidades de radioisótopos, com recurso ao bombardeamento com prótons de alta energia, neutrões e partículas alfa. Foi possível, igualmente, a obtenção de produtos criados pelo homem, como é o caso do tecnécio-99 (^{99}Tc) e do seu isómero metaestável nuclear, tecnécio-99m, isolado, acidentalmente, após o bombardeamento de molibdénio natural (^{99}Mo), existente no ciclotrão (Heilbron et al. 1996). O iodo-131 é outro exemplo de um isótopo produzido artificialmente.

1.2.4. Desenvolvimento da Tecnologia PET em Medicina Nuclear

Apesar de terem sido produzidas várias versões de detectores de positrões nos anos 50, estas não possuíam sensibilidade suficiente para a obtenção de imagens úteis para diagnóstico. Na década seguinte, David E. Kuhl e Roy Edwards propuseram um conceito para evidenciar uma imagem do seu plano de fundo, que iria mais tarde dar origem a vários instrumentos e técnicas tomográficas (Kuhl & Edwards, 1963). Em 1973, Michael E. Phelps constrói o primeiro tomógrafo PET, na Universidade de Washington, o qual chamou de PETT I (de *Positron Emission Transaxial Tomography*). Com o auxílio de Edward J. Hoffman e de Michel Ter-Pogossian, Phelps realizou vários estudos e aperfeiçoou o aparelho, matematicamente e fisicamente, nomeadamente ao nível de algoritmos e de mais e melhores detectores. Durante este período, várias imagens foram obtidas utilizando carbono-11, glucose, oxigénio-15 e azoto-13 (reviewed in Steiner, 2002).

Em 1976, na UCLA, Z.H. Cho e seus colaboradores reportaram o desenvolvimento de um sistema em forma de anel de detectores (Cho et al., 1976), que serviu de protótipo a aparelhos mais sofisticados e à forma actual dos aparelhos PET. O desenvolvimento dos radiofármacos, em particular de FDG (^{18}F -fluodesoxiglucose), um análogo da glucose cujo grupo hidroxilo do carbono 2 é substituído por um átomo de flúor, contribuiu para a aceitação e evolução da tecnologia PET (Ido et al., 1978). A utilização de FDG para estudos fisiológicos *in-vivo*, nomeadamente para verificação do seu *uptake* em tumores cerebrais, permitiu a confirmação do seu valor como preditor diagnóstico e a validação da imagiologia por PET.

1.3. Aplicações

A PET tem sido utilizada maioritariamente para estudos clínicos nas áreas de oncologia (Zheng et al., 2014), cardiologia (Castellani et al., 2010) e neurologia (Rabinovici et al., 2007).

Em oncologia, o diagnóstico de neoplasias é possível devido à acumulação e ao metabolismo do radiofármaco dentro do tumor. Estudos demonstraram que um aumento do metabolismo da glucose é característico de neoplasias, acompanhando a degeneração associada ao desenvolvimento de tumores (Weber, 1977). No âmbito destes estudos, foi desenvolvido o radiofármaco que até hoje tem a maior aplicação, o 2- $[^{18}\text{F}]$ -flúoro-2-desoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]$ -FDG) (Ido et al., 1978). O FDG é um análogo da glucose cujo átomo de hidrogénio (H) na posição 2 foi substituído por um flúor (F). O aumento do consumo de glucose permite a obtenção de sinais elevados de FDG na imagem dos tumores obtida por PET, tornando possível a sua distinção dos tecidos circundantes. Deste modo, a PET permite, nomeadamente, o diagnóstico precoce de tumores (Duhaylongsod et al., 1995), a detecção de metástases (Kobayashi et al., 2011), a avaliação da resposta à terapêutica (Allen-Auerbach & Weber, 2009) e consequente alteração da mesma para uma melhor abordagem da doença, e o estabelecimento de um prognóstico a partir dos dados obtidos (Endo et al., 2006).

O diagnóstico e caracterização de doenças neurológicas também é possível através da PET. Desordens neurológicas como Alzheimer e Parkinson são passíveis de ser detectadas num estadio inicial da doença, embora com alguma dificuldade. Este é um factor determinante para a resposta ao tratamento, uma vez que os tratamentos existentes têm uma maior eficácia no início do desenvolvimento da doença (Phelps, 2000). Aqui também o FDG tem um papel essencial, uma vez que o metabolismo da glucose providencia cerca de 95% do ATP necessário para o normal funcionamento do cérebro (Varrone et al., 2009). A PET possibilita ainda a diferenciação entre Alzheimer de outros tipos de demência, bem como de reduções benignas relacionadas ao envelhecimento (Duara et al., 1986; Herholz, 1995). Outras anormalidades associadas à actividade de neurotransmissores ou epilepsia, nomeadamente, podem também ser caracterizadas através da imagiologia por PET (Nordberg, 2004; Herholz & Heiss, 2004).

Em cardiologia, a maior utilização da PET tem sido no diagnóstico e caracterização de doença arterial coronária (DAC), através da obtenção de imagens de perfusão miocárdica (Schwaiger et al., 2010; Di Carli et al., 2007). A doença arterial coronária, também conhecida por aterosclerose coronária, caracteriza-se pelo estreitamento das artérias do coração, resultante do aumento de espessura da camada interna das artérias, por deposição de gordura nas mesmas, formando as placas ateroscleróticas. Isto diminui o fornecimento de sangue ao miocárdio, limitando a sua capacidade de bombear sangue para o resto do corpo (Libby & Theroux, 2005). A imagem de perfusão miocárdica permite detectar a doença arterial coronária, por avaliação do efeito das placas ateroscleróticas no fluxo sanguíneo, em indivíduos com suspeita de terem a doença, verificar a extensão dos danos causados pelos bloqueios nas artérias coronárias, para ponderação do tratamento por revascularização (desobstrução da artéria e restabelecimento do fluxo sanguíneo para o coração), avaliar o

prognóstico e, igualmente, monitorizar o tratamento dos pacientes (Schoepf et al., 2004; Schindler et al., 2010; Gaemperli & Kaufmann, 2011).

1.4. Radionuclídeos

O desenvolvimento de um agente radioactivo para marcação está intrinsecamente ligado com a escolha do alvo de estudo, existindo uma grande variedade de radionuclídeos emissores de positrões. Os estudos clínicos por PET utilizam maioritariamente radionuclídeos orgânicos, como carbono-11 (^{11}C) (Reske et al., 2006), flúor-18 (^{18}F) (Klein et al., 2009), oxigénio-15 (^{15}O) (Ye et al., 2000) e azoto-13 (^{13}N) (Alexánder et al., 2008), uma vez que estes possuem propriedades que os tornam mais apropriados para estudos *in vivo*, nomeadamente o seu tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), que deve ser adequado tendo em conta o intervalo de tempo do processo bioquímico a ser estudado, e a sua presença, como elementos de baixa massa atómica, nas biomoléculas, permitindo a marcação de moléculas de interesse sem interferir na sua normal actividade biológica. Outros radionuclídeos, como iodo-124 (^{124}I) (Divgi et al., 2007) e gálio-68 (^{68}Ga) (Virgolini et al., 2010) também detêm aplicações relevantes, dependendo da condição clínica a ser avaliada.

1.4.1. Radionuclídeos para Avaliação da Perfusão Miocárdica

Sendo a doença cardíaca uma das principais causas de morte, com maior relevo para a doença arterial coronária, torna-se imperativa não só a sua prevenção (ao evitar hábitos prejudiciais e ao desenvolver outros saudáveis), mas também o seu correcto diagnóstico e avaliação.

O [^{13}N] é um radionuclídeo beta-positrónico com uma semi-vida de 9,96 minutos, produzido num ciclotrão principalmente através da reacção nuclear $^{16}\text{O} (p, \alpha)^{13}\text{N}$ (Miller et al., 2008). O radiofármaco mais comum composto por [^{13}N] é a [^{13}N]- NH_3 , utilizado para avaliação da perfusão miocárdica, em indivíduos com suspeitas de sofrerem de doença arterial coronária ou que possuam já a doença, sendo realizado em condições de descanso ou de stress induzido farmacologicamente ou com exercício físico (Krivokapich et al., 1989). A razoável energia dos positrões emitidos e o $t_{1/2}$ da [^{13}N]- NH_3 permitem a obtenção de imagens regionais ou globais do miocárdio com uma grande qualidade, em comparação com outras técnicas, como a SPECT (Hickey et al., 2004) Devido à curta semi-vida do radionuclídeo, é limitado o desenvolvimento de moléculas mais complexas, que requerem métodos de síntese e de purificação de maior duração e complexidade. A [^{13}N]- NH_3 pode ainda ser incorporada em aminoácidos, através de reacções enzimáticas (K Suzuki & Tamate 1984; Barrio et al. 1983)

para a determinação de taxas de síntese proteica em tumores, ou utilizada para preparação de $[^{13}\text{N}]\text{cis-platina}$ (Holschbach et al., 1997), um fármaco anticancerígeno.

Para além de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, os radiofármacos $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ (Watabe et al., 2005) e rubídio-82 (^{82}Rb) (deKemp et al., 2000) (Van Tosh et al., 2010) são os mais utilizados para avaliação da perfusão miocárdica. A $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ é pouco aplicada nestes estudos, por razões essencialmente práticas relacionadas com o tipo de método de produção e com a sua curta semi-vida (2 minutos), pelo que esta via praticamente não é utilizada, à excepção de alguns centros de pesquisa altamente especializados.

O ^{82}Rb , por outro lado, é, juntamente com a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, um radiofármaco de eleição para avaliação da perfusão miocárdica (El Fakhri et al., 2009). Ao contrário dos radiofármacos supracitados, o ^{82}Rb ($t_{1/2} = 76$ segundos) é produzido através de um gerador, o que permite estudos clínicos PET sem um ciclotrão, agindo como um análogo do potássio. Devido à sua curta semi-vida, este radiofármaco permite a obtenção de uma sequência rápida de imagens nos estudos por PET, o que lhe possibilita aumentar a sua eficiência. Contudo, a energia dos positrões emitidos é muito elevada, o que acaba por se reflectir numa menor resolução espacial das imagens (Di Carli et al., 2007).

2. $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

2.1. Métodos de Produção

O $[^{13}\text{N}]$ é produzido, normalmente através da reacção nuclear $^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$, embora possa também ser obtida através da reacção $^{13}\text{C}(p, n)^{13}\text{N}$ (Qaim, 1993). É convertido a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ por dois tipos de métodos de redução: clássicos ou no alvo. Através dos métodos clássicos, a redução de óxidos de nitratos e nitritos gerados na água irradiada ($[^{13}\text{N}]\text{-NO}_x^-$) é realizada por acção do cloreto de titânio (TiCl_3) (Ido & Iwata, 1981) ou da liga de DeVarda (K. Suzuki & Tamate, 1984; Sobczyk et al., 2002) enquanto que dos métodos de redução no alvo se destacam os métodos do etanol (Wieland et al., 1991; Berridge & Landmeier, 1993) e do hidrogénio (Mulholland et al., 1990; Berridge & Landmeier, 1993), no qual é adicionada uma pequena porção de etanol ou H_2 à água irradiada, como “scavengers” dos radicais livres responsáveis pela oxidação a $[^{13}\text{N}]\text{-NO}_x^-$. Estudos de Berridge *et al* indicaram ainda que a combinação de etanol e H_2 é mais eficaz do que a adição individual de cada componente em altas doses (Berridge & Landmeier, 1993).

Dentro destes métodos, os que possuem maior relevo actualmente na produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ são os métodos de *DeVarda* e o da adição de etanol.

2.2. Metabolismo e Mecanismos de Retenção no Local Alvo

O metabolismo da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ é constituído por um conjunto de 5 passos catalisados por enzimas, que levam à formação de $[^{13}\text{N}]\text{-ureia}$, no fígado. A $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ é também metabolizada a $[^{13}\text{N}]\text{-glutamina}$, o principal metabolito existente nos tecidos, por acção da glutamina sintetase no cérebro e no miocárdio, entre outros tecidos, sendo excretada na urina maioritariamente sob a forma de $[^{13}\text{N}]\text{-ureia}$ (Adeva et al., 2012).

Verifica-se que, após a administração ao paciente por via intravenosa, a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ sai rapidamente da circulação para as células, principalmente do miocárdio, cérebro, fígado, rins e músculo esquelético (Phelps et al., 1977; Walsh et al., 1977; Lockwood et al., 1979; Harper et al., 1972), através do transportador de amónio (NH_4^+). No miocárdio e no cérebro pode ser metabolizado a glutamato que é retido nesses tecidos (Adeva et al., 2012). A perfusão dos vasos sanguíneos nos tecidos, isto é, a sua biodistribuição, é, normalmente, proporcional ao fluxo sanguíneo.

3. Controlo de Qualidade e Garantia de Qualidade de Radiofármacos

O desenvolvimento de um processo de Controlo de Qualidade (CQ) especialmente concebido para o radiofármaco a ser produzido é crítico e imprescindível, contribuindo para a segurança do paciente e para a qualidade e o rigor do diagnóstico executado. Dado o curto tempo de semi-vida de alguns radiofármacos, nomeadamente aqueles que são usados para PET, estes têm de ser libertados para administração antes dos testes de CQ poderem ser concluídos e analisados os seus resultados, o que implica que deva ser aplicado um sistema de boas práticas aquando da produção e preparação dos mesmos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – WHO (do inglês *World Health Organization*) “ os radiofármacos devem ser produzidos de acordo com os actuais princípios de Boas Práticas de Fabrico - cGMP (do inglês *current Good Manufacturing Practices*), de modo a ser obtido um produto com propriedades consistentes e cujo risco de uso é mínimo comparando com o benefício obtido” (WHO, 2007).

O processo de CQ é parte essencial das GMP e das actuais Boas Práticas de Radiofarmácia - cGRPP (do inglês *current Good RadioPharmacy Practice*), encontrando-se relacionado com a amostragem, a avaliação analítica, a conformidade com as especificações e a documentação destes processos, que asseguram a qualidade associada com a produção e permitem a libertação dos Radiofármacos para serem administrados (Elsinga et al., 2010) isto é, engloba um conjunto de processos necessários para assegurar a qualidade do produto final e para evidenciar a consideração por todos os requerimentos (Zolle, 2007), nomeadamente os que estão descritos nas farmacopeias.

Por outro lado, a Garantia de Qualidade (GQ) dos Radiofármacos baseia-se na implementação de um dedicado sistema que tende a maximizar as probabilidades do produto final ser apropriado e seguro para o uso humano a que se destina, e que satisfaz plenamente o conjunto pré-definido de especificações. Consequentemente, o processo de CQ é uma parte relevante do sistema de GQ.

3.1. Princípios Actuais de Boas Práticas de Fabrico (cGMP) vs Boas Práticas de Radiofarmácia (cGRPP)

As cGMP e as cGRPP representam as directrizes propostas pela WHO e pelo comité de Radiofarmácia da Associação Europeia de Medicina Nuclear - EANM (do inglês *European Association of Nuclear Medicine*), respectivamente, como referências de GQ para possível aplicação no processo de produção e preparação de radiofármacos. No caso particular das cGRPP, apresentam as normas sugeridas para a preparação em pequena escala dos mesmos. Estas directrizes encontram-se construídas como uma forma de complementar as sugestões já existentes para produtos farmacêuticos em geral (WHO, 2010) e vão ao encontro dos princípios de cGMP apresentados pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) em documentos actuais sobre Radiofármacos para PET (F.D.A., 2011).

As recomendações apresentadas nestes documentos têm como objectivo o desenvolvimento de radiofármacos seguros e eficazes, tendo por base a implementação de um sistema de boas práticas em todas as actividades que decorrem até à administração do produto final. Englobam os seguintes parâmetros e algumas das respectivas sugestões de requerimentos, entre outros aspectos (EANM, 2007; Elsinga et al., 2010; F.D.A., 2011):

- **Pessoal/Funcionários:** é necessária a existência de uma equipa devidamente qualificada e treinada para as funções a exercer, particularmente pessoas com experiência na produção e preparação dos Radiofármacos, e em número suficiente para cumprir as tarefas associadas, antes da administração ao paciente.

Durante a execução de algum procedimento, nomeadamente no que respeita a produção, preparação ou controlo de qualidade do produto, deve apenas estar presente nas zonas de trabalho (assépticas ou não) o pessoal necessário. Este deve ter conhecimentos de GMP, de regulamentos e directrizes publicadas pelas entidades competentes e de procedimentos de segurança e manuseamento de materiais radioactivos. Contudo, apenas o farmacêutico ou outro profissional responsável e devidamente qualificado para o efeito pode ordenar a libertação do produto final.

Todos os envolvidos nos processos que envolvem produtos radioactivos devem ser monitorizados para possível contaminação/exposição, com dosímetros e, principalmente, correctamente informados e treinados para protecção contra a radiação.

- **Instalações e Equipamentos:** os locais dedicados à produção e preparação de radiofármacos devem ser construídos e mantidos de acordo com a complexidade das operações que se efectuam nas instalações e com blindagem adequada para determinados equipamentos (particularmente aqueles relacionados com a produção). As instalações devem ser limpas, livres de contaminação por radiação e desenhadas de modo a permitir uma adequada comunicação entre os elementos do pessoal envolvido nas operações, tendo em conta, igualmente, a direcção do produto desde o momento da produção, contribuindo para um melhor fluxo de trabalho. Além disso, para evitar contaminações ou misturas, é preferível a separação dos locais onde se processam as diferentes actividades, nomeadamente produção, síntese radioquímica e controlo de qualidade, a implementação de sistemas apropriados para o descarte de lixos radioactivos e seleccionadas zonas para disposição de recipientes e materiais (batas, protecções para pés e cabeça, entre outros) ou substâncias rejeitadas, devidamente rotulados e identificados.

As instalações devem possuir um sistema de ventilação que permita a prevenção contra a contaminação dos produtos por microorganismos ou partículas, bem como a exposição do pessoal à radiação, utilizando pressões e filtros que contribuam para a boa qualidade do ar e um sistema de alarme para aviso de eventuais problemas ao nível da radioactividade. Quer as actividades relacionadas com a produção e preparação dos radiofármacos, quer as realizadas no âmbito dos testes de controlo de qualidade devem ter lugar em ambiente asséptico.

O equipamento utilizado nestas actividades deve ser apropriado para a função a desempenhar e sujeito a calibração, limpeza e manutenção periódicas, seguindo procedimentos documentados. Deve ainda ser sujeito a testes para obtenção de resultados consistentes com especificações, que possam validar e confirmar o correcto funcionamento do aparelho.

- **Produção e Rotulagem:** Todos os procedimentos devem ter em conta as SOPs (do inglês *Standard Operating Procedures*) ou padrões de referência, como os referidos nas farmacopeias.

Os materiais utilizados na produção e preparação dos Radiofármacos devem provir de um fornecedor fiável e ser devidamente comprovada a sua origem, estado e qualidade. Devem ser documentados todos os dados referentes a cada material, como data de recepção, quantidade, nome do fornecedor, entre outros, para posterior armazenagem em local apropriado.

Os métodos utilizados quer na produção/preparação dos Radiofármacos, quer no processo de controlo de qualidade devem estar validados e quaisquer alterações devem ser documentadas. Dado o curto tempo de semi-vida de alguns radionuclídeos, o radiofármaco tem de ser administrado antes de todos os testes de controlo de qualidade serem terminados, o que determina a produção em conformidade com o que está documentado e/ou regulamentado.

3.2. Regulamentação para Radiofármacos – Farmacopeia Europeia

A preparação, o armazenamento, o uso e a libertação de produtos radiofarmacêuticos estão sujeitos a legislação nacional e internacional, através de directivas e guias para a implementação das mesmas, que visam a eficácia, a qualidade e a segurança destes produtos (Saha, 2010).

Enquanto os princípios de GMP e GRPP representam as recomendações de procedimentos no que concerne não só à produção de radiofármacos, como também de outros produtos farmacêuticos/medicinais e substâncias activas, as farmacopeias especificam, em várias monografias, as características mandatórias que determinado produto ou ingrediente activo (incluindo radiofármacos e produtos medicinais em geral) deve possuir, bem como os métodos analíticos a ser utilizados, reagentes e compostos para preparação de soluções relevantes, entre outros aspectos. De facto, os radiofármacos devem cumprir estes padrões mínimos na altura da sua administração, embora o resultado de alguns testes de CQ só possam ser obtidos após a sua libertação e/ou administração.

A Farmacopeia Portuguesa é publicada, actualizada e revista pela Comissão da Farmacopeia Portuguesa, órgão consultivo do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP), sendo relativamente semelhante ao que está especificado e descrito na Farmacopeia Europeia, a farmacopeia oficial dentro da União Europeia. A elaboração e publicação deste documento, por sua vez, encontra-se a cargo da Direcção Europeia para a Qualidade dos Medicamentos – EDQM (do inglês, *European Directorate for Quality of Medicines*), sendo utilizado em Portugal como directriz nos processos de produção e CQ dos radiofármacos. É publicada em inglês e em francês e encontra-se dividida, relativamente aos radiofármacos, em:

- 2 monografias gerais, onde são descritos os princípios e metodologias a serem utilizados em cada ponto das monografias individuais, bem como uma tabela composta pelas características físicas de vários radionuclídeos;

- 56 monografias individuais relativas a radiofármacos específicos, incluindo os que são utilizados em PET, os que não são marcados com radionuclídeos beta positrónicos, preparações de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, entre outras (Zolle, 2007).

Os padrões de qualidade identificados na farmacopeia pretendem contribuir para a qualidade dos produtos. Em alguns casos, contudo, verifica-se a implementação desigual e pouco efectiva destas directivas e regulamentos entre países da União Europeia (EU). Outras farmacopeias podem ser consideradas e aplicadas dentro de determinado país ou nos seus estados-membro (Saha, 2010).

3.3. Critérios de Controlo de Qualidade

Os parâmetros de CQ aplicados aos radiofármacos destinados a PET, especificados nas farmacopeias, baseiam-se, sobretudo, na aplicação de testes para controlo físico-químico e biológico, nomeadamente de pH, aparência, identidade e pureza radioquímica e radionuclídica, pureza química, esterilidade e endotoxinas bacterianas. Outros critérios, como a osmolalidade e a actividade específica podem, igualmente, possuir valor informativo relativamente a determinada preparação radiofarmacêutica, pelo que podem, também eles, ser avaliados.

3.3.1. Aparência e pH

A investigação da aparência física é o primeiro teste a ser realizado no âmbito do processo de controlo de qualidade de radiofármacos. Normalmente, esta propriedade está relacionada com a cor, a limpidez e a turbidez das amostras e é avaliada por inspecção visual através de um vidro blindado, para protecção do manuseador de actividade.

É importante que o radiofármaco possua um pH que se encontre dentro do limite estabelecido pela farmacopeia, uma vez que a estabilidade da preparação pode ser influenciada por este parâmetro. Idealmente o pH da solução deve ser próximo do pH fisiológico do sangue, embora se aceite uma gama alargada, dado o efeito tampão do sangue (Saha, 2010). Este parâmetro pode ser medido com papel indicador, evitando a exposição à radiação e a contaminação de equipamentos, ou através de um medidor de pH calibrado, que providencia resultados mais precisos.

3.3.2. Pureza Química

A Pureza Química pode ser definida como a fracção de composto no radiofármaco na forma molecular desejada (Saha 2010). A presença de impurezas químicas deve ser evitada, uma vez que pode, quer levar ao desenvolvimento reacções adversas, após a administração ao paciente, quer interferir no processo de marcação do radionuclídeo. Duas abordagens podem ser realizadas relativamente a este tópico. Primeiramente, deve ser verificada a identidade química do composto marcado e, posteriormente, verificada a presença de contaminantes indesejáveis na preparação (Qaim, 1993). A caracterização deste parâmetro para as preparações radiofarmacêuticas envolvem, normalmente, métodos cromatográficos,

espectrofotométricos, colorimétricos, de troca iônica ou de extracção de solventes (Saha, 2010).

3.3.3. Pureza Radioquímica

A Pureza Radioquímica pode definir-se como “a relação, expressa em percentagem, entre a radioactividade do radionuclídeo considerado, presente na forma química indicada, e a radioactividade total atribuída a esse radionuclídeo na preparação radiofarmacêutica (Council of Europe, 2014b). As impurezas radioquímicas de uma preparação radiofarmacêutica podem advir da produção do radionuclídeo, de marcação incompleta deste, de separação preparativa incompleta ou através da introdução de produtos indesejáveis durante o processo de síntese (Council of Europe, 2014b). Estas impurezas podem alterar a biodistribuição do radiofármaco, expondo o paciente a uma sobredose desnecessária de radiação que lhe pode ser prejudicial, e dificultando, eventualmente, a interpretação do exame clínico (Saha, 2010).

A cromatografia líquida de alta pressão – HPLC (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*) acoplado a um detector de radioactividade é o método analítico mais utilizado para a determinação deste parâmetro, permitindo a separação dos componentes das amostras e consequente identificação, comparando com soluções de referência. A cromatografia em camada fina – TLC (do inglês *Thin Layer Chromatography*) também pode ser aplicada para a determinação da pureza química (Qaim, 1993). As placas de TLC podem segmentadas e analisadas utilizando um *scanner* de radiocromatogramas (Hung, 2004), de modo a verificar a actividade correspondente a cada segmento.

3.3.4. Pureza Radionuclídica

A determinação da pureza radionuclídica de uma preparação radiofarmacêutica é essencial, uma vez que as impurezas radionuclídicas podem não só provocar um excesso de radiação desnecessária recebida pelo paciente, mas também diminuir a qualidade da imagem obtida (Saha, 2010). É definida pela “ relação, expressa em percentagem, entre a radioactividade do radionuclídeo considerado e a radioactividade total da preparação radiofarmacêutica” (Council of Europe 2014d). As impurezas podem ser originadas de radionuclídeos produzidos durante a irradiação do alvo ou de impurezas do material do alvo (Saha, 2004), sendo, portanto, a produção do radionuclídeo a faz determinante para a produção de impurezas radionuclídicas. O método normalmente utilizado para a determinação de impurezas radionuclídicas e para a identificação do radiofármaco é a espectroscopia de radiação gama. Esta identifica os radionuclídeos pela energia e intensidade das suas radiações gama e X (Council of Europe, 2014b).

A semi-vida é também um parâmetro avaliado para determinação da pureza radionuclídica e identificação do radiofármaco, uma vez que é característico de cada radionuclídeo. Pode ser determinada através de aparelhos de detecção como a câmara de ionização, o contador Geiger-Müller ou o contador de cintilação, não devendo desviar-se mais do que 5% do valor indicado na farmacopeia (Council of Europe, 2014b).

3.3.5. Esterilidade

A esterilidade implica a ausência de microorganismos viáveis nas preparações radiofarmacêuticas. Devido à curta semi-vida dos radiofármacos para PET, os testes de esterilidade não são efectuados antes da libertação dos mesmos para administração ao paciente. Para prevenir a contaminação, procede-se à filtração das amostras através de um filtro poroso de 0,22 µm, verificando-se a integridade deste através do teste do ponto de bolha, após o processo (Hung, 2002) (Council of Europe, 2014a).

O ensaio de esterilidade realizado por incubação das amostras em meios de cultura deve satisfazer ao ensaio de esterilidade prescrito na farmacopeia (Council of Europe, 2014a).

3.3.6. Teste de Endotoxinas Bacterianas

O teste para a presença de endotoxinas bacterianas, a par do teste de esterilidade, permite a avaliação dos parâmetros biológicos nas preparações radiofarmacêuticas. É essencial a ausência de pirogénios, produtos resultantes do metabolismo de bactérias gram-negativo, nas soluções injectáveis, uma vez que podem causar, entre outros sintomas, febre e, embora mais raramente, choque séptico, podendo levar à morte do indivíduo.

O método mais rápido, sensível e de baixo custo a ser utilizado para a avaliação deste parâmetro é o método utilizado com o teste LAL (Council of Europe, 2014a), para o qual se utiliza um lisado de amebócitos de *Limulus polyphemus* para medir o nível de endotoxinas. Em contacto com o lisado, as endotoxinas provocam a formação de um gel, turvação ou precipitação da solução, após o período de incubação, conforme o método escolhido.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Objectivos:

- Optimizar o processo de produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ segundo o método previamente seleccionado;
- Contribuir para a validação da produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ de acordo com as especificações da Ph. Eur. 8.2;
- Adquirir conhecimentos e desenvolver competências técnicas no âmbito do processo de controlo de qualidade de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

CAPÍTULO II - MÉTODOS

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Introdução

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Radioquímica e Ciclotrão (LRC) do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS) da Universidade de Coimbra, tendo em vista a validação da produção do radiofármaco $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ para estudos clínicos de Tomografia por Emissão de Positrões na avaliação de perfusão miocárdica. O método escolhido para a sua produção no ICNAS foi o método da adição de etanol, uma vez que este é um método simples, económico e eficiente. O etanol adicionado à água irradiada funciona como “*scavenger*” de radicais livres responsáveis pela formação dos nitratos e nitritos. Foram realizados 6 lotes de produção. Os primeiros 3 destinaram-se à optimização do processo de produção e os 3 últimos à sua validação. Todos os lotes foram avaliados relativamente aos seus parâmetros de libertação nos termos da respectiva monografia da Farmacopeia Europeia 8.2 (Council of Europe, 2014b). Esta inclui testes às propriedades físico-químicas (aparência, pH, pureza química, identificação e purezas radioquímica e radionuclídica) e microbiológicas (esterilidade e apirogenicidade).

Os lotes foram produzidos de acordo com as normas de boas práticas radiofarmacêuticas, incluídas nas recomendações para garantia de qualidade do radiofármaco (EudraLex, 2008) (EudraLex, 2014), bem como para a radioproteção de todos os intervenientes no processo de produção.

1. Produção do Radionuclídeo e Síntese Radioquímica

A produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi realizada num ciclotrão IBA Cyclone 18/9 (IBA, Louvaine-la-Neuve, Bélgica) através da reacção nuclear $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ com protões de 18 MeV. A solução irradiada era constituída por 1,15 mL de água estéril e apirogénica (B-Braun) e 5 mM de etanol (PhEur, Merck). A preparação da solução final de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi realizada no módulo automático Trasis AIO 30 (Trasis, Liège, Bélgica), alojado numa célula blindada (COMECER MIP, Itália), utilizando uma cassette descartável e esterilizada de 6 vias. A actividade proveniente do ciclotrão foi inicialmente retida numa seringa, passando de seguida através de uma coluna de troca aniónica *Sep-PakTM Accell Plus QMA Plus light* (Waters), para retenção de produtos indesejáveis, nomeadamente óxidos de azoto (NO_x). Após este processo, a solução de $^{13}\text{N}\text{-NH}_3$ foi esterilizada por filtração utilizando um filtro de 0,22 μm (Millex-GS Millipore), sendo o produto final recolhido num frasco estéril para injectáveis, de 15 mL. Seguiu-se, por fim, a adição de 0,1 mL de NaCl 10% e 8,75 mL NaCl 0,9% (B-Braun), de modo a obter-se 10 mL e uma solução final isotónica. Foi utilizado durante o processo de síntese radioquímica um fluxo de azoto (N_2) com uma pressão de 1,5 Bar.

A produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ está representada esquematicamente na Figura 1. No final da síntese, o frasco contendo o produto final foi acondicionado num recipiente blindado e encaminhado para análise no laboratório de controlo de qualidade do LRC.

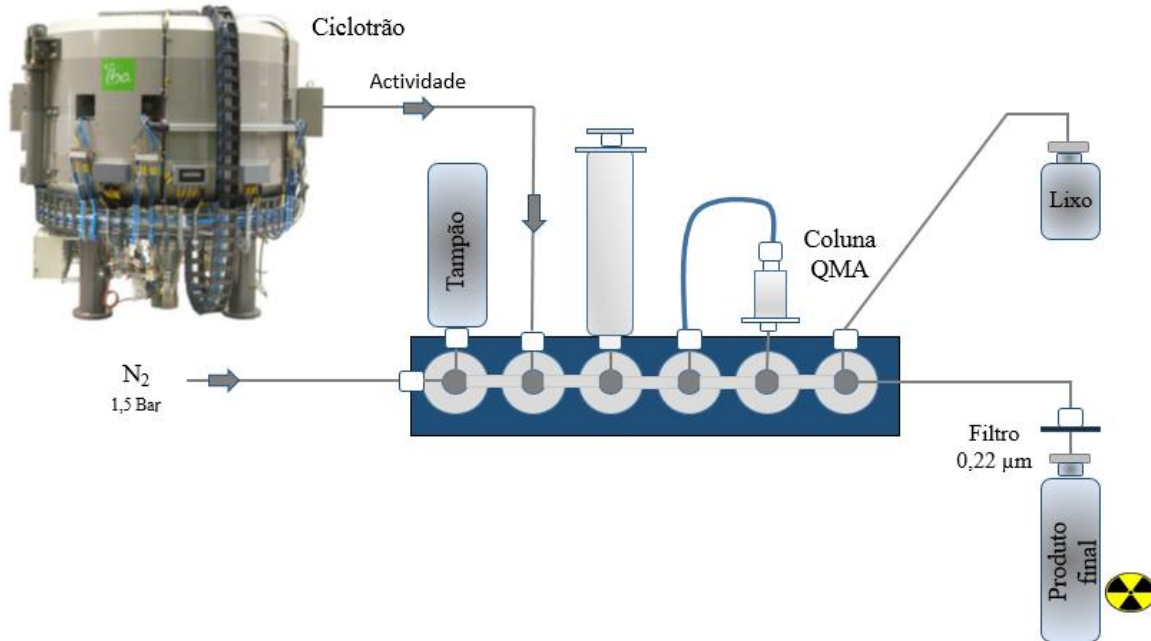


Figura III - Representação esquemática do processo de produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

2. Teste da Integridade do Filtro

A integridade do filtro utilizado na filtração da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi verificada através do teste do “ponto de bolha” (*Bubble Point test*) uma técnica não destrutiva que permite a detecção de defeitos no filtro e a associação com possível passagem de microrganismos.

Quando o filtro é molhado, a água é mantida nos poros através da tensão da superfície e de forças capilares. Ao ser exercida pressão, o líquido vai ser forçado a sair dos poros. A pressão mínima requerida para tal acontecer é uma medida do diâmetro dos poros do filtro, tal como indicado pela fórmula de cálculo:

$$P = \frac{4k \cos \theta}{d} \sigma$$

Sendo P a pressão do “ponto de bolha”, d o diâmetro do poro, k o factor de correcção da forma, $\cos \theta$ o ângulo de contacto líquido-sólido e σ a tensão de superfície.

Após o decaimento radioactivo da amostra, a membrana do filtro (Millex-GV Millipore) foi coberta com água estéril e apirogénica (Braun) e a pressão do gás do sistema foi aumentada, até ser observado um fluxo contínuo de bolhas através da membrana (Figura IV). Essa pressão é denominada de “ponto de bolha” e foi, no final do teste, comparada com o “ponto de bolha” indicado pelo fabricante do filtro.

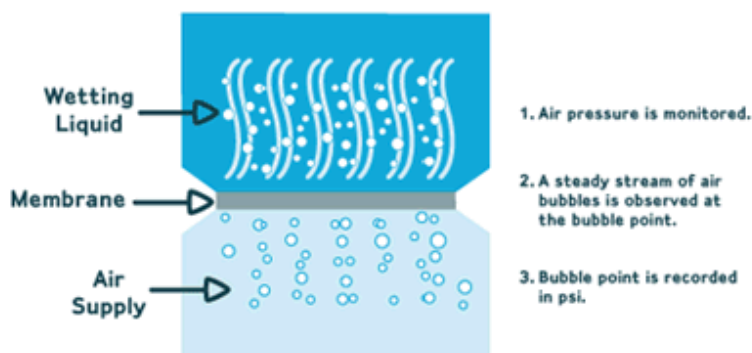


Figura IV - Representação do processo de averiguação da integridade do filtro aplicado na filtração da amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (Adaptado de Millipore, n.d.).

3. Controlo de Qualidade da Solução Final de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

3.1. Controlo das Propriedades Físico-Químicas

3.1.1. Aparência

Após a produção, o recipiente blindado contendo o frasco com o produto final foi transportado da sala de produção para o laboratório de controlo de qualidade através de uma caixa de transferência. Com o auxílio de uma pinça, retirou-se o frasco do recipiente, sendo imediatamente sujeito a uma inspecção visual, realizada através de um vidro plumbíneo, para determinação da cor da solução e detecção de partículas visíveis em suspensão.

3.1.2. Valor de pH

Previamente à determinação potenciométrica de pH propriamente dita, procedeu-se à calibração do medidor de pH (Jenway). Retirou-se o eléctrodo de pH da solução de armazenamento (tampão pH 4,006 (WTW)) e lavou-se com água destilada. Após a secagem

do eléctrodo com papel adequado, este foi introduzido em solução tampão de pH 7,00 (WTW). Aguardou-se a estabilização do valor de pH e pressionou-se o botão “Cal”. Seguiu-se uma nova lavagem com água destilada, secagem e imersão numa solução tampão de pH 4,006 (WTW), repetindo-se o processo de estabilização e calibração. O eléctrodo foi novamente lavado com água destilada e seco com papel adequado, ficando apto para o uso. Após este procedimento, foi realizada a medição do pH da solução de $^{13}\text{N-NH}_3$.

Através do vidro plumbíneo, e com o auxílio de uma seringa de 1 mL, foi retirada uma alíquota da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ para um *ependorf*. De seguida, mergulhou-se o eléctrodo de pH no mesmo para a determinação do pH da solução. Durante este processo, o *ependorf* foi mantido numa coluna de depósito blindada, até ser atingido o equilíbrio químico e obtida a respectiva visualização do pH.

3.1.3. Pureza Química

A pureza química da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi determinada através do método colorimétrico baseado na complexação entre o indicador metalocrómico cromazurol S ($\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{O}_9\text{SNa}_3$, Fluka) (Figura V) e o alumínio. Num tubo de ensaio, misturou-se 1 mL de solução tampão acetato de pH 4,6, 2 mL de uma diluição 1/20 da amostra de $^{13}\text{N-NH}_3$ em água, adicionando-se, por último, 0,05 mL de uma solução de cromazurol S, de concentração 10g/L. Aguardou-se cerca de 3 minutos para verificação da cor da solução. A solução de referência foi preparada simultaneamente e nas mesmas condições que a solução amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, adicionando-se 2 mL de uma diluição a 1/20 de uma solução de alumínio em detrimento da amostra.

A solução tampão de acetato pH 4,6 foi preparada dissolvendo, primeiramente, cerca de 5,4 g de acetato de sódio (Sigma - Aldrich) em água. Seguidamente, adicionaram-se 2,28 mL de ácido acético glacial (Sigma - Aldrich) e completou-se o volume (100 mL) com água. Nos casos em que se aplicava, o pH foi ajustado. Foram obtidos 50 mL de uma solução 10g/L de cromazurol S, dissolvendo 0,5 g de composto em água. Por último, a solução padrão de alumínio 2 ppm foi preparada dissolvendo cerca de 0,352 g de sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado (Sigma - Aldrich) em água, seguindo-se a adição de 10 mL de ácido sulfúrico diluído, perfazendo o volume até 100 mL com água. Para finalizar, foi realizada uma diluição 1/100 da solução preparada, imediatamente antes da sua utilização. A Tabela I resume a composição das soluções.

O teste completo para determinação da presença de alumínio na solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, incluindo as devidas diluições e preparação das soluções de cromazurol S e de tampão acetato pH 4,6, foi realizado de acordo com as indicações da Ph. Eur. (Council of Europe, 2014e).

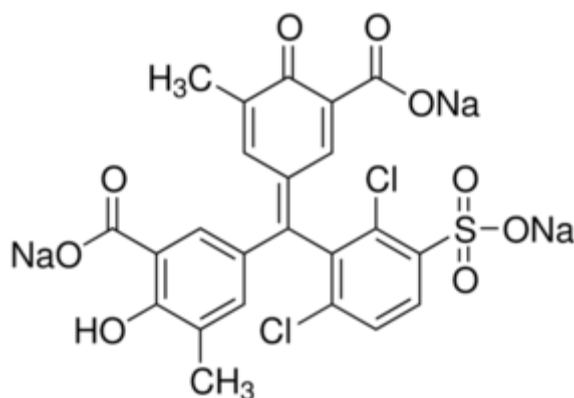


Figura V - Estrutura química do Cromazurol S (Adaptado de Sigma-Aldrich, n.d.).

Tabela I - Composição das soluções utilizadas para determinação da pureza química das amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Solução	Composição	Volume final
Tampão acetato pH 4,6	<ul style="list-style-type: none"> 5,4 g de CH_3COONa 2,28 mL ácido acético glacial 	100 mL
Cromazurol S	<ul style="list-style-type: none"> 0,5 g Cromazurol S 	50 mL
Padrão alumínio 2ppm	<ul style="list-style-type: none"> 0,352 g $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 mL H_2SO_4 diluído Diluição 1/100 	100 mL
	<ul style="list-style-type: none"> Diluição 1/20 	10 mL
Ácido Sulfúrico diluído	<ul style="list-style-type: none"> 5,5 mL H_2SO_4 	100 mL

3.1.4. Identificação e Determinação da Pureza Radioquímica da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

Os resultados relativos à identificação da amostra proveniente do módulo de síntese e a determinação da sua pureza radioquímica foram adquiridos recorrendo, primeiramente, a um sistema de Cromatografia Iónica (Thermo Scientific Dionex), HPIC (do inglês *High-Pressure Ion Chromatography*), acoplado a um detector de radioatividade (Raytest). Um detector de condutividade (Thermo Scientific) e um supressor catiónico (Thermo Scientific Dionex, CSRS 300, 4mm) foram utilizados para a análise.

Os respectivos programas de recolha de dados do cromatógrafo iónico e do detector de radioatividade, *Chromeleon Chromatography Data System software* e *Gina Star* foram

executados e preparados para o estudo. Antes da sua introdução no cromatógrafo iónico, o supressor catiónico foi hidratado com água ultrapura e injectada, com o auxílio de uma seringa de plástico e de adaptadores, nos orifícios correspondentes a *Eluent Out* e *Regen In*. Este processo foi efectuado cerca de 5 vezes para cada orifício. Terminada a hidratação, o supressor foi colocado no respectivo lugar entre a coluna e o detector.

Foi utilizada uma coluna analítica de 0,05 m de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com resina trocadora de catiões de 8 μm (Agilent Technologies), tendo sido mantida a uma temperatura de 25°C. A cromatografia foi realizada utilizando ácido nítrico 0,002 M (Sigma Aldrich) como fase móvel, a um débito de 2 mL/min. Foi utilizado, ainda, hidróxido de tetrabutílamónio (TBAOH, FLUKA) como supressor/regenerante químico do supressor catiónico. As condições experimentais utilizadas durante a análise encontram-se reunidas na Tabela II.

A solução padrão foi injectada no sistema cromatográfico com o auxílio de uma microseringa, num volume de 20 μL . O processo foi repetido com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma obtido com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi comparado com o do pico principal do cromatograma obtido com o padrão de amónia. As soluções utilizadas durante o processo de identificação e determinação da pureza radioquímica da nossa amostra foram as seguintes:

- Fase móvel: ácido nítrico 0,002 M
 - ✓ Ácido nítrico > 65% (Sigma Aldrich)
 - ✓ 0,06 mL para volume final de 500 mL
- TBAOH: ~ 40% em H_2O , para cromatografia iónica (FLUKA)
 - ✓ 98 mL para volume final de 1L
- Padrão de amónia:
 - ✓ Solução de amónia a 25% (Panreac)
 - ✓ 15,5 mL de amónia concentrada (25%) para volume final de 100 mL

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Tabela II - Resumo das condições experimentais utilizadas durante a execução do trabalho, em comparação com as especificações indicadas na farmacopeia.

Requisitos	Condições experimentais segundo farmacopeia	Condições experimentais utilizadas
Dimensões da coluna	10 μm 40 x 4,0 mm	8 μm 50 x 4,6 mm
Temperatura da coluna	20°C - 30°C	25°C
Fase móvel	Ácido nítrico 0,002 M	Ácido nítrico 0,002 M
Fluxo	2 mL/min	2 mL/min
Detectores	Condutividade + Radioactividade	Condutividade + Radioactividade
Injector	Em ansa	Em ansa
Quantidade no injector	Não especificada	20 μL
Supressor catiónico	Não especificado	Utilizado, com TBAOH como supressor químico
Software	Não especificado	HPIC: <i>Chromleon Chromatography Data System Software</i> Detector radioactividade: <i>Gina Star</i>

Numa tentativa de ser verificada a identidade do pico obtido num dos cromatogramas, para a qual se tinha colocado a hipótese de ser um óxido de azoto (NO_x^-) uma das impurezas apontadas na Ph. Eur., efectuou-se, utilizando as condições supracitadas, uma nova corrida onde, além do detector de condutividade, foi usado um detector de ultravioleta (UV), em série. Os comprimentos de onda utilizados para a detecção com UV foram, respectivamente, 210 nm e 254 nm, conforme indicado pela literatura para absorvância do ião nitrito no UV (Pastore et al., 1989). Para tal procedeu-se, primeiramente, à ligação entre os detectores dos dois sistemas cromatográficos. Iniciou-se a corrida e injectou-se NaCl, NaNO_2 ou NH_3 no HPLC com detector de condutividade, iniciando-se, imediatamente a seguir, a corrida no HPLC com detector de UV. Os cromatogramas obtidos foram comparados e analisados.

3.1.5. Identificação e Determinação da Pureza Radionuclídica da solução de ¹³N-NH₃

3.1.5.1. Determinação da Semi-vida

O calibrador de doses é um instrumento amplamente utilizado para medição da actividade de radiofármacos antes da administração ao paciente, sendo também através deste aparelho que se procedeu à determinação do tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) da amostra. O $t_{1/2}$ de um radiofármaco define-se como o tempo necessário para que a sua actividade se reduza para metade (Saha, 2010). Em primeira instância seleccionou-se o isótopo pretendido (¹³N) e procedeu-se à identificação da amostra no programa (MED Nuklear-Medizintechnik). Imediatamente a seguir, efectuou-se uma medição sem qualquer amostra na câmara de ionização para verificação de possível contaminação, isto é, eventual actividade existente, resultante de medição anterior de outras fontes radioactivas. Após a visualização do valor de actividade detectado na câmara, foram então realizadas medições em 6 pontos de tempo com a amostra inserida na câmara, dentro de um *eppendorf*, em intervalos de tempo de cerca de metade do tempo de semi-vida esperado. O $t_{1/2}$ foi calculado por substituição, primeiramente, dos valores obtidos na equação de decaimento radioactivo definida por:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

em que A_t representa a actividade da amostra em determinado momento, A_0 a actividade inicial, λ a constante de decaimento e t o tempo decorrido entre A_t e A_0 . Convertendo para logaritmos estes valores e representando-os graficamente em função do tempo, obtêm-se uma recta cujo declive define a constante de decaimento, sendo possível então calcular o $t_{1/2}$, através das expressões:

$$\ln(A_t) = \ln(A_0) - \lambda t$$

$$T_{1/2} = \ln(2) / \lambda$$

A Ph. Eur. (Council of Europe, 2014) define que o $t_{1/2}$ da solução estéril de ¹³N-NH₃ deve estar compreendido entre 9 e 11 minutos, podendo a preparação ser libertada para administração ao paciente antes do teste ser finalizado.

3.1.5.2. Espectroscopia Gama

A identificação da amostra pode ser igualmente verificada através do espectro de energia obtido, para o presente estudo, com um contador de poço (Capintec) com analisador multicanal. Este mede a distribuição da intensidade da radiação gama emitida pelo radionuclídeo em função da energia dos fotões.

Procedeu-se à calibração do espectrómetro através da medição da energia de uma fonte radioactiva calibrada de céσιο-137 (^{137}Cs). No ecrã táctil do aparelho foi seleccionada a opção “*Auto Calibrate*” (Figura 3) e colocada no contador de poço a fonte de ^{137}Cs . A calibração automática começou após a selecção da opção “*Cal with Cs137*”.



Figura VI - Representação da interface principal de um contador de poço (Adaptado de Capintec, 2013)

Terminado o processo de calibração, foi analisada uma amostra de [^{13}N]- NH_3 . Colocou-se o *ependorf* com uma alíquota do produto final no contador de poço e seleccionou-se a opção “*Measurement*” (Figura 6), obtendo-se o espectro de radiação gama após cerca de 60 segundos.

Os fotões resultantes da aniquilação dos positrões emitidos pelo [^{13}N] possuem uma energia de 0,511 MeV, podendo, eventualmente, surgir um pico total de 1,022 MeV (Council of Europe, 2014), resultante da sobreposição da detecção dos dois fotões de 0,511 MeV.

3.1.5.3. Impurezas após Decaimento

De modo a apurar uma possível existência de impurezas radionuclídicas na solução de $^{13}\text{N-NH}_3$ procedeu-se à conservação, durante cerca de 2h, do *ependorf* que continha a alíquota previamente analisada relativamente à energia dos fotões gama no contador de poço (Capintec). Dado o curto $t_{1/2}$ do $[^{13}\text{N}]$, ao fim deste período de tempo apenas existirão eventuais impurezas com semi-vida mais longa. A amostra foi analisada, tendo-se registado o respectivo espectro de radiação gama.

A Ph. Eur. define que a radioactividade gama total associada a impurezas não deve ultrapassar 1,0% da radioactividade total (Council of Europe, 2014).

3.1.6. Determinação da Radioactividade

Após inspecção da aparência da amostra dentro do frasco que a continha foi imediatamente determinada a sua actividade radionuclídica. Para tal, o frasco foi posicionado na câmara de ionização de um calibrador de doses (MED Nuklear-Medizintechnik) e efectuada a medição da actividade, após medição primária sem qualquer amostra. Registou-se o valor obtido, bem como a hora da medição.

3.2. Controlo das Propriedades Biológicas

3.2.1. Esterilidade

Os ensaios de esterilidade das amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foram realizados num laboratório acreditado para a realização destes testes em medicamentos injectáveis para uso humano (Laboratório Micro.Bios, Barcelona, Espanha) através do método directo de inoculação. Este consiste na transferência, em condições assépticas, do produto para um meio de cultura apropriado, procedendo-se à respectiva incubação durante 14 dias.

A Ph. Eur. indica a utilização dos meios de tioglicolato, para pesquisa de bactérias anaeróbias (e algumas aeróbias, eventualmente) e de hidrolisado de caseína e soja, aplicado à investigação da presença de fungos, de leveduras e de bactérias aeróbias. É, ainda, admitida a hipótese de serem utilizados outros meios, desde que estes satisfaçam aos ensaios de crescimento e validação (Council of Europe, 2014a).

A amostra terá que satisfazer ao ensaio de esterilidade prescrito na farmacopeia, pela ausência de observação de qualquer crescimento microbiano, quando comparada com um controlo positivo e um negativo, podendo ser libertada para administração ao paciente antes de terminado o ensaio.

3.2.2. Teste para Presença de Endotoxinas Bacterianas

O teste de apirogenicidade (ou teste LAL, do inglês *Limulus Amebocyte lysate*), foi realizado para detectar a presença de endotoxinas bacterianas na solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$. Quando exposto a endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de membrana de bactérias gram-negativas, o lisado obtido a partir dos amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*, aumenta em opacidade, bem como em viscosidade, podendo formar um gel, dependendo da concentração da endotoxina. O teste utilizado foi o Método A – Gelificação: Ensaio Limite, descrito na Ph. Eur. (Council of Europe 2014a).

Para este teste, aos tubos disponibilizados no *kit* foram adicionados, respectivamente, 0,2 mL de água apirogénica (Braun) (controlo negativo), da amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (sem endotoxinas detectáveis), de uma mistura de endotoxina em concentração 2λ com água apirogénica (Braun) (testemunha para a sensibilidade declarada do lisado) e de uma mistura de endotoxina em concentração 2λ com $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (controlo de interferência), sendo λ a sensibilidade declarada para o lisado. Os testes foram realizados em duplicado e a solução padrão de endotoxina de concentração 2λ foi preparada a partir de uma solução mãe de endotoxina de concentração 1UE/mL.

Após um período de incubação de 60 minutos a 37°C , os tubos foram invertidos 180° para averiguação da formação de gel. Um resultado é positivo quando há formação de um gel sólido que não se desloca quando da inversão do tubo. Caso contrário o resultado é negativo.

Segundo a Ph. Eur. (Council of Europe, 2014a), a concentração máxima permitida de endotoxinas não pode ultrapassar os $175/V$ U.I./ml, sendo V a dose máxima recomendada, em mililitros. A preparação pode ser libertada para utilização antes do ensaio ser terminado.

4. Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos foi utilizada uma estatística descritiva, através da determinação da percentagem de impurezas radionuclídicas, da média como medida de tendência central e desvio padrão como medida de variabilidade. A análise foi realizada utilizando o Programa de Folha de Cálculo *Microsoft Excel* 2013.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

CAPÍTULO III - RESULTADOS

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

1. Avaliação das Propriedades Físico-Químicas da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

1.1. Aparência da Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

Tal como indicado no capítulo II, o produto final foi sujeito a análise por inspeção visual através do vidro plumbífero. Para as amostras analisadas (n=6), verificou-se a sua total limpidez e ausência de cor (Figura VII), mantendo as características correspondentes à água utilizada para a produção da $^{13}\text{N}\text{-NH}_3$ e, portanto, às condições iniciais. Constatou-se, igualmente, a ausência de partículas em suspensão nas amostras.



Figura VII - Imagem representativa do aspecto da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, analisada por inspeção visual, através de vidro plumbífero.

1.2. pH da Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

O teste para verificação do pH de cada amostra foi realizado através de determinação potenciométrica segundo a monografia genérica 2.2.3 da Ph. Eur. (Council of Europe, 2014b). Como intervalo de referência foi utilizado o 4,5 – 8,5 (comum para outros radiofármacos PET, como a FDG) tendo em conta o pH da solução utilizada como matéria de partida (água para injectáveis, Braun). Todos os lotes de validação (Lotes 4 - 6) se encontravam dentro do intervalo analisado. Um dos lotes de optimização do processo (Lote 2) apresentou um valor de pH de 9,41 (Tabela III).

Tabela III - Valores de pH obtidos para os diferentes lotes de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Lote		pH	Limite 4,5 – 8,5
Otimização	1	7,76	Sim
	2	9,41	Não
	3	6,39	Sim
Validação	4	5,51	Sim
	5	5,23	Sim
	6	4,50	Sim

1.3. Pureza Química

A presença de alumínio da preparação final foi verificada recorrendo-se a um teste colorimétrico, como indicado. Não se verificou diferença significativa de cor entre as soluções, para todos os lotes produzidos ($n=6$), após o tempo aguardado para ocorrer a reacção (Figura VIII). A solução teste ($[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$) apresentou-se em todos os casos com uma tonalidade alaranjada, igual ou ligeiramente inferior à da solução de referência.

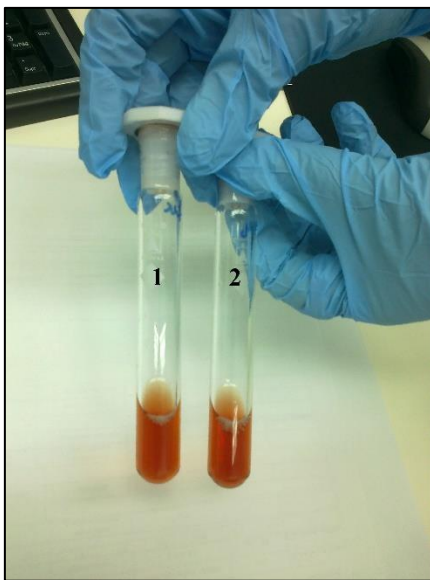


Figura VIII - Imagem representativa do resultado obtido no teste colorimétrico utilizado para determinação da presença de alumínio nas amostras ($n=6$). 1 – Solução de referência; 2 – Solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

1.4. Identificação e Determinação da Pureza Radioquímica da Solução de $^{13}\text{N-NH}_3$

Para a identificação das amostras e determinação da sua pureza radioquímica procedeu-se a uma análise através de um sistema de cromatografia iónica (HPIC) ao qual foi acoplado um detector de radioactividade. Todos os cromatogramas obtidos utilizando a solução teste e detector de radioactividade (Figura IX) mostraram um pico cujo tempo de retenção era semelhante ao obtido para a solução de referência (Figura X). Verificou-se para o cromatograma obtido com o detector de radioactividade para o lote 3, a presença de um pico adicional correspondente a 8,25% da radioactividade total, aos 0,80 minutos de corrida. Nas 3 produções de validação, o radiocromatograma não mostrou evidências da presença de impurezas em limite superior ao especificado pela Ph.Eur. (Council of Europe, 2014), isto é, 1% (Tabela IV).

Tabela IV - Dados obtidos para o tempo de retenção e percentagem de área dos picos adquiridos com as amostras de $[^{13}\text{N-NH}_3]$ e o respectivo padrão, utilizando detectores de condutividade e de radioactividade, para análise num sistema de HPIC.

Lote	T_r $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (min)	% Área	T_r impurezas (min)	% Área	T_r padrão NH_3 (min)
4	5,98	99,00	0,98	1,0	5,94
5	6,30	100,0	Não Aplicável	Não Aplicável	5,94
6	5,41	99,75	0,78	0,25	5,94

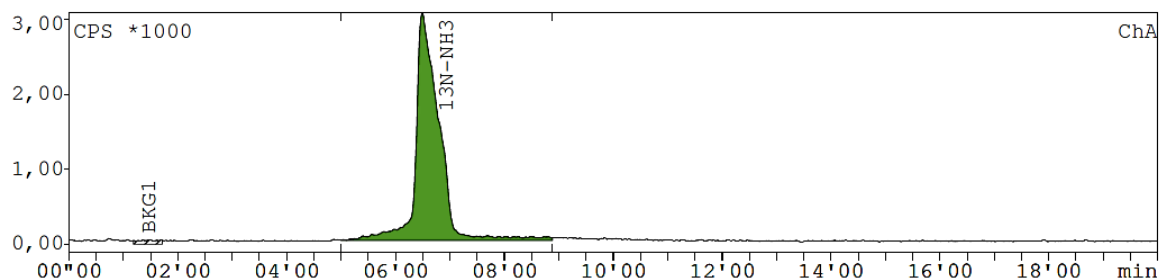


Figura IX - Radiocromatograma representativo da injeção de uma solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, no sistema de HPIC, para uma corrida de 20 minutos. Tempo de retenção = 6.30 minutos.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

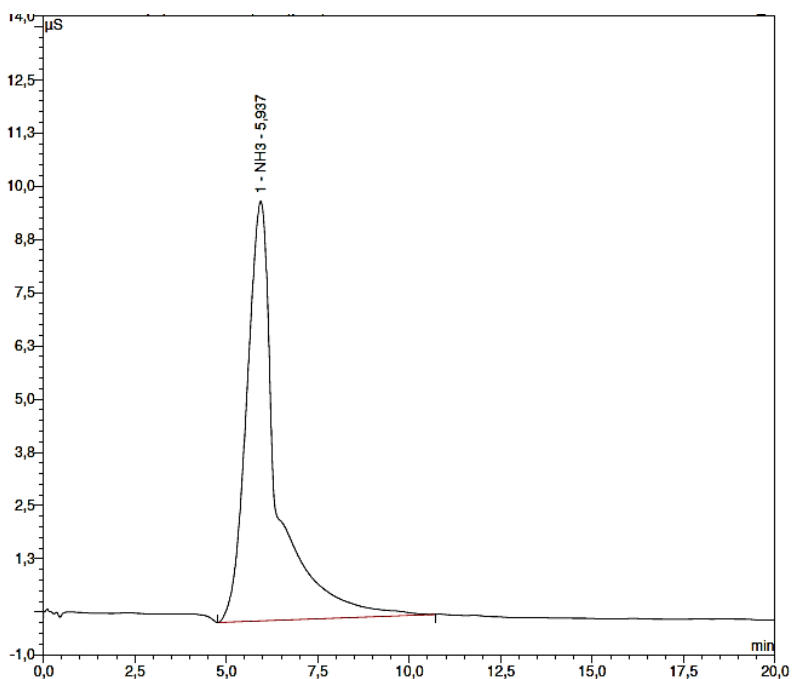


Figura X - Cromatograma representativo da injeção de uma solução de referência (NH_3), no sistema de HPIC, para uma corrida de 20 minutos. Tempo de retenção = 5,94 minutos.

De forma a efectuar a identificação química das amostras, cada cromatograma obtido com a solução a testar foi comparado com o cromatograma obtido para a solução de referência (Figura X), tendo-se verificado (Tabela V) que o pico principal do cromatograma obtido com a respectiva solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ tinha um tempo de retenção aproximadamente igual ao pico do cromatograma obtido com a solução de referência (NH_3).

Tabela V - Resultados adquiridos para a comparação entre o pico principal dos cromatogramas obtidos com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e o pico principal do cromatograma obtido com a solução de referência (NH_3).

Lote	T_r pico $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3 \cong T_r$ pico NH_3
4	Sim
5	Sim
6	Sim

De forma a identificar o pico detectado antes do primeiro minuto nos cromatogramas obtidos com o detector de condutividade e a impureza detectada no cromatograma obtido com o detector de radioatividade no lote 6, ainda que em pouca quantidade, efectuou-se uma nova análise por HPIC, injectando, separadamente, NaNO_2 , NH_3 e NaCl , usando, além do detector de condutividade, o detector de UV, em série, com leituras a 210 nm e 254 nm.

O NaNO_2 foi identificado como composto com um tempo de retenção de 4,67 minutos no cromatograma obtido com os detectores de condutividade e de UV-Vís, em série (Figura XI) e apenas com o detector de UV-Vis (Figura XII), respectivamente. A análise dos cromatogramas permite verificar ainda que, a 210 nm, o Na^+ absorve, enquanto a 254 nm, apenas o NO_2^- assume esse comportamento.

Adicionalmente, o cromatograma obtido para NaCl indicou a sua determinação aos 4,17 minutos, (Figura XIII), utilizando os detectores de condutividade e UV-Vís em série. No cromatograma obtido com o detector de UV-Vís, o tempo de retenção foi de 4,63 minutos.

Os cromatogramas obtidos para a solução de NH_3 mostraram a existência de um pico principal aos 4,91 minutos e uma impureza aos 4,12 minutos (Figura XIV) com a detecção em série, e um pico principal aos 5,35 minutos, juntamente com uma impureza aos 4,37 minutos, com a detecção por UV.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

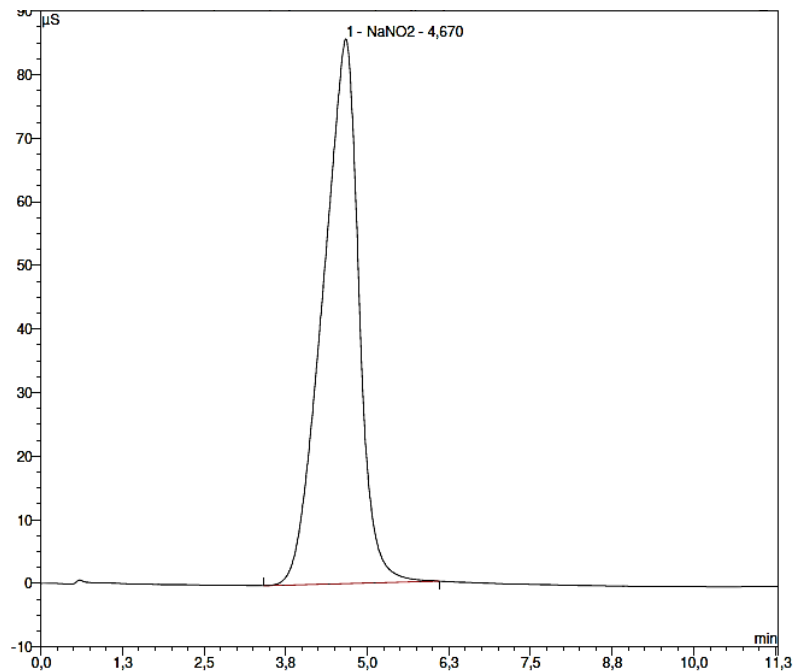


Figura XI - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NaNO_2 no sistema de HPIC, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção – 4,67 minutos.

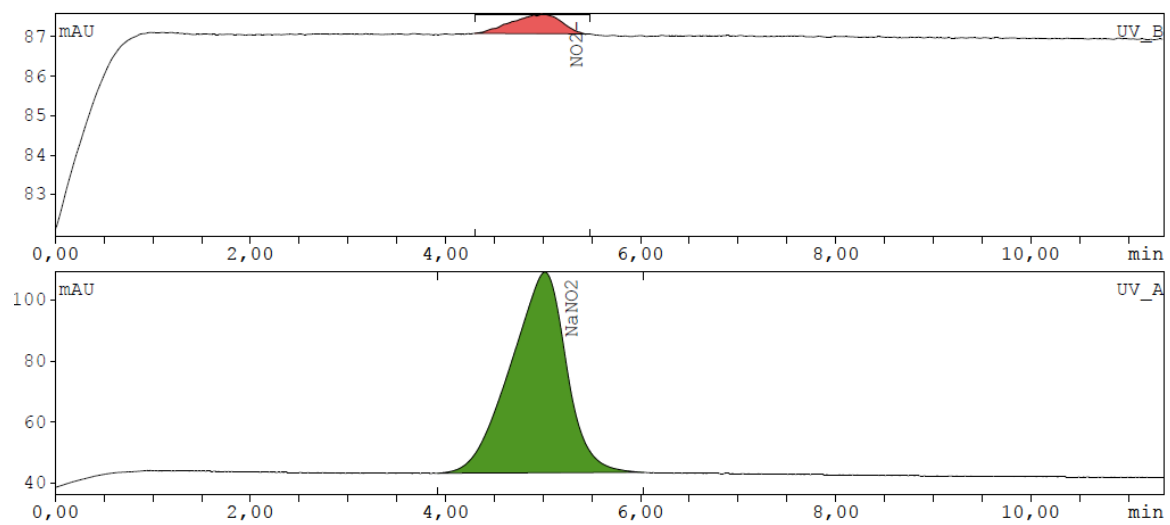


Figura XII - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NaNO_2 no sistema de HPIC, utilizando o detector UV. UVA – Comprimento de onda de 210 nm. UVB – Comprimento de onda de 254 nm. Tempo de retenção UVA – 5.02 minutos; Tempo de retenção UVB – 5.00 minutos.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

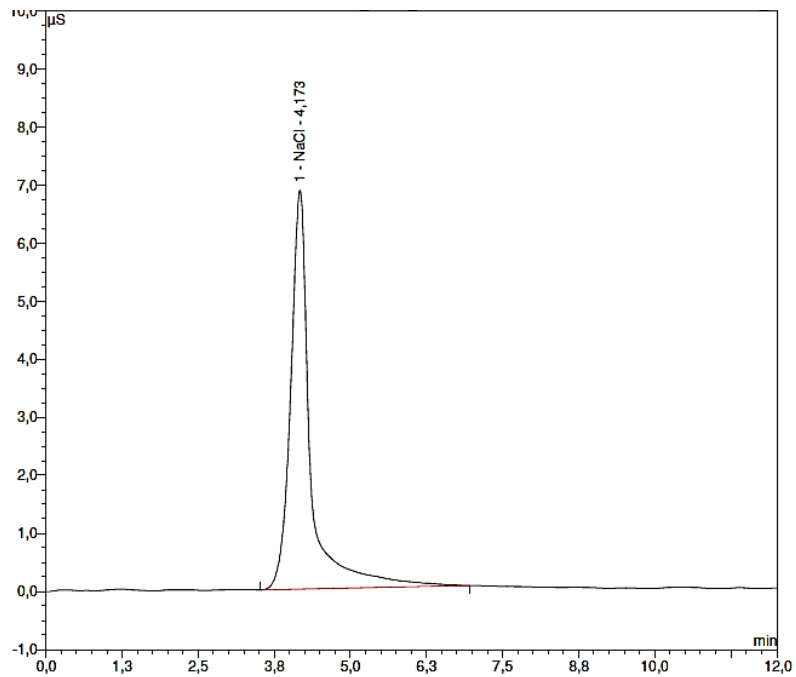


Figura XIII - Cromatograma obtido após injeção de 20 μL no sistema HPIC de uma solução de NaCl 0,9%, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção – 4,17 minutos.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

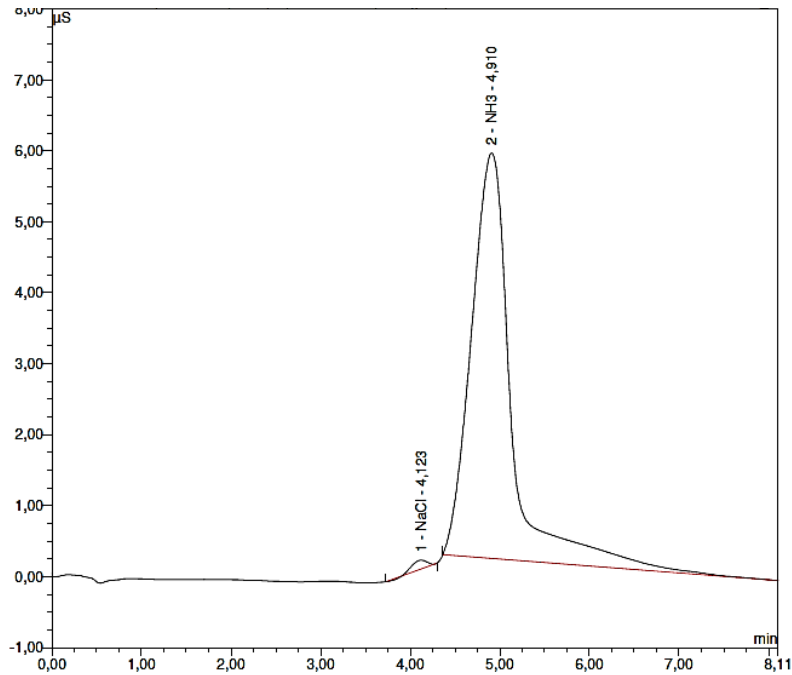


Figura XIV - Cromatograma obtido após injeção de uma solução de NH_3 no sistema de HPIC, utilizando os detectores de condutividade e UV, em série. Tempo de retenção NH_3 – 4,91 minutos; Tempo retenção impureza – 4,12 minutos.

1.5. Identificação e Determinação da Pureza Radionuclídica da Solução de $^{13}\text{N}\text{-NH}_3$

1.5.1. Semi-Vida

De modo a averiguar o $t_{1/2}$ das amostras do presente estudo, procedeu-se à análise através de um calibrador de doses. A actividade foi medida em 6 intervalos de tempo e a semi-vida calculada através do método descrito no capítulo II (Tabela VI).

Tabela VI - Valores obtidos para o $T_{1/2}$ das amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e respectivos desvios para o $t_{1/2}$ alvo (9,96 min).

Lote	$t_{1/2}$ obtido (min)	Limite 9-11 min
4	9,97	Sim
5	9,98	Sim
6	9,97	Sim
$t_{1/2}$ alvo: 9,96 minutos		
$T_{1/2}$ alvo especificado pela Farmacopeia Europeia: 9 - 11 minutos		

É possível verificar através da Tabela 6 que todos os lotes de validação de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ preenchem os requisitos da Ph. Eur. relativamente ao $t_{1/2}$, uma vez que se inseriam no intervalo especificado entre 9 e 11 minutos.

1.5.2. Espectro das Radiações Gama

Utilizando um contador de poço com analisador multicanal, foi possível obter o espectro de radiação gama das soluções correspondentes aos 3 lotes de validação. Verificou-se, para todos os casos, a existência de um pico principal a 0,511 MeV e de um pico soma correspondente a 1,022 MeV, tal como exemplificado na Figura XV.

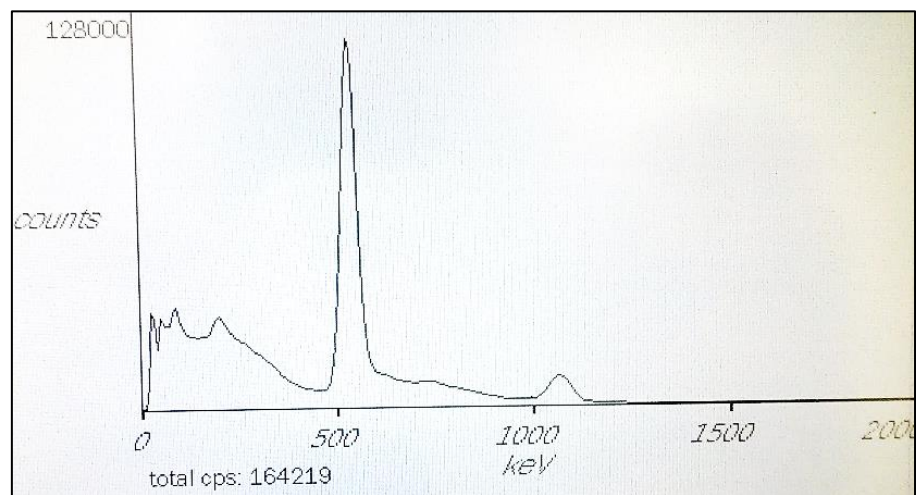


Figura XV - Imagem representativa do espectro de radiação gama do produto final. Pico principal a 0,511 MeV e adicional correspondente a 1,022 MeV.

1.5.3. Impurezas Emissoras Gama

O espectro de radiação gama obtido 2h após o fim da síntese (EOS – do inglês *End of Synthesis*), para produção de $^{13}\text{N}\text{-NH}_3$, indicou a inexistência de impurezas radionuclídicas significativas para a totalidade nas amostras (Figura XVI). Apenas uma foi apontada como tendo 0,51% de impurezas (Tabela VII), valor inferior aos 1,0% indicados pela Ph. Eur. para a radioatividade gama total associada a estas impurezas, relativamente à radioatividade total (Council of Europe, 2014e).

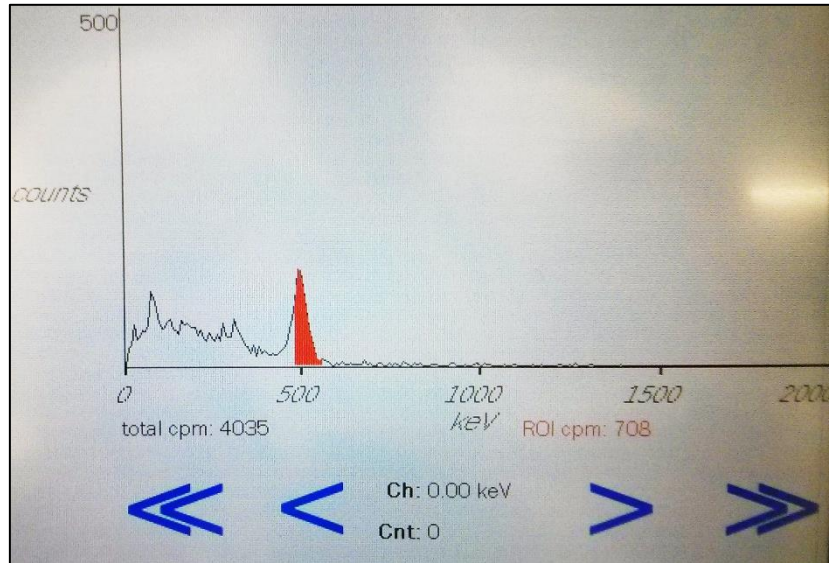


Figura XVI - Imagem representativa do espectro de radiação gama obtido 2h após a síntese radioquímica, para as amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Tabela VII - Percentagem de impurezas radionuclídicas presentes nas amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Lote	% Impurezas
4	0
5	0,51
6	0

2. Controlo Biológico da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

2.1. Esterilidade

Ao contrário dos restantes testes incluídos no processo de controlo de qualidade da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, a esterilidade das preparações foi testada em laboratório independente, para onde vão igualmente ser testados outros radiofármacos produzidos na instituição. Todos os 3 lotes de validação foram encaminhados para o laboratório a fim de ser testada a sua esterilidade, cujo resultado se verificou ser positivo, devido à ausência de crescimento bacteriano nos meios inoculados com a solução final.

2.2. Teste de Endotoxinas Bacterianas

2.2.1. Confirmação da Sensibilidade Declarada do Lisado

A Ph. Eur. define que a sensibilidade declarada pelo fabricante (λ) para o lisado é válida e pode ser utilizada para os ensaios realizados com o mesmo lisado, quando o valor da média geométrica da concentração no ponto de equivalência (ponto final de gelificação obtido nas diferentes séries de soluções padrão) estiver compreendido entre $0,50\lambda$ e 2λ (Council of Europe, 2014a) (0,06 EU/mL e 0,25 EU/mL).

Após a incubação da mistura de lisado com cada uma das soluções padrão, foi verificada a integridade dos géis. Verificou-se um resultado negativo para todas as replicatas da solução padrão de concentração mais baixa (0,03 EU/mL) e resultado positivo para as restantes concentrações (0,06 EU/mL, 0,125 EU/mL, 0,25 EU/mL e 0,50 EU/mL). A sensibilidade do lisado foi, então, calculada através da equação descrita anteriormente no capítulo II, tendo-se obtido o valor para λ de 0,06 EU/mL.

2.2.2. Gelificação nas Amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

A formação de gel foi verificada para todas as réplicas dos tubos, com as respectivas misturas reaccionais. Observou-se a formação de gel apenas para os tubos de padrão de endotoxina de concentração 0,25 EU/mL (2λ) com água apirogénica e $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, respectivamente, ou seja, um resultado negativo para a amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

3. Outros Testes de Controlo de Qualidade da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$

3.1. Integridade do Filtro

Apesar de não ser um requerimento da farmacopeia, foi realizado o teste da integridade do filtro utilizado para filtração da preparação de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

O certificado de qualidade do filtro indica que o filtro é fabricado e testado de modo a ter uma pressão de "ponto de bolha" superior a 3,45 Bar. Verificou-se que para os ensaios realizados (n=3), a pressão a que ocorreu a formação do fluxo contínuo de bolhas na água foi de 4.1, 4.1 e 4.5 (Tabela VIII), respectivamente, ou seja, a uma pressão superior ao limite especificado pelo fabricante do filtro.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Tabela VIII - Pressão à qual ocorre formação de bolhas de água, obtida para os filtros utilizados nos três últimos ensaios.

Lote	Ponto de bolha pelo fabricante (Bar)	Ponto de bolha obtido (Bar)
4	> 3,5	4,4
5	> 3,5	4,1
6	> 3,5	4,5

3.2. Radioactividade

Por observação da Tabela IX é possível verificar-se que a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ é produzida com uma actividade na EOS entre 23,07 e 34,74 mCi.

Tabela IX - Valores de actividade obtidos para os três últimos ensaios, medidos através de calibrador de doses, no fim da síntese (EOS).

Lote	Actividade EOS (mCi)	Hora (h:m)
1	19,82	15:35
2	22,74	17:57
3	32,32	15:21
4	22,21	10:22
5	34,74	11:58
6	23,07	17:02
Média	25,82 mCi \pm 6,130	

CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Discussão

Tal como todos os produtos farmacêuticos, os radiofármacos são sujeitos a um rigoroso processo de controlo de qualidade que assegure não só a segurança dos pacientes nos quais estes vão ser administrados, mas também a eficácia do produto, isto é, a obtenção da melhor resolução e qualidade possíveis para a imagem por PET ou PET/CT. As preparações radiofarmacêuticas são sujeitas, portanto, a um controlo que permite assegurar a administração ao paciente de um produto estéril e apirogénico, com a melhor combinação radionuclídeo – vector fisiológico, na dose correcta e com as características físicas e químicas adequadas, de modo a produzir o efeito desejado e impedir toxicidade.

A $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ é considerada um radiofármaco seguro e eficaz, tendo sido aprovada tanto pela FDA como pela Phar. Eur. para a avaliação da perfusão miocárdica sob condições de descanso ou de stress farmacológico, através de estudos clínicos por PET em pacientes suspeitos ou possuidores de doença arterial coronária (vom Dahl, 2001) .

Em Portugal, o ICNAS assume um papel fundamental na produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e de muitos outros radiofármacos, uma vez que se apresenta como a primeira instituição pública do país a possuir um ciclotrão, permitindo a produção de uma variedade de radionuclídeos necessários para a obtenção de radiofármacos utilizados em PET, reduzindo, deste modo, os custos associados à importação dos produtos, nomeadamente de Espanha, e possibilitando aos centros detentores de tecnologia PET e aos seus pacientes uma redução do tempo necessário para a realização dos exames. Além disso, a actividade inicial do radiofármaco não necessita de ser tão elevada, uma vez que o local de produção do radionuclídeo e de realização de PET com este radiofármaco é o mesmo (ICNAS).

Até ao momento, a produção sistematizada e a comercialização de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ pelo ICNAS ainda não foi posta em prática, sendo necessária a validação do método de produção utilizado, nomeadamente a partir dos testes de CQ. É neste âmbito que se insere o presente estudo. Os testes analíticos aos lotes produzidos no LRC do ICNAS foram realizados tendo em consideração as directrizes da Farmacopeia Europeia 8.2, nomeadamente da respectiva monografia.

Vários métodos foram reportados para a produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (Berridge & Landmeier, 1993; Mulholland et al., 1990; Sobczyk et al., 2002). O $[^{13}\text{N}]$ é usualmente produzido através da reacção nuclear $^{16}\text{O} (p, \alpha)^{13}\text{N}$ e convertido a $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ através de métodos de redução clássicos ou directamente no alvo, sendo as espécies reduzidas, normalmente os óxidos de azoto (NO_x), produtos indesejáveis para o radiofármaco.

Dos métodos de redução supracitados destacam-se, entre os clássicos, o método da liga de DeVarda (*Devarda's alloy*) e entre os que actuam no alvo, o método da adição de etanol.

Neste último, é prevenida a oxidação de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ a $[^{13}\text{N}]\text{O}_2^-$ e $[^{13}\text{N}]\text{O}_3^-$ por adição de etanol à água irradiada no alvo (Wieland et al., 1991; Berridge & Landmeier, 1993). O etanol actua como “*scavenger*” de radicais livres responsáveis pela formação dos nitratos e nitritos. Por ser um método simples, económico (relativamente a outros métodos), eficiente e permitir melhorar o rendimento radioquímico da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ (Wieland, et al. 1991), foi este o método escolhido para a sua produção no ICNAS, obtendo-se, no fim de síntese, valores na ordem de 19,82 e 34,74 mCi. Uma vez que a actividade tipicamente administrada aos pacientes ronda os 10-20 mCi (Feinstein Institute for Medical Research (Chaly. T), 2011) e que o $[^{13}\text{N}]$ possui uma semi-vida de 9,96 minutos, torna-se necessária a rápida libertação do radiofármaco para a realização do exame clínico, neste caso específico, dentro das instalações do ICNAS.

Na produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e de radiofármacos em geral, como já foi referido, aplicam-se os princípios de cGMPs, de modo a serem obtidos produtos com qualidade e segurança determinantes para administração em humanos (EudraLex, 2008a; EudraLex, 2008b). O processo de CQ da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi realizado tendo em conta as cGMPs e as directrizes da farmacopeia, pretendendo-se a obtenção de pelo menos três lotes consecutivos com vista à validação do processo de produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ supracitado (EudraLex, 2014), para estudos clínicos por PET.

As propriedades físico-químicas da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foram avaliadas primeiramente, iniciando-se desde logo, com a análise da aparência e pH das amostras. A aparência do produto final pode reflectir, em parte, as características e condições originais da sua preparação ou a possível existência de falhas em diferentes fases do processo de produção e síntese radioquímica, nomeadamente ao nível da filtração ou até da manipulação dos reagentes e materiais utilizados. A Ph. Eur. (Council of Europe, 2014) define que a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ deve ser incolor e encontrar-se límpida, sem a presença de quaisquer partículas. Alterações na cor ou aspecto da solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ indicam adulterações que podem modificar o seu comportamento biológico (Saha, 2010) e, eventualmente, prejudicar o paciente ou impedir a obtenção de uma boa imagem por PET (ou PET/CT), pelo que é imperativo analisar a sua aparência.

A inspecção visual ao frasco com a amostra de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ foi realizada através do vidro plumbífero, para minimizar a exposição à radiação. Todas as amostras analisadas (n=6) se apresentavam límpidas e ausentes de partículas, cumprindo, deste modo, os requisitos da farmacopeia. Não há evidência de qualquer tipo de contaminação, resultante dos materiais utilizados ou da manipulação durante todo o processo, ou de alguma falha durante o processo que pudesse alterar as propriedades da solução final.

De igual modo, a estabilidade e integridade dos Radiofármacos estão intrinsecamente ligadas ao seu valor de pH, que deve ser apropriado desde o momento da sua formulação até à

administração ao paciente. Idealmente, o pH da solução preparada deve ser o mais próximo possível do pH fisiológico (pH do sangue), isto é, pH aproximadamente igual a 7,4. Porém, dado o efeito tampão do sangue, o intervalo de valores de pH aceites pode ser alargado (Saha, 2010). Desvios destes valores podem indicar anomalias ao nível da produção e preparação do produto, que necessitam ser detectados e remediados.

O teste para verificação do pH de cada amostra foi realizado por potenciometria, medindo a diferença de potencial entre um eléctrodo de vidro sensível aos iões hidrogénio, mergulhado na solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, e um eléctrodo de referência. Este foi o método utilizado, ao invés de papel indicador de pH, para uma maior precisão da avaliação e dos resultados. Numa das produções iniciais (durante a fase de optimização) um dos valores obtidos para o pH estava fora do limite estabelecido. Este valor foi atribuído ao facto de o alvo de azoto-13 ter sido instalado no ICNAS em 2008, mas nunca ter sido utilizado até à actual produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, pelo que é considerado normal, nas primeiras utilizações, haver ainda impurezas decorrentes do seu processo de produção. Esta situação não tornou a ocorrer nas produções subsequentes, com todos os valores de pH dentro do intervalo considerado.

A pureza química de um radiofármaco define-se como a fracção da massa total deste na forma química desejada. Algumas impurezas químicas podem não só interferir no processo de marcação, e consequentemente na eficácia do diagnóstico, como ser nocivas para o paciente após a administração do radiofármaco, caso estejam em níveis suficientes para provocar esses danos. Este tipo de impurezas pode resultar nomeadamente da decomposição dos reagentes ou materiais envolvidos antes ou após a marcação ou da sua adição inadvertida durante este procedimento (Saha, 2010).

No caso específico da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, a potencial impureza química apontada como alvo de análise pela Ph. Eur. é o alumínio. Em excesso, este metal, o mais abundante da crosta terrestre, pode provocar toxicidade em vários órgãos, nomeadamente através da inibição da actividade de algumas enzimas, da síntese proteica, e de alterações na função de ácidos nucleicos, bem como da permeabilidade da membrana celular (Verstraeten et al., 2008).

Apesar de não ser utilizada liga de Devarda, constituída por alumínio, cobre e zinco, para redução de nitratos e nitritos de $[^{13}\text{N}]$ neste processo de produção, o alvo utilizado durante a irradiação da água com etanol era constituído por alumínio, pelo que se justifica a execução do teste. Deste modo, cumpriu-se a indicação da farmacopeia para avaliação da pureza química da amostra, através da determinação da presença de alumínio. Utilizou-se, para o efeito, um teste colorimétrico baseado na interacção entre o cromazurol S e o alumínio, na presença de tampão acetato pH 4.6, com formação de um complexo com cor. Esta foi então comparada com a cor da solução de referência preparada com uma concentração correspondente à quantidade máxima recomendada de alumínio na preparação

radiofarmacêutica pela farmacopeia, isto é, 2 ppm (Council of Europe, 2014). As propriedades quelantes do cromazurol S devem-se à presença de grupos oxigenados que se podem ligar ao metal.

Em todos os ensaios realizados não foram observadas diferenças na tonalidade da cor das amostras de [¹³N]-NH₃ comparativamente à da solução de referência. Ambas as soluções apresentavam uma cor alaranjada. Assim, e de acordo com farmacopeia, todas as soluções apresentam pureza química, ao não ser detectada a presença de alumínio em concentração superior a 2ppm.

A informação acerca deste teste e dos resultados que se podem obter eventualmente é escassa na literatura e mesmo a farmacopeia não indica a suposta cor que as soluções devem ter. A literatura indica, no entanto, que outros iões metálicos, como Fe³⁺ e Cu²⁺ podem interferir na reacção entre o alumínio e o cromazurol S, uma vez que também eles reagem com o cromazurol S (Musil & Theis, 1955; citado em Hosoya et al., 1960).

Em termos futuros, de modo a serem obtidos resultados quantitativos relativos à presença de alumínio nas amostras, seria vantajoso proceder, igualmente, a uma quantificação por espectrofotometria de UV-Vís, ou ainda pela espectroscopia de absorção atómica, cuja aplicação foi já demonstrada na determinação de metais (Amos & Thomas, 1965; Conti, 1997; Nguyen et al., 2004). Esta última é uma técnica bastante sensível, permitindo a redução ou eliminação de interferências que possam alterar os resultados, pelo que seria um bom complemento ao teste colorimétrico, em casos de dúvida sobre a concentração de alumínio nas amostras.

A examinação dos cromatogramas obtidos através da análise por HPIC contribui não só para a identificação das amostras, como para a determinação da sua pureza radioquímica. Durante o processo de optimização verificou-se a presença de uma impureza nos cromatogramas obtidos com o detector de condutividade e de radioactividade, por volta do primeiro minuto de corrida. Inicialmente, colocou-se a hipótese de ser um óxido de azoto, pelo que se injectou NaNO₂, NH₃ e NaCl no sistema HPIC, utilizando um detector de condutividade e um detector de UV, em série. Acoplou-se esta última detecção de forma a ser possível a detecção do ião NO₂⁻, segundo dados da literatura (Pastore et al., 1989). Enquanto todos os compostos absorvem a 210 nm, apenas com o NaNO₂ se observa absorção a 254 nm. Verifica-se, ainda, que o tempo de retenção obtido encontra-se próximo do tempo de retenção do pico correspondente ao sódio. Além disso, quando é injectada a amostra, não se verifica a presença de dois picos de actividade a esse tempo de retenção, pelo que se conclui que NaNO₂ não corresponde à impureza detectada nos cromatogramas e que aparecem muito mais cedo. É muito provável que a impureza encontrada numa pequena percentagem no lote 6, corresponda a H₂[¹⁵O], indicada, igualmente, pela farmacopeia. Com efeito, este pico desapareceu

rapidamente quando a amostra foi reprocessada alguns minutos mais tarde, o que é compatível com a curta semi-vida do oxigênio-15 (122 segundos). O pico observado imediatamente antes do pico identificado como NH_3 na amostra de referência injectada corresponde a NaCl que terá ficado no sistema cromatográfico quando da última injeção. O padrão de NaCl permite a sua identificação.

Para todos os lotes, os cromatogramas obtidos com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e o detector de actividade mostraram um pico principal cujo tempo de retenção era aproximadamente igual ao tempo de retenção do pico do cromatograma obtido com a solução de referência e o detector de condutividade. Deste modo, confirma-se a adequação do sistema utilizado para a presente análise.

A identificação do radionuclídeo presente na amostra passa, segundo a farmacopeia, pela obtenção do respectivo espectro de radiações gama e pela determinação da sua pureza radionuclídica. A examinação dos cromatogramas obtidos no ensaio para determinação da pureza radioquímica faz, igualmente, parte do processo de identificação da amostra.

Verificou-se para todos os lotes que o pico principal do cromatograma obtido com a solução de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ tinha aproximadamente o mesmo tempo de retenção do pico correspondente ao cromatograma obtido com a solução de referência (NH_3). Deste modo, este teste contribuiu para a identificação das amostras como sendo de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

Por outro lado, as impurezas radionuclídicas podem advir de reacções nucleares indesejáveis induzidas no material alvo, ou num isótopo não alvo, (Qaim, 1993), estando relacionadas, portanto, com o modo de produção e preparação do radiofármaco. Estas impurezas podem não só interferir na obtenção de imagens com qualidade por PET/CT, mas também causar um aumento da dose de radiação e, eventualmente, expor o paciente a uma toxicidade indesejável.

A Ph. Eur. define a determinação do $t_{1/2}$ e a investigação de eventuais impurezas emissoras gama como testes a realizar para verificação da pureza radionuclídica das amostras de $^{13}\text{N}\text{-NH}_3$ (Council of Europe, 2014).

Um determinado $t_{1/2}$ é definido como o tempo necessário para reduzir a actividade inicial de um radionuclídeo para metade, sendo característico desse mesmo radionuclídeo (Saha, 2010).

A amostra correspondente ao lote 2 apresentou um valor acima do limite máximo indicado pela farmacopeia. Tendo em conta este resultado pode colocar-se a hipótese da existência de impurezas radionuclídicas na mesma, como $[^{18}\text{F}]$, que possui um $t_{1/2}$ maior (aproximadamente 110 min) e que é apontado pela farmacopeia como possível impureza

resultante do processo de produção da $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$. Contudo, não foi possível provar esta hipótese, uma vez que o radiocromatograma obtido durante a análise da pureza radioquímica não apresentava evidências da existência de impurezas.

Para as restantes amostras, uma vez que o $t_{1/2}$ encontrava-se incluído entre 9 e 11 minutos, confirmando-se a identidade do produto final como sendo $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e a sua pureza radionuclídica, no que respeita ao $t_{1/2}$.

Em conjunto com a determinação deste parâmetro, a medida das radiações características emitidas por determinado radionuclídeo é, igualmente, uma forma de chegar à sua identificação. Por si só, este último procedimento não é suficiente para assegurar a correcta identificação, uma vez que a mesma energia de radiação pode corresponder a vários radionuclídeos, isto é, não é possível distinguir entre os radionuclídeos emissores de positrões, por espectrometria de radiação gama.

O $[^{13}\text{N}]$ possui um modo de decaimento β -positrónico (β^+), o que lhe permite ser utilizado para obtenção de imagem por PET (ou PET/CT), uma vez que este exame tem por base a emissão de um positrão durante a desintegração de um radionuclídeo. Neste processo, o positrão encontra um electrão e é aniquilado, dando origem a 2 fotões de energia 0,511 MeV, que são emitidos em direcções opostas (Saha, 2010).

Em todos os casos analisados os espectros obtidos mostravam a existência de um pico principal a 0,511 MeV e de um adicional correspondente a 1,022 MeV, juntamente com dispersão de *Compton* no início (Figura 24). Os resultados obtidos vão ao encontro das indicações da Ph. Eur. (Council of Europe, 2014) e da literatura (Qaim, 1993), relativamente à energia de todos os fotões gama. Conclui-se que as soluções analisadas possuem, de facto, radiação característica de emissores de positrões. Em conjunto com os resultados obtidos para o $t_{1/2}$ estes resultados contribuem para a identificação do produto final como sendo de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$.

A Ph.Eur. aponta, ainda, para a conservação da amostra durante 2h e respectivo registo do espectro de radiação gama da mesma após esse período de tempo (Council of Europe, 2014). Isto permite que haja decaimento do ^{13}N , um radionuclídeo de $t_{1/2}$ curto, e a detecção de possíveis impurezas com $t_{1/2}$ longo. Apesar de o resultado obtido para uma das amostras analisadas apontar para a presença de impurezas, este encontra-se abaixo dos 1% estabelecidos pela Ph. Eur., para a radioactividade gama total associada a estas impurezas, relativamente à radioactividade total (Council of Europe, 2014).

Os resultados obtidos através da comparação dos cromatogramas das soluções teste e de referência, a determinação do $t_{1/2}$ e a obtenção dos espectros de radiação gama permitem a confirmação da identidade das amostras como sendo de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ e a determinação da sua pureza radionuclídica. Seria relevante utilizar futuramente um detector de germânio de alta

pureza – HPGe (do inglês *High - Purity Germanium*) para a identificação do radionuclídeo e detecção de impurezas radionuclídicas, uma vez que este detector possui uma resolução em energia muito maior em comparação com os detectores de iodeto de sódio (NaI), permitindo a obtenção de resultados mais fiáveis e precisos (Ely et al., 2004; Perez-Andujar & Pibida, 2004).

Além dos testes físico-químicos, é imperativa a realização do CQ biológico das amostras, mesmo que os resultados não sejam obtidos antes da administração ao paciente, para controlo do processo de produção do radiofármaco e prevenção de casos futuros de contaminação das amostras.

Uma vez que a preparação radiofarmacêutica pode ser libertada para administração antes de serem obtidos os resultados para este teste, torna-se decisiva a aplicação dos princípios actuais de Boas Práticas de Fabrico (cGMP) e das Boas Práticas de Radiofarmácia (cGRPP), com vista à produção e preparação de radiofármacos estéreis e seguros para o paciente, recorrendo a técnicas, materiais e reagentes assépticos. A esterilidade implica a ausência de microorganismos viáveis na preparação radiofarmacêutica (Saha, 2010).

Foi aplicado, durante a preparação de [¹³N]-NH₃ um processo de filtração da preparação através de um membrana porosa ou filtro (neste caso de 0,22 µm) que remove os microorganismos com base no seu tamanho e forma. Para produtos injectáveis, é necessário um filtro com poros de pequeno tamanho para evitar uma possível passagem para a preparação de microorganismos de menor tamanho (Saha, 2010).

O teste do “ponto de bolha” apresenta resultados que permitem concluir que a integridade do filtro utilizado na filtração das amostras de [¹³N]-NH₃ não foi comprometida, pelo que o filtro deverá executar a sua função correctamente, isto é, impedir que eventuais impurezas presentes na solução antes desta etapa possam passar para o produto final. Além disso, são utilizados materiais e reagentes estéreis durante a produção do radionuclídeo e preparação do radiofármaco, e todos os procedimentos são realizados segundo as cGMPs e as cGRPP, pelo que se previne, desde o início, a contaminação das amostras. Como confirmação, o teste de esterilidade realizado apresentou-se negativo para crescimento de microorganismos.

Ainda que sejam utilizados reagentes e materiais de alta qualidade e água apirogénica na preparação dos radiofármacos para evitar a contaminação por pirogénios, é necessário avaliar a presença destes em quantidade que possa colocar em risco a vida do paciente no qual o radiofármaco vai ser administrado. A apirogenicidade é um requisito indispensável não só em preparações radiofarmacêuticas, mas também em todos os produtos para administração em humanos, como vacinas e outros fármacos.

As endotoxinas bacterianas ou pirogénios são geralmente solúveis (Saha 2010) e maioritariamente lipopolissacarídeos (LPS) ou proteínas resultantes do metabolismo de bactérias gram-negativas, nomeadamente *Escherichia coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*. Estas endotoxinas funcionam como pirogénios exógenos e potentes activadores inespecíficos de várias células do sistema imune, como células B e macrófagos (Li et al., 2011), podendo causar sintomas de febre, arrepios, rubores, cefaleia e dores nas articulações, entre outros. Em casos mais graves, mas raros, de intoxicação pode levar a choque séptico e morte.

A avaliação da presença de endotoxinas bacterianas nas preparações de [¹³N]-NH₃ foi conseguida através do método de gelificação. Este baseia-se na capacidade do lisado obtido a partir dos amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus* coagular na presença de endotoxinas. A sensibilidade declarada do lisado foi confirmada, validando-se a realização do teste para determinação de endotoxinas nas amostras. Os controlos positivos (solução de endotoxina em concentração 2λ com água apirogénica e com [¹³N]-NH₃ apresentaram formação de gel após o período de incubação e inversão do tubo em 180°, pelo que os resultados obtidos são positivos. Por outro lado, o resultado foi negativo para o controlo negativo (água apirogénica), pois não foi observada formação de gel. Em comparação com os controlos, os resultados obtidos para as amostras de [¹³N]-NH₃ foram negativos, concluindo-se, então, que as mesmas satisfazem ao ensaio.

Tendo em consideração os parâmetros indicados pela Ph. Eur. e respectivos métodos de análise, foi efectuado o controlo de qualidade das amostras de [¹³N]-NH₃, de modo a otimizar e validar o respectivo processo de produção. Os resultados permitem verificar a obtenção de 3 lotes consecutivos cujos parâmetros avaliados através de procedimentos de CQ se encontram dentro das especificações e limites indicados pela Ph. Eur., apontando para um radiofármaco seguro e de qualidade, obtido através do método da adição de etanol. Assim, será possível a realização de exames de perfusão cardíaca por PET nas instalações do ICNAS, utilizando [¹³N]-NH₃ como radiofármaco de eleição.

CONCLUSÃO

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Conclusão e Perspectivas Futuras

Os resultados permitiram verificar, em suma, que os dados obtidos para os parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados no âmbito do processo de controlo de qualidade das soluções de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, isto é, para aparência, pH, pureza química, identificação, purezas radioquímica e radionuclídica, esterilidade e presença de endotoxinas bacterianas satisfazem os limites e especificações indicados na respectiva monografia e monografia geral de preparações radiofarmacêuticas, da Ph. Eur., em 3 lotes consecutivos, contribuindo deste modo, para a validação da produção de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, uma vez que vão ao encontro, igualmente, das normas europeias no que concerne à validação do processo de fabrico de radiofármacos.

Em termos futuros, será relevante juntar a estes dados outros resultantes de novas produções, como parte de um processo de verificação da consistência de resultados entre diferentes tempos de produção, nomeadamente.

No que concerne aos métodos utilizados para avaliação dos diferentes parâmetros, é, também, de considerar, a aplicação da espectroscopia de absorção atómica para quantificação de alumínio nas amostras de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$, uma vez que é um método mais sensível relativamente ao método colorimétrico, permitindo a obtenção de informação quantitativa que não é possível ser adquirida através do método já utilizado. De igual forma, na determinação de impurezas radionuclídicas, apesar de não terem sido detectadas evidências de algum problema a este nível, seria também importante realizar um conjunto de análises com um detector de germânio ao invés de um detector de iodeto de sódio, normalmente utilizado, para obtenção de resultados mais precisos e impedir que o radiofármaco contenha impurezas que possam alterar a qualidade da imagem ou prejudicar o paciente.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Referências Bibliográficas

- Adeva, M. et al., 2012. Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*, 61, pp.1495–1511.
- Alexánderon, E. et al., 2008. Myocardial ischaemia in patients with primary APS: a ^{13}N -ammonia PET assessment. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47(6), pp.894–6.
- Allen-Auerbach, M. & Weber, W.A., 2009. Measuring response with FDG-PET: methodological aspects. *The oncologist*, 14, pp.369–377.
- Amos, M.D. & Thomas, P.E., 1965. The determination of aluminium in aqueous solution by atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 32, pp.139–147.
- Anderson, C., 1932. Energies of cosmic-ray particles. *Phys Rev*, 40, pp.405–421.
- Barrio, J.R. et al., 1983. Synthesis and myocardial kinetics of N-13 and C-11 labeled branched-chain L-amino acids. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 24, pp.937–944.
- Berridge, M.S. & Landmeier, B.J., 1993. In-target production of $[^{13}\text{N}]\text{ammonia}$: Target design, products, and operating parameters. *Appl. Radiat. Isot*, 44, pp.1433–1441.
- Blackett, P.M.S. & Occialini, G.P.S., 1933. Some Photographs of the Tracks of Penetrating Radiation. *Proc. of the Roy. Soc. of London*, 139, pp.699–727.
- Bringhammar, T. & Zolle, I., 2007. *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine* I. Zolle, ed., Berlin, Heidelberg: Springer.
- Capintec, 2013. CRC -55t Well Counter Owner's Manual. , (9250), pp.1–310. Available at: Capintec, Inc.
- Di Carli, M.F. et al., 2007a. Clinical myocardial perfusion PET/CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 48, pp.783–793.
- Di Carli, M.F. et al., 2007b. Clinical myocardial perfusion PET/CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(5), pp.783–93.
- Castellani, M. et al., 2010. The role of PET with ^{13}N -ammonia and ^{18}F -FDG in the assessment of myocardial perfusion and metabolism in patients with recent AMI and intracoronary stem cell injection. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(12), pp.1908–16.
- CDC, 2013. QuickStats: Number of Deaths from 10 Leading Causes — National Vital Statistics System, United States, 2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 62(8), p.155.
- Cho, Z.H., Chan, J.K. & Eriksson, L., 1976. Circular Ring Transverse Axial Positron Camera for 3-Dimensional Reconstruction of Radionuclides Distribution. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 23, pp.613–622.
- Conti, M.E., 1997. The content of heavy metals in food packaging paper boards: An atomic absorption spectroscopy investigation. *Food Research International*, 30, pp.343–348.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE [¹³N]-NH₃ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- Council of Europe, 2014a. Analytical Methods: Biological methods. In *European Pharmacopoeia, 8th ed.* Strasbourg, p. 572.
- Council of Europe, 2014b. Analytical methods: Physical and physicochemical methods. In *European Pharmacopoeia, 8th ed.* Strasbourg, p. 21.
- Council of Europe, 2014c. *European Pharmacopoeia* 8th ed. Strasbourg.
- Council of Europe, 2014d. General monographs: Radiopharmaceutical preparations. In *European Pharmacopoeia, 8th ed.* Strasbourg, p. 759.
- Council of Europe, 2014e. Radiopharmaceutical preparations: ammonia (¹³N) injection. In *European Pharmacopoeia, 8th ed.* Strasbourg, p. 1047.
- Curie, I. & Joliot, F., 1934. Artificial production of a new kind of radioactive element. *Nature*, 133, p.201.
- Curie, I. & Joliot, F., 1933. Contribution à l'étude des électrons positifs. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 196, pp.1105–7.
- Vom Dahl, J., 2001. Assessing myocardial perfusion with positron emission tomography. *Z Kardiol*, 90, pp.835–847.
- deKemp, R.A. et al., 2000. Detection of serial changes in absolute myocardial perfusion with ⁸²Rb PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 41, pp.1426–1435.
- Dirac, P.A.M., 1930. A Theory of Electrons and Protons. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 126(801), pp.360–365.
- Divgi, C.R. et al., 2007. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncology*, 8, pp.304–310.
- Duara, R. et al., 1986. Positron emission tomography in Alzheimer's disease. *Neurology*, 36, pp.879–887.
- Duhaylongsod, F.G. et al., 1995. Detection of primary and recurrent lung cancer by means of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG PET). *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110, pp.130–140.
- EANM, 2007. Guidelines on Current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the Preparation of Radiopharmaceuticals. *EANM Radiopharmacy Committee*, pp.1–19.
- Eisenberg, R., 1992. *Radiology: An Illustrated History*, St. Louis: Mosby Year Book.
- Elsinga, P. et al., 2010. Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 37(5), pp.1049–62.
- Ely, J.H., Siciliano, E.R. & Kouzes, R.T., 2004. Comparison of NaI(Tl) scintillators and high purity germanium for vehicle portal monitor applications. *IEEE Symposium Conference Record Nuclear Science 2004.*, 3.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- Endo, K. et al., 2006. PET and PET/CT using 18F-FDG in the diagnosis and management of cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 11, pp.286–296.
- EudraLex, 2008a. Manufacture of Radiopharmaceuticals (Annex 3). In *EU Guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP) for Medicinal Products for Human and Veterinary Use (Vol 4)*. pp. 1–8.
- EudraLex, 2008b. Manufacture of Sterile Medicinal Products (Annex 1). In *EU Guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP) for Medicinal Products for Human and Veterinary Use (Vol 4)*. pp. 1–16.
- EudraLex, 2014. Qualification and validation (Annex 15). *EU Guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP) for Medicinal Products for Human and Veterinary Use (Vol 4)*, pp.1–17.
- F.D.A., 2011. PET drugs - Current Good manufacturing Practice (cGMP). *U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*.
- El Fakhri, G. et al., 2009. Reproducibility and accuracy of quantitative myocardial blood flow assessment with (82)Rb PET: comparison with (13)N-ammonia PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(7), pp.1062–71.
- Feinstein Institute for Medical Research (Chaly. T), 2011. *Highlights of Prescribing Information for Ammonia 13N Injection for intravenous use*,
- Gaemperli, O. & Kaufmann, P.A., 2011. PET and PET/CT in cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1228, pp.109–136.
- Harper, P. V et al., 1972. Clinical feasibility of myocardial imaging with 13 NH 3 . *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 13(4), pp.278–80.
- Heilbron, J.L. & Seidel, R.W., 1989. Lawrence and His Laboratory: A History of the Lawrence Berkely Laboratory. *Berkely: University of California Press*, 1.
- Heilbron, J.L., Seidel, R.W. & Wheaton, B.R., 1996. Lawrence and His Laboratory A Historian's View of the Lawrence Years. *Lawrence Berkely Laboratory*.
- Herholz, K., 1995. FDG PET and differential diagnosis of dementia. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.*, 9, pp.6–16.
- Herholz, K. & Heiss, W.-D., 2004. Positron emission tomography in clinical neurology. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 6, pp.239–69.
- Hickey, K.T. et al., 2004. Assessment of cardiac wall motion and ejection fraction with gated PET using N-13 ammonia. *Clinical nuclear medicine*, 29, pp.243–248.
- Holschbach, M. et al., 1997. $[^{13}\text{n}]\text{cisplatin}$: A fast and efficient on-line synthesis using a solid state support. *Applied Radiation and Isotopes*, 48, pp.739–744.
- Hosoya, M., Kakita, Y. & Gotô, H., 1960. Spectrophotometric Determination of Micro-amounts of Aluminium in Iron and Steel with Chrome Azurol S. *Journal of the Japan Institute of Metals*, 24, p.32.
- Hung, J., 2004. Quality control in nuclear pharmacy. In *Kowalsky R, ed. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. pp. 399–450.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- Hung, J.C., 2002. Comparison of various requirements of the quality assurance procedures for (18)F-FDG injection. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 43(11), pp.1495–506.
- Hutchings, M. et al., 2006. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107, pp.52–59.
- Ido, T. et al., 1978. Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 14, pp.175–183.
- Ido, T. & Iwata, R., 1981. Fully automated synthesis of $^{13}\text{N}\text{H}_3$. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 18, pp.244–246.
- Klein, M. et al., 2009. 18F-fluorodeoxyglucose-PET/CT imaging of lungs in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 136, pp.1220–1228.
- Kobayashi, S. et al., 2011. Diagnostic value of FDG-PET for lymph node metastasis and outcome of surgery for biliary cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 103, pp.223–229.
- Krivokapich, J. et al., 1989. ^{13}N ammonia myocardial imaging at rest and with exercise in normal volunteers. Quantification of absolute myocardial perfusion with dynamic positron emission tomography. *Circulation*, 80(5), pp.1328–1337.
- Kuhl, D. & Edwards, R., 1963. Image Separation Isotope Scanning. *Radiology*, 80, pp.653–661.
- Lawrence, E. & Livingston, M., 1932. Production of high speed light ions without the use of high voltage. *Phys Rev*, 40, pp.19–35.
- Lawrence, E.O., 1934. Method and apparatus for the acceleration of ions. , p.US patent 1948384.
- Leone, M. & Robotti, N., 2010. Frédéric Joliot, Irène Curie and the early history of the positron (1932–33). *European Journal of Physics*, 31(4), pp.975–987.
- Li, J. et al., 2011. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages. *Journal of neuroinflammation*, 8, p.15.
- Libby, P. & Theroux, P., 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, pp.3481–3488.
- Lockwood, a H. et al., 1979. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *The Journal of clinical investigation*, 63(3), pp.449–60.
- Miller, P.W. et al., 2008. Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N radiolabels for positron emission tomography. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(47), pp.8998–9033.
- Millipore, Bubble Point Test. Available at: http://www.millipore.org/membrane/flx0/testing_bubble_point [Accessed October 9, 2014].

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- Mulholland, G.K., Kilbourn, M.R. & Moskwa, J.J., 1990. Direct simultaneous production of $[^{15}\text{O}]\text{water}$ and $[^{13}\text{N}]\text{ammonia}$ or $[^{18}\text{F}]\text{fluoride ion}$ by 26 MeV proton irradiation of a double chamber water target. *Appl. Radiat. Isot.*, 41, pp.1193–1199.
- Musil, A. & Theis, M., 1955. Die direkte komplexometrische Bestimmung. , 276, pp.427–430.
- Namdar, M. et al., 2005. Integrated PET/CT for the assessment of coronary artery disease: a feasibility study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46, pp.930–935.
- Nguyen, K.L. et al., 2004. Determination of soluble aluminium concentration in alkaline humic water using atomic absorption spectrophotometry. *Water Research*, 38, pp.4039–4044.
- Nordberg, A., 2004. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 3, pp.519–527.
- Pastore, P. et al., 1989. Journal of Chromatography, 415 (1989) 331-341. *Journal of Chromatography*, 475, pp.331–341.
- Peng, S. et al., 2013. Dopamine PET imaging and parkinson disease. *PET Clinics*, 8, pp.469–485.
- Perez-Andujar, A. & Pibida, L., 2004. Performance of CdTe, HPGe and NaI(Tl) detectors for radioactivity measurements. *Applied Radiation and Isotopes*, 60, pp.41–47.
- Phelps, M.E., 2000. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), pp.9226–33.
- Phelps, M.E., Hoffman, E.J. & Raybaud, C., 1977. Factors which affect cerebral uptake and retention of $^{13}\text{NH}_3$. *Stroke*, 8(6), pp.694–702.
- Qaim, S.M. et al, 1993. Pet Radionuclide Production. In *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Methodological Aspects*. p. 1.42.
- Rabinovici, G.D. et al., 2007. $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, 68, pp.1205–1212.
- Reske, S.N. et al., 2006. Imaging prostate cancer with $^{11}\text{C}\text{-choline}$ PET/CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47, pp.1249–1254.
- Saha, G.B., 2010. Quality Control of radiopharmaceuticals. In *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Springer, pp. 1–409.
- Saha, G.B., 2004. Synthesis of PET radiopharmaceuticals. In *Basics of PET Imaging Physics, Chemistry, and Regulations*. New York: Springer, pp. 111–124.
- Schindler, T.H. et al., 2010. Cardiac PET imaging for the detection and monitoring of coronary artery disease and microvascular health. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 3, pp.623–640.
- Schoepf, U.J. et al., 2004. CT of coronary artery disease. *Radiology*, 232, pp.18–37.
- Schwaiger, M., Ziegler, S.I. & Nekolla, S.G., 2010. PET/CT challenge for the non-invasive diagnosis of coronary artery disease. *Eur J Radiol*, 73, pp.494–503.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- Sigma-Aldrich, Chromeazurool S. Available at: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure7/181/mfcd00001615.eps/_jcr_content/renditions/medium.png [Accessed October 9, 2014].
- Sobczyk, D.P. et al., 2002. Production of chemically pure gaseous $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ pulses for PEP studies using a modified DeVarda reduction. *Applied Radiation and Isotopes*, 57, pp.201–207.
- Steiner, M.A., 2002. PET-The History Behind the Technology. *Senior Thesis Projects (1993-2002)*, pp.1–30.
- Suzuki, K. & Tamate, K., 1984. Automatic production of $^{13}\text{N}\text{NH}_3$ and L-(N- 13) glutamate ready for intravenous injection. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 35, pp.771–777.
- Suzuki, K. & Tamate, K., 1984. Synthesis of ^{13}N -labelled amines by reduction of ^{13}N -labelled amides. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 35, p.771.
- Syed, R. et al., 2005. Impact of combined $(^{18}\text{F})\text{-FDG}$ PET/CT in head and neck tumours. *British journal of cancer*, 92(6), pp.1046–50.
- Van Tosh, A. et al., 2010. Prognosis of a normal positron emission tomography ^{82}Rb myocardial perfusion imaging study in women with no history of coronary disease. *Cardiology*, 117, pp.301–306.
- Varrone, A. et al., 2009. EANM procedure guidelines for PET brain imaging using $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, version 2. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 36(12), pp.2103–10.
- Verstraeten, S. V., Aimo, L. & Oteiza, P.I., 2008. Aluminium and lead: Molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology*, 82, pp.789–802.
- Virgolini, I. et al., 2010. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with ^{68}Ga -DOTA- conjugated peptides: ^{68}Ga -DOTA-TOC, ^{68}Ga -DOTA-NOC, ^{68}Ga -DOTA-TATE. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37, pp.2004–2010.
- Wagner, H.N., 1998. A brief history of positron emission tomography (PET). *Seminars in nuclear medicine*, 28(3), pp.213–20.
- Walsh, W., Fill, H. & Harper, P., 1977. Nitrogen-13-labeled ammonia for myocardial imaging. *Semin Nucl Med.*, 7, pp.59–66.
- Watabe, H. et al., 2005. Parametric imaging of myocardial blood flow with ^{15}O -water and PET using the basis function method. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46, pp.1219–1224.
- Weber, G., 1977. Enzymology of cancer cells (Part 2). *N. Engl. J. Med.*, 296, pp.541–551.
- WHO, 2010. Good manufacturing practices for pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 4, Geneva (WHO Technical Report Series no 957). , 44.
- WHO, 2012. Leading causes of death in Europe: fact sheet. , 2012. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/185215/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet.pdf.

OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ PARA ESTUDOS CLÍNICOS DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

- WHO, 2007. Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. , pp.1–418.
- Wieland, B. et al., 1991. In-target production of $[^{13}\text{N}]\text{ammonia}$ via proton irradiation of dilute aqueous ethanol and acetic acid mixtures. *Appl. Radiat. Isot*, 42, pp.1095–1098.
- Ye, F.Q. et al., 2000. $\text{H}_2\text{ }^{15}\text{O}$ PET validation of steady-state arterial spin tagging cerebral blood flow measurements in humans. *Magnetic Resonance in Medicine*, 44, pp.450–456.
- Zheng, Y. et al., 2014. FDG-PET/CT imaging for tumor staging and definition of tumor volumes in radiation treatment planning in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*, 7(4), pp.1015–1020.