

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

TIAGO LEAL SCOTT HOOD

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DO RADIOFÁRMACO COLINA
(11C) PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT: SÍNTESE E CONTROLE DE QUALIDADE**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DO
RADIOFÁRMACO COLINA (11C) PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT:
SÍNTESE E CONTROLE DE QUALIDADE**

TIAGO LEAL SCOTT HOOD
ENGENHEIRO QUÍMICO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA
E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre
Março, 2019



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DO
RADIOFÁRMACO COLINA (11C) PARA UTILIZAÇÃO EM PET/CT:
SÍNTESE E CONTROLE DE QUALIDADE**

TIAGO LEAL SCOTT HOOD
ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

CO-ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. CRISTINA M. MORIGUCHI JECKEL

Dissertação de mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre
Março, 2019

Ficha Catalográfica

S426d Scott Hood, Tiago Leal

Desenvolvimento do protocolo de produção do radiofármaco Colina (11C) para utilização em PET/CT : Síntese e Controle de Qualidade / Tiago Leal Scott Hood . – 2019.

67 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel.

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

1. Colina (11C). 2. Radiofármacos. 3. Carbono 11. 4. Câncer de Próstata. 5. PET/CT. I. Cassel, Eduardo. II. Jeckel, Cristina Maria Moriguchi. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**Desenvolvimento do Protocolo de Produção do
Radiofármaco 11 C-Colina para Utilização em PET/CT:
Síntese e Controle de Qualidade**

CANDIDATO: TIAGO LEAL SCOTT HOOD

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

DRA. CRISTINA MARIA MORIGUCHI JECKEL - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DR. PABLO MACHADO - PUCRS

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 505 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@puccrs.br
www.pucrs.br/politecnica

“Sonhos determinam o que
você quer. Ação determina o
que você conquista”.

(Aldo Novak)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wilson e Sueli.

Aos meus irmãos, Francisco e Christina.

A Menezes.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, pelo apoio e sabedoria transmitida ao longo das disciplinas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cassel, pelo incentivo, confiança e orientação ao longo deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Cristina M. Moriguchi Jeckel pelo auxílio e sabedoria transmitida, não apenas durante a co-orientação, mas em todo o período em que trabalhamos juntos.

À toda equipe do Inscer, em especial, aos colegas Josiane, Louise, Frederico e João.

Ao, não apenas colega, mas grande amigo e afilhado Marcos Alba pela excepcional colaboração neste trabalho e conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de pós-graduação e amigos que me acompanharam ao longo desta caminhada.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	7
AGRADECIMENTOS	8
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos	20
2.1.1. Do desenvolvimento da síntese	20
2.1.2. Dos métodos analíticos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. Câncer de Próstata	22
3.2. Medicina Nuclear	24
3.3. PET (Tomografia por Emissão de Pósitron)	24
3.4. Colina (11C) e a marcação no PET/CT	29
3.5. Produção de Radiofármacos com Carbono-11	30
3.6. Método de Síntese do Colina (11C)	32
3.7. Controle de Qualidade de Radiofármacos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Produção do Radiofármaco	35
4.1.1. Adaptação do Módulo Sintetizador	37
4.1.2. Metilação e Purificação	39
4.2. Controle de Qualidade da Colina (11C)	40
4.2.1. Identidade e Pureza Radionuclídica	40
4.2.2. Pureza Radioquímica	41

4.2.3. Pureza Química	41
4.2.4. Solventes Residuais	42
4.2.5. pH	42
4.2.6. Esterilidade.....	43
4.2.7. Integridade de Membrana Filtrante	43
4.2.8. Teor de Endotoxinas	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1. Adaptação e Programação do Módulo de Síntese	45
5.2. Produção do 11 C-CH ₃ I	49
5.3. Reação de Metilação e Purificação da Colina (11C).....	52
5.4. Controle de Qualidade	53
6. CONCLUSÕES	61
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Princípio de formação da imagem PET.	28
Figura 3.2. Equipamento PET.	28
Figura 4.1. Fluxograma global da produção da 11 C-Colina.....	35
Figura 4.2. Esquema do TracerLab FXC-Pro Padrão	38
Figura 4.3. Esquema do TracerLab FXC-Pro Adaptado	39
Figura 5.1. Esquema Gráfico do TracerLab FXC-Pro Adaptado.....	46
Figura 5.2. Programação para etapa da Fase Gasosa.	48
Figura 5.3. Programação para etapa da Fase Líquida.....	49
Figura 5.4. Espectro de Raio Gama da 11 C-Colina referente ao lote 10.....	55
Figura 5.5. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº1.	56
Figura 5.6. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº2.	57
Figura 5.7. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº3.	57
Figura 5.8. Cromatograma do padrão de colina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).....	58
Figura 5.9. Cromatograma de colina com salina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).....	59
Figura 5.10. Cromatograma da solução salina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).....	59
Figura 5.11. Cromatograma do padrão de colina (Detector de Condutividade + Coluna C18).....	59
Figura 5.12. Cromatograma da colina (Detector de Condutividade + Coluna C18). .	60
Figura 5.13. Cromatograma da colina (Detector Radioativo + Coluna C18).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Instalações autorizadas a produzir radioisótopos no Brasil.	25
Tabela 3.2 Principais radiofármacos para imagens de câncer de próstata.....	26
Tabela 5.1 Condições de produção do $^{11}\text{CH}_3\text{I}$	50
Tabela 5.2 Resultados de rendimento radioquímico das reações de produção da Colina (^{11}C).	53
Tabela 5.3 Resultados dos ensaios de CQ do produto Colina (^{11}C).	54

LISTA DE SÍMBOLOS

Δt	Intervalo de tempo	min
UE	Unidades Endotoxinas	unid
^{11}C	Radioisótopo de Carbono, com 6 prótons e 5 nêutrons	
DMAE	N, N-Dimetilaminoetanol	
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons	
USP	United States Pharmacopea	
<i>trap</i>	Colunas de retenção	

RESUMO

SCOTT HOOD, TIAGO. *Desenvolvimento do protocolo de produção do radiofármaco Colina (11C) para utilização em PET/CT: Síntese e Controle de Qualidade*. Porto Alegre. 2019. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A medicina nuclear é a especialidade médica que faz uso de substâncias radiotraçadoras para a geração de imagens funcionais. Este tipo de imagem possibilita a visualização, quantificação ou mesmo caracterização *in vivo* de processos bioquímicos, metabólicos, biomarcadores e receptores, que podem mostrar alterações patológicas de forma não-invasiva. Dentre as modalidades de imagem funcional disponíveis está a Tomografia por Emissão de Pósitrons/Tomografia Computadorizada (PET/CT), exame que utiliza substâncias radiotraçadoras, tais como a Colina (11C), no estudo de doenças específicas. Este radiotraçador é utilizado, principalmente, para detectar a reincidência de câncer de próstata. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento do processo de síntese do radiofármaco Colina (11C). Para a produção foi utilizado um módulo sintetizador *GE HealthCare*, modelo TRACERLab FXC-Pro, alimentado por radioisótopos de carbono-11. Estes radioisótopos foram produzidos em um ciclotron *GE HealthCare*, modelo PETtrace, através da reação nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. A síntese foi realizada através da metilação do precursor N,N-dimetilaminoetanol (DMAE) em uma coluna C18 CM-Pak. Na eluição e formulação do produto foram realizadas com 0,7 mL de etanol e 6,3 mL de solução salina 0,9 % (estéril e livre de pirogênicos). A esterilização foi realizada através de filtração em membrana de poro de 0,22 μm . O produto acabado foi submetido às análises de identidade e pureza radionuclídica, pureza radioquímica, solventes residuais, pH, esterilidade, integridade da membrana filtrante e teor de endotoxinas bacterianas. O processo desenvolvido se mostrou adequado para produção do radiofármaco Colina (11C). O módulo foi facilmente adaptado e a reação de metilação do DMAE mostrou-se reprodutível com rendimento radioquímico não-corrigido de $32,35 \pm 5\%$ ($n=2$) para conversão de $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ em Colina (11C). As metodologias de controle de qualidade foram definidas e os lotes produzidos foram testados. O teor de solvente residual de etanol ficou menor que 10% e menos que 20 $\mu\text{g/mL}$ de DMAE para todos os lotes produzidos. A análise de pureza radioquímica mostrou-se um dos maiores desafios do desenvolvimento. A similaridade química da Colina (11C) e da salina, também presente no produto, dificultam a separação dos picos cromatográficos. O pH médio

encontrado foi de $5\pm 0,27$ (n=16) e a identidade radionuclídica permitiu identificar o radioisótopo carbono-11 com tempo de meia-vida médio de $20,41\pm 0,08$ min (n=16). Os ensaios biológicos confirmaram a esterilidade e apirogenidade da Colina (11C).

Palavras-chave: Colina (11C), radiofármacos, Carbono 11, câncer de próstata, PET/CT

ABSTRACT

SCOTT HOOD, TIAGO. *Development of production process of Choline (11C) for PET/CT: Synthesis and Quality Control*. Porto Alegre. 2019. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Nuclear medicine is a medical specialty that uses radiotracer for generation of functional images. This type of image allows the visualization, quantification or even in vivo characterization of biochemical processes, metabolic, biomarkers and receptors, that can show pathological alterations in a non-invasive way. Among the functional imaging modalities available is Positron Emission Tomography / Computed Tomography (PET / CT), which uses radiopharmaceuticals such as Choline (11C) in the study of specific diseases. This radiotracer is mainly used to detect the recurrence of prostate cancer. Therefore, this work aimed to the development of the synthesis process of Choline (11C) radiopharmaceutical. A synthesizer *GE Healthcare* module TRACERLab FXC-Pro powered by carbon-11 radioisotopes was used for production. These radioisotopes were produced in a cyclotron *GE Healthcare* model PETtrace through the nuclear reaction $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. The synthesis of Choline (11C) was carried out by methylation of the precursor N,N-Dimethylaminoethanol (DMAE) in the C18 CM-Pak. Elution and formulation of the product were performed with 0.7 mL of ethanol and 6.3 mL of 0.9% (sterile and pyrogen-free) saline solution. Sterilization was performed by membrane filtration of 0.22 μm . The finished product was subjected to the quality control assays as radionuclidic identity and purity, radiochemical purity, residual solvents, pH, sterility, filtering membrane test and bacterial endotoxins. The process developed proved adequate for the production of the Choline (11C). The modulus was easily adapted and the methylation reaction of DMAE was reproducible with uncorrected radiochemical yield of $32.35 \pm 5\%$ ($n = 2$) for conversion of $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ to Choline (11C). The quality control methodologies were defined and the batches produced were tested. The residual solvent content of ethanol was less than 10% and less than 20 $\mu\text{g/mL}$ of DMAE for all batches produced. The analysis of radiochemical purity has proved to be one of the greatest challenges of development. The chemical similarity of Choline (11C) and saline, also present in the product, make it difficult to separate the chromatographic peaks. The mean pH found was 5 ± 0.27 ($n = 16$) and the radionuclide identity allowed to identify the carbon-11 radioisotope with an average half-life of 20.41 ± 0.08 min ($n = 16$). Biological assays confirmed the sterility and

apyrogenicity of Choline (^{11}C).

Key-words: Choline (^{11}C), Radiopharmaceuticals, Carbon 11, Prostate Cancer, PET/CT

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o câncer mais comum entre os homens, excluindo o câncer de pele não-melanoma, e apresenta um crescente número de casos novos. Em valores absolutos e considerando ambos os sexos, é o segundo tipo mais comum. A taxa de incidência é maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento e é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida (Instituto Nacional do Câncer, 2014).

O padrão evolutivo do câncer de próstata e os respectivos protocolos de acompanhamento clínico, tratamento e diagnóstico são focos permanentes de pesquisa e estão em constante atualização. Dentre as modalidades de diagnóstico por imagem que permitem o estudo deste tipo de câncer, está a tomografia por emissão de pósitrons (PET). Tal técnica faz uso de substâncias radiotraçadoras, denominadas radiofármacos, para visualizar, quantificar ou mesmo caracterizar, *in vivo*, processos bioquímicos, metabólicos, biomarcadores e receptores a nível celular que caracterizam doenças, podendo avaliar o grau de funcionalidade de órgãos e tecidos ou o tratamento de doenças sem o emprego de métodos cirúrgicos ou invasivos. Os radiofármacos nada mais são que traçadores, moléculas de biodistribuição conhecida marcadas com um isótopo radioativo (radioisótopo) e que podem ser identificadas através dos tecidos durante o exame (LEITHA, 2009; WILLEGAIGNON, 2012).

Os radiofármacos, por serem administrados aos pacientes por via intravenosa, devem ser substâncias estéreis, apirogênicas e exigem um grau de qualidade rigoroso. Em razão disso, no desenvolvimento das etapas que constituem a produção de um novo radiofármaco, é indispensável contemplar os requisitos exigidos para a administração em seres humanos com segurança e eficácia. Além disso, o desenvolvimento deste tipo de tecnologia sempre exige estudo do processo, adequação e otimização (ALBA, 2016).

Este trabalho se propôs a desenvolver o processo de síntese do radiofármaco Colina (11C), destinado à marcação do câncer de próstata, e as metodologias de controle de qualidade, com base em compêndios oficiais nacionais e internacionais, que garantam o cumprimento dos requisitos para realização de uma tomografia por emissão de pósitrons (PET) dentro dos padrões de qualidade exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu no desenvolvimento do processo de síntese e controle de qualidade (CQ) do radiofármaco Colina (11C), medicamento utilizado no diagnóstico do câncer de próstata, que atenda aos padrões exigidos para um exame de tomografia por emissão de pósitrons (PET).

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Do desenvolvimento da síntese

Realizar a adaptação do módulo de síntese para produção de Colina (11C) e definir as condições de produção que atendam os rendimentos radioquímicos especificados pelo fabricante e que permitam a utilização do radiofármaco com atividade suficiente (3700 MBq) e qualidade adequada para realização de um exame PET. As condições de produção a serem definidas são:

- temperatura e tempo das reações gasosas;
- quantidade de precursor;
- tipo de coluna CM Sep Pack na reação de metilação do precursor.

2.1.2. Dos métodos analíticos

Definir os métodos de CQ do produto acabado que possam garantir que o radiofármaco Colina (11C) produzido atendeu os critérios de qualidade descritos nos compêndios oficiais e na bibliografia.

Os métodos físico-químicos a serem definidos são:

- identidade radionuclídica;
- pureza radionuclídica;

- pureza radioquímica;
- pureza química;
- solventes residuais;
- potencial hidrogeniônico (pH).

Os métodos que garantem qualidade microbiológica a serem definidos são:

- esterilidade;
- integridade da membrana filtrante;
- teor de endotoxinas bacterianas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que ajuda a produzir e armazenar fluido seminal. Está localizada na pelve, abaixo da bexiga urinária e na frente do reto. A próstata envolve parte da uretra, o ducto que carrega a urina da bexiga durante o ato de urinar e carrega o sêmen durante a ejaculação. Devido a sua localização, as doenças da próstata, como o câncer de próstata, geralmente afetam o controle urinário, ejaculação e raramente defecação (BRAUNWALD et al., 2009).

O câncer de próstata é o câncer visceral mais comum em homens, excluindo os cânceres de pele, e a segunda causa principal de mortes por câncer. O adenocarcinoma acinar é a forma predominante de acometimento da próstata. Suas células podem ter diferenciação bastante variada e crescimento lento, mas em alguns casos pode apresentar elevada agressividade. Normalmente multifocal, o tumor primário em geral se distribui periféricamente na glândula, mas a porção anteromedial, também responsável pela hiperplasia nodular benigna, pode com menor frequência ser a origem. A região central frequentemente é invadida em estados mais avançados, mas raramente é onde a doença se inicia. A neoplasia pode ainda se estender localmente além da cápsula prostática, invadindo estruturas adjacentes: vesículas seminais, bexiga, esfíncter externo e músculo elevador do assoalho pélvico (EDGE, 2010; WILLIAN, 2017).

A ocorrência de metástases pode ser regional, acometendo linfonodos na pelve menor (pélvicos, hipogástricos, obturador, ilíaco, sacral), ou distantes, envolvendo linfonodos (paraaórticos lombares, comuns ilíacos, inguinais profundos

e superficiais femorais, supracaviculares, cervicais, escalenos, retroperitoniais), estruturas ósseas e vísceras (em especial pulmões e fígado).

Tendo em vista que é uma doença de agressividade e letalidade geralmente baixa, localizada em uma região em que biópsias e tratamentos podem afetar a qualidade de vida do paciente de forma relevante, é fundamental considerar diferentes informações para, em conjunto com o paciente, definir a conduta mais adequada.

O padrão evolutivo do câncer da próstata e os respectivos protocolos de acompanhamento clínico, diagnóstico e tratamento são focos permanentes de pesquisa e estão em constante atualização (CARROLL et al., 2015; WOLF et al., 2010; VALICENTI et al., 2013; HORWICH et al., 2012; MOHLER et al., 2016; MOTTET et al., 2015).

O “padrão-ouro” no diagnóstico inicial e monitoramento do câncer da próstata é a avaliação dos níveis de Antígeno Prostático Específico (PSA), total e livre, no sangue e exame de toque retal. Para caracterização e confirmação da lesão é realizada verificação histopatológica através da biópsia guiada por ultrassom transretal. Entretanto, seu reconhecimento histopatológico é um dos maiores desafios da patologia, até mesmo para profissionais bem treinados. A maioria dos tumores apresenta padrão tecidual glandular organizado, muito semelhante ao tecido prostático saudável. Por este motivo, costuma-se dizer que os sinais de malignidade na biópsia prostática podem ser sutis, o que aumenta a chance de subdiagnóstico (BRAUNWALD et al., 2009; MOTTET et al., 2015).

O papel da imagiologia no diagnóstico do câncer de próstata está em constante evolução, fruto da crescente compreensão da heterogeneidade biológica subjacente que caracteriza a doença. As técnicas de imagem funcionais e metabólicas estão ganhando importância à medida que a ênfase se deslocou da detecção de tumores estruturais para uma estratificação de risco precisa no momento do diagnóstico e do seguimento pós-tratamento. Várias modalidades de imagem são consideradas os principais veículos para traduzir abordagens de biologia molecular para o domínio clínico no câncer de próstata (ELIAS, 2008).

3.2. Medicina Nuclear

A Medicina Nuclear é a especialidade médica que faz uso de substâncias radiotraçadoras para visualizar, quantificar ou mesmo caracterizar *in vivo* processos bioquímicos, metabólicos, biomarcadores e receptores a nível celular que caracterizam doenças, podendo avaliar o grau de funcionalidade de órgãos e tecidos ou o tratamento de doenças sem o emprego de métodos cirúrgicos ou invasivos (KHALIL, 2011; LEITHA, 2009).

Dentre as técnicas diagnósticas por imagem em Medicina Nuclear, têm-se duas modalidades de imagem funcional: o SPECT (*Single Photon Computed Tomography* – Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) e o PET (*Positron Emission Tomography* – Tomografia por Emissão de Pósitron). Em ambas as técnicas, os radiofármacos são necessários, porém, a principal diferença entre elas é o tipo de radioisótopo utilizado no traçador. No primeiro caso, utiliza-se radiação eletromagnética de espectro amplo, em geral, aquela de maior intensidade de emissão pelo radionuclídeo utilizado. No PET utiliza-se radioisótopos emissores de pósitrons, onde o pósitron se aniquila com um elétron próximo da sua região de emissão, produzindo dois fótons de aniquilação que são emitidos simultaneamente, em direções opostas e com mesma energia, uma vez que ocorre a conservação do momento neste processo. Ambas modalidades representam uma ferramenta não invasiva para avaliação e diagnóstico de doenças (KHALIL, 2011; LEITHA, 2009; CHERRY, 2012).

3.3. PET (Tomografia por Emissão de Pósitron)

As técnicas de imagiologia funcional baseadas em radioisótopos, como o PET e o SPECT, têm o potencial de capturar cadeias funcionais associadas a mecanismos e interações moleculares anormais pelos quais os cânceres se desenvolvem, algo que não é possível com as técnicas de imagem padrão (ELIAS, 2008; VALLABHAJOSULA, 2009).

Os exames de PET têm, em especial no Brasil, uma história relativamente recente e localizada, baseada fundamentalmente no marcador tumoral análogo da glicose, o radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) ou FDG (^{18}F) (nomenclatura IUPAC 2-deoxi-2-[^{18}F]fluoro-D-g1ucose). Sua produção comercial iniciou em São Paulo pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) localizado na Universidade de São Paulo (USP) há aproximadamente 15 anos, e sua utilização ficou praticamente restrita a esta região devido ao tempo de meia-vida de aproximadamente 110 min. Somente a partir de 2006 o governo federal, através da Ementa Constitucional número 49, de 8 de fevereiro de 2006, permitiu que instituições privadas produzissem e comercializassem radiofármacos de meia-vida curta (até duas horas), o que possibilitou a produção do radiofármaco e conseqüentemente, do exame, nos demais Estados do país. Além disso, viabilizou o desenvolvimento de outros radiofármacos que possuem dificuldades logísticas, como o Colina (^{11}C), que possui tempo de meia-vida de aproximadamente 20,4 min. A tabela 3.1 apresenta a distribuição e quantidade de instalações autorizadas a produzir radioisótopos por região.

Instituição	Cidade	UF
CDTN - UNIDADE DE PESQUISA E PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS (UPPR)	BELO HORIZONTE	MG
CYCLOBRAS SERVIÇOS LABORATORIAIS LTDA	CAMPINAS	SP
CYCLOPET RADIOFARMACOS LTDA	CURITIBA	PR
DELFIN FARMACOS E DERIVADOS LTDA	LAURO DE FREITAS	BA
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MED DA USP-CENTRO DE MEDICINA NUCLEAR	SAO PAULO	SP
IBF – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE FARMOQUÍMICOS S.A	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP
R2 SOLUÇÕES EM RADIOFARMACIA	PORTO ALEGRE	RS
UBEA - HOSPITAL SÃO LUCAS - INSTITUTO DO CÉREBRO	PORTO ALEGRE	RS
VILLAS BOAS RADIOFÁRMACOS BRASIL S/A	EUSEBIO	CE
VILLAS BOAS RADIOFÁRMACOS DO BRASIL S/A	BRASILIA	DF

Tabela 3.1 Instalações autorizadas a produzir radioisótopos no Brasil.

FONTE: CNEN; 2019.

As imagens por PET são baseadas na administração de fármacos com

biodistribuição conhecida, ou esperada, ligados a elementos emissores de radiação (pósitrons, neste caso). Os principais elementos radioativos (radionuclídeos) utilizados para PET são os isótopos instáveis de elementos básicos do corpo humano: flúor (^{18}F), oxigênio (^{15}O), nitrogênio (^{13}N) e carbono (^{11}C). É possível, assim, a síntese de marcadores radioativos como, por exemplo, as moléculas simples de amônia ($^{13}\text{NH}_3$), útil na avaliação do fluxo sanguíneo no miocárdio, ou água (H_2^{15}O), para estudos neurológicos. Essa característica confere à técnica uma grande versatilidade, permitindo que doenças como o câncer de próstata sejam estudadas a partir de diferentes mecanismos de interação e subsistência da doença com o corpo humano. A tabela 3.2 apresenta informações sobre os principais radionuclídeos e radiofármacos usados e pesquisados atualmente para imagens do câncer de próstata (FERNANDES, 2016).

Radiofármaco	Processo de captação/localização	Órgão crítico (dose)	Dose efetiva
^{18}F -FDG	Metabolismo da glicose	bexiga (0,130 mGy/MBq)	0.019 mSv/MBq (51)
^{18}F -Colina	Lipogênese	rins (0,097 mGy/MBq)	0.020 mSv/MBq (52)
^{11}C -Colina	Lipogênese	pâncreas (0.029 mGy/MBq)	0.004 mSv/MBq (50)
Anti- ^{18}F -FACBC	Transporte de amino ácidos	pancreas (0.102 mGy/MBq)	0.022 mSv/MBq (53)
^{18}F -NaF	Matriz óssea	bexiga (0.150 mGy/MBq)	0.017 mSv/MBq (52)
^{18}F -FDHT	Receptores adrenais/andrógenos	bexiga (0.087 mGy/MBq)	0.018 mSv/MBq (54)
^{18}F -DCFPyL	Antígeno de Membrana Específico da Próstata (PSMA)	bexiga (0.090 mGy/MBq)	0.014 mSv/MBq (55)
^{68}Ga -PSMA	Antígeno de Membrana Específico da Próstata (PSMA)	bexiga (0.164 mGy/MBq)	0.016 mSv/MBq (56)
^{68}Ga -Pentixafor	Receptores CXCR	bexiga (0,081 mGy/MBq)	0.016 mSv/MBq (57)
^{18}F -BAY86-4367	Receptor do peptídeo liberador da gastrina (bombesina)	bexiga (0,049 mGy/MBq)	0.014 mSv/MBq (58)

Tabela 3.2 Principais radiofármacos para imagens de câncer de próstata.

Fonte: FERNANDES, 2016.

Os radiofármacos utilizados no exame PET são constituídos por radioisótopos de meia-vida curta ou ultra-curta, o que significa que a sua atividade radioativa decai pela metade rapidamente. O carbono-11, por exemplo, é o radioisótopo emissor de pósitron com uma meia-vida de 20,4 min. Ou seja, sua atividade radioativa decai pela metade a cada 20,4 minutos. Por este motivo, o centro produtor do radiofármaco deve estar localizado fisicamente junto ao centro de imagem que virá a utilizá-lo. Considerando a atividade radioativa mínima para realização de exames, a distribuição destes radiofármacos (de carbono-11 e oxigênio-15, por exemplo) para lugares a certa distância se torna inviável devido ao seu rápido decaimento (KHALIL, 2011).

Os radiofármacos emissores de pósitron (ou emissores β^+) são aqueles marcados com um radioisótopo de decaimento β^+ , o qual emite de seu núcleo a partícula β^+ e um neutrino (ν). Os neutrinos praticamente não interagem com a matéria, portanto não são detectados pelo PET. No entanto, a emissão β^+ por se tratar de uma partícula de carga positiva e massa significativa, ao ser emitida perde sua energia cinética até interagir com um elétron do meio. Este processo é chamado de aniquilação e ao ocorrer, dois fótons gama de 511 keV são emitidos em sentidos opostos na mesma direção e são detectados por dois detectores atuando em conjunto na captação coincidentes dos raios, conforme mostra a Figura 3.1 (KHALIL, 2011; MILLER et al., 2008).

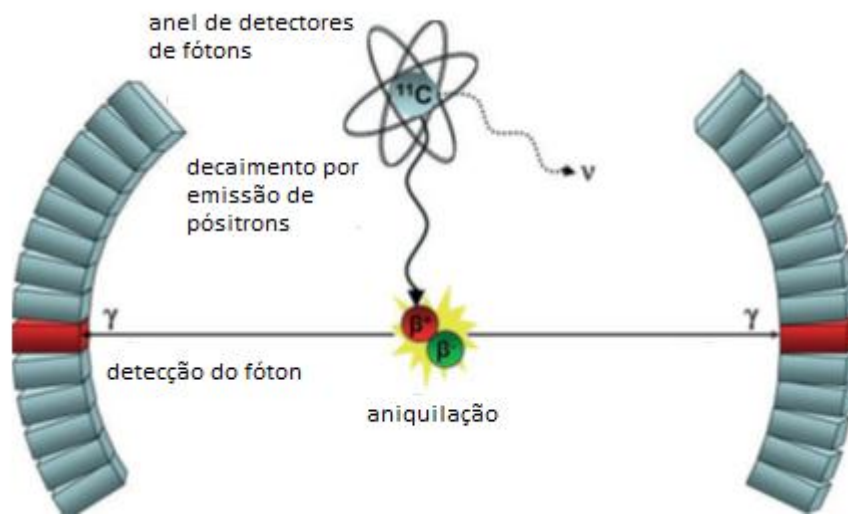


Figura 3.1 Princípio de formação da imagem PET.

Fonte: MILLER et al. (2008).

O equipamento PET consiste em uma série de detectores de cintilação dispostos em forma de anel, que circundam o paciente, em repouso na maca, após a administração do radiofármaco (Figura 3.2).



Figura 3.2. Equipamento PET.

Esta configuração é necessária devido ao processo único de emissão de pósitron, para a qual são necessários dois detectores atuando em conjunto para detectar eventos coincidentes. Com o objetivo de aperfeiçoar o exame, é possível

combinar o PET com uma tomografia computadorizada (CT) e correlacionar as informações funcionais e metabólicas fornecidas pelo PET com as informações anatômicas do CT, possibilitando que sejam realizadas correções nas imagens de PET, aumentando significativamente o poder diagnóstico do exame (MILLER et al., 2008).

3.4. Colina (11C) e a marcação no PET/CT

Um objetivo de longa data para a pesquisa de câncer tem sido identificar os mecanismos moleculares pelos quais os cânceres se desenvolvem e, em seguida, projetar as técnicas de diagnóstico para detectar os marcadores moleculares de câncer e, finalmente, desenvolver estratégias terapêuticas específicas para o tratamento.

Em 1998, um novo método para diagnóstico e estadiamento foi proposto por Hara et al.(1997) que introduziram a Colina (11C) como marcador tumoral da próstata para exames de PET. Este método baseia-se na utilização da colina, uma base de amônio quaternário, na síntese de fosfatidilcolinas e outros fosfolipídios, componentes essenciais da membrana celular. Como tumores podem apresentar um elevado aumento do metabolismo dos componentes da membrana celular, já que a multiplicação celular é intensa, ocorre uma maior absorção de colina na região tumoral (ZEISEL, 1981).

A transformação maligna de células está associada à indução da atividade de quinase, resultando em níveis aumentados de fosforilcolina. Além disso, também é conhecido que tumores de proliferação rápida contêm grandes quantidades de fosfolipídios, particularmente lecitina. A formação e o acúmulo de fosfolipídios de membrana são coordenados com o ciclo celular e ocorre durante uma fase específica da célula. As células esgotadas com colina não podem sintetizar lecitina. Assim, pressupõe-se que a captação de colina radiomarcada reflete a atividade proliferativa estimando a síntese de lipídios de membrana. As células tumorais com elevada taxa de proliferação têm uma elevada absorção de colina de modo a acompanhar as crescentes exigências para a síntese de fosfolipídios (ZEISEL, 1981).

O exame PET Colina (11C) surge como técnica promissora na complementação do diagnóstico e estadiamento de recidivas dos tumores da próstata. As imagens geradas possibilitam detectar recidiva local, no leito prostático e em linfonodos, e metástases distantes em um único exame. A revisão sistemática e metanálise publicada por Evangelista et al. (2013) contou com 19 estudos entre os anos de 2000 e 2012, dos quais 12 consideravam todos os locais de recidiva. Com um total de 1555 pacientes reportou-se, com um intervalo de confiança (IC) no nível de 95%, uma sensibilidade de 85,6% (95% IC, 82,9%-88,1%) e uma especificidade de 92,6% (95% IC, 90,1%-94,6%). Considerando apenas recidiva em linfonodos 3 estudos foram incluídos com sensibilidade de 100% (95% IC, 90,5%-100%) e uma especificidade de 81,8% (95% IC, 48,2%-97,7%). Considerando apenas recidiva na fossa prostática foram 4 estudos com sensibilidade de 75,4% (95% IC, 66,9%-82,6%) e uma especificidade de 82% (95% IC, 68,6%-91,4%) (HARA et al. 1998; DE JONG et al., 2003; KOTZERKE et al. 2000; SUTINEN et al., 2004; EVANGELISTA et al., 2013).

A revisão sistemática feita por Evangelista et al. (2013) demonstra que a utilização do PET Colina (11C) apresenta acurácia comparável aos demais métodos bem estabelecidos para recidiva dos tumores da próstata e metástases, sendo que ela está relacionada com o nível de PSA e sua cinética.

3.5. Produção de Radiofármacos com Carbono-11

Os radiofármacos são medicamentos compostos por duas partes principais. Uma conhecida como carreador ou substância de biodistribuição, onde se incorpora a segunda parte que é o elemento radioativo (radioisótopo ou radionuclídeo). Os radionuclídeos emissores de pósitron, ou emissores β^+ , normalmente são produzidos em ciclotron (acelerador de partículas) e são na sua grande maioria de tempo de meia-vida curta. Dentre eles, um dos mais utilizados é o isótopo do carbono de massa 11 (carbono-11). Isto se deve ao fato de que sua incorporação como elemento radionuclídico interfere o mínimo possível na biodistribuição do carreador e, conseqüentemente, não produz alterações representativas na

composição molecular original. O carbono-11 é produzido no ciclotron através do bombardeamento do alvo gasoso nitrogênio-14 com prótons acelerados. Esta reação nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ deve ocorrer em presença de uma quantidade reduzida de O_2 ($\leq 2\%$) e produz $^{11}\text{CO}_2$. Ao invés do O_2 , pode ser utilizado H_2 , gerando $^{11}\text{CH}_4$. Esta primeira reação do processo pode ser avaliada pela atividade específica do produto da reação, que significa a razão entre a quantidade do isótopo radioativo e a quantidade equivalente à soma de todos os isótopos. Este parâmetro é um ponto crítico em relação à eficiência de reação, devendo ser o mais próximo de um (KHALIL, 2011).

Os radiofármacos marcados com carbono-11 (enviado em forma $^{11}\text{CO}_2$ do ciclotron) são normalmente produzidos através de uma reação de metilação de um precursor a ser escolhido de acordo com a molécula desejada como carreador do radioisótopo. Esta reação utiliza $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ (metil iodeto) e suas condições tais como temperatura, tempo de reação, meio reacionais, entre outros, interferem diretamente na mesma e no seu rendimento. São dois os métodos tradicionalmente mais utilizados para obtenção do $^{11}\text{CH}_3\text{I}$. O primeiro, chamado de método úmido de produção do $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, começa com a redução do $^{11}\text{CO}_2$ (dióxido de carbono) em meio líquido à $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ (metanol), utilizando o hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4), seguido por sua conversão à $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ através da reação com ácido iodídrico (HI). O segundo, o método seco (ou método de fase gasosa) de obtenção do $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, ocorre através da redução, ainda em fase gasosa, a $^{11}\text{CH}_4$ (metano) sob aquecimento na presença de H_2 através de catálise com níquel. O $^{11}\text{CH}_4$ produzido é então convertido, ainda gasoso, a $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, também sob aquecimento na presença de I_2 . Um inconveniente do método úmido é a utilização do LiAlH_4 que normalmente proporciona maiores chances de impurezas de subprodutos e, portanto, pode resultar uma atividade específica menor se comparada com o método seco (KHALIL, 2011; SCHUBIGER et al., 2007).

Muitos radiofármacos, porém, são produzidos partindo de precursores que não apresentam bons rendimentos para a metilação, utilizando o $^{11}\text{CH}_3\text{I}$. Nestes casos é usual converter o ^{11}C -metil iodeto a ^{11}C -metiltriflato, um composto mais reativo que o anterior. Isto é feito submetendo o $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ a uma reação com triflato de prata sob aquecimento. O ^{11}C -metiltriflato pode ser produzido e utilizado

independentemente do método, úmido ou fase gasosa (KHALIL, 2011; SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE 2007). O $^{11}\text{CH}_4\text{I}$ ou ^{11}C -metiltriflato irá reagir com o precursor para marcação do radioisótopo (reação de metilação), resultando na obtenção do radiofármaco. O processo pode exigir remoção de grupamentos protetores do precursor após a substituição nucleofílica, através de hidrólise (KHALIL, 2011; SCHUBIGER; LEHMANN; FRIEBE 2007).

Para a purificação do radiofármaco obtido na síntese utilizam-se colunas recheadas contendo resina para extração de fase sólida ou em alguns casos, um sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) semi-preparativo. A etapa de purificação deve ser estudada e otimizada de acordo com cada caso específico, pois além de uma purificação que garanta padrões injetáveis para cada fim, animais ou humanos, existe um decaimento de atividade do radioisótopo proveniente do tempo, já que o processo de purificação geralmente é mais demorado que a reação propriamente dita (KHALIL, 2011; SCHUBIGER et al., 2007; VAN LIER, 2007).

3.6. Método de Síntese do Colina (11C)

Para realização da síntese do Colina (11C) diversos tipos de sintetizadores têm sido utilizados. Desde aparatos feitos artesanalmente (CHEUNG, 2009; REISCHL, 2004) como sintetizadores automatizados comercialmente disponíveis (QUINCOES et al., 2006; SHAO et al., 2011; LODI et al., 2007).

Independentemente do sintetizador utilizado, diferentes abordagens de síntese foram descritas na literatura (HARA e YUASA, 1999, PASCALI et al., 2000; REISCHL et al., 2004; QUINCOES et al., 2006; CHEUNG e HO, 2009). O método mais conhecido e utilizado faz uso de uma coluna de troca catiônica C18 Sep-Pak como suporte sólido para a reação de metilação seca do N,N-dimetilaminoetanol (DMAE) e, posteriormente, uma coluna CM Sep-Pak para purificação. No entanto, Shao et al. (2010) usando um TracerLab FXC-Pro, comercialmente disponível, observou que a pressão reversa de dois cartuchos adjacentes de Sep-Pak desacelerou significativamente as transferências de líquidos durante a síntese. Esse

aumento do tempo de síntese resultou em menores rendimentos devido à meia-vida curta do carbono-11.

Como alternativa a este problema, Hara e Yuasa (1999), Shao et al. (2010), Mishani et al. (2001) e Reischl et al., (2004) propuseram um método otimizado para produzir Colina (11C), usando apenas uma coluna CM Sep-Pak para reação e purificação. A baixa contrapressão deste sistema permite uma produção eficiente e confiável de Colina (11C), necessitando pequenas modificações no módulo de síntese (SHAO et al., 2010). Pequenas alterações no módulo de síntese permitem utilizá-lo também para outros radiotraçadores com diferentes configurações, de forma fácil e reduzindo os riscos de contaminação cruzada.

Além disso, a eliminação do C18 Sep-Pak minimiza o residual de precursor (DMAE) em doses de Colina (11C), o que é importante, pois o DMAE pode competir e inibir a incorporação de colina nas membranas celulares e reduzir a qualidade da imagem de PET (KUZNETSOVA et al., 2002). Os principais problemas no preparo do [N-metil-¹¹C]-Colina são a remoção do excesso de DMAE da mistura de reação e a determinação do precursor residual no produto formulado.

Para diminuir o excesso de precursor no produto final, buscaram-se reações de síntese com altos rendimentos que permitam utilizar menor quantidade de precursor (DMAE) ou melhorar o processo de purificação da Colina (11C). De acordo com Biasiotto et al. (2012), o alto rendimento da reação de metilação permitiu diminuir a quantidade de precursor em 2.5 µL (equivalente a 2.2 mg) em relação aos métodos publicados que usaram de 30 µL a 60 µL na abordagem de metilação de fase sólida (CHEUNG M.; Ho C., 2009; SHAO et al., 2011; LODI et al., 2007; PASCALI et al., 2000), 30 µL no método *on-loop* (REISCHL et al. 2004) e de 200 µL a 500 µL de DMAE puro no recipiente de reação a uma temperatura acima de 100°C (HARA; YUASA, 1999; MISHANI et al., 2001).

3.7. Controle de Qualidade de Radiofármacos

O CQ (controle de qualidade) é um conjunto de operações com o objetivo de verificar e assegurar que os produtos estão dentro do padrão de qualidade

desejado. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o CQ consiste em um dos pontos essenciais nas Normas de Boas Práticas Radiofarmacêuticas (BPR) para produtos farmacêuticos estéreis e se torna imprescindível, uma vez que os radionuclídeos e radiofármacos, assim como todos os outros medicamentos destinados à administração humana, devem ser submetidos a procedimentos rigorosos e rotineiros de testes de qualidade, além de próprios ensaios específicos de pureza radionuclídica e radioquímica.

Segundo a ANVISA, a Farmacopeia Brasileira é o Código Oficial Farmacêutico do País, onde se estabelecem, dentre outras coisas, os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. A ANVISA estabelece que quando da ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira para o fármaco de interesse, deve-se recorrer a outras farmacopeias ou demais compêndios oficiais ou ainda serem desenvolvidas e validadas metodologias conforme resolução específica da ANVISA. As farmacopeias Americana e Europeia fornecem os testes e os limites para a maioria dos radiofármacos. A USP determina que radiofármacos PET com meia vida maior ou igual a 20 minutos devem passar pelos seguintes testes: pH, verificação visual, identidade e pureza radionuclídica, identidade e pureza química, solventes residuais, endotoxinas e esterilidade (USP, 2012).

As análises de CQ estão divididas em duas categorias: físico-químicas e biológicas. Os testes físico-químicos indicam o nível de purezas radionuclídicas e radioquímicas, determinação do pH e estado físico da amostra. Os testes biológicos estabelecem a esterilidade e a apirogenicidade do produto acabado (JAMILLE et.al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção do Radiofármaco

A síntese do Colina (^{11}C) foi realizada no Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer-PUCRS), utilizando um módulo de síntese automatizado TRACERlab FXC-Pro, marca *GE Healthcare*, com base na metodologia proposta por Xia Shao et al. (2010). Na figura 4.1 é apresentado um fluxograma global da produção do radiofármaco Colina (^{11}C).

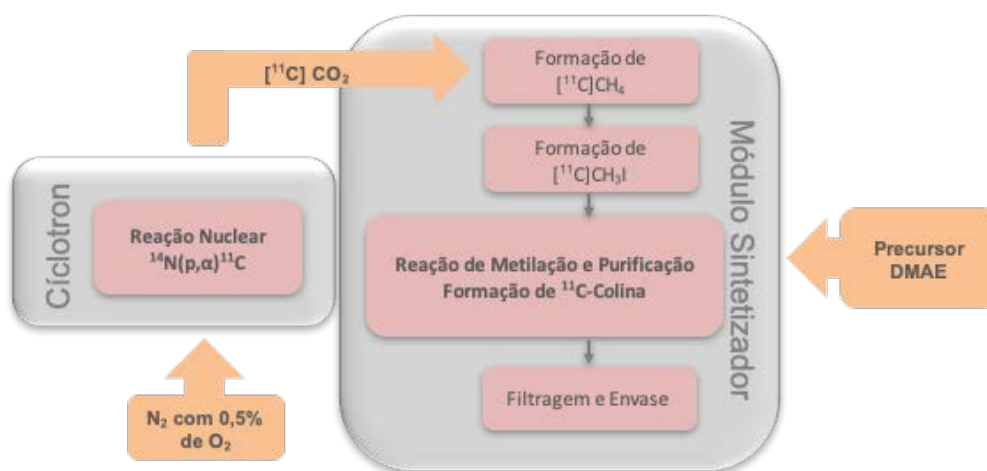
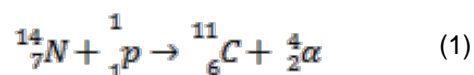


Figura 4.1. Fluxograma global da produção da Colina (^{11}C).

O radioisótopo utilizado no processo foi produzido na forma de $^{11}\text{CO}_2$ em ciclotron modelo PETtrace 16MeV (marca *GE Healthcare*), através da reação nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, com o bombardeamento de alvo gasoso contendo N_2 e 0,5% de O_2 com prótons acelerados. A reação nuclear é expressa na equação 1.



Para avaliação do rendimento radioquímico da fase gasosa, da reação de metilação e purificação do Colina (${}^{11}\text{C}$), foram realizadas irradiações de 9 min com 50 μA de corrente em um alvo gasoso com rendimento de saturação de 3460 MBq/ μA . Para estimar a atividade produzida de ${}^{11}\text{CO}_2$ utilizou-se a equação 2 onde a atividade produzida é expressa em MBq; SY (rendimento de saturação) em MBq/ μA ; A corresponde a corrente utilizada durante a irradiação, expressa em μA e; t o tempo de irradiação expresso em minutos.

$$\text{Atividade Produzida} = SY \times A \times \left(1 - 2^{-\frac{t}{20,4}}\right) \quad (2)$$

A Colina (${}^{11}\text{C}$) foi sintetizada por metilação de N,N-dimetilaminoetanol (DMAE) com iodeto de ${}^{11}\text{C}$ -metila em uma coluna CM Sep Pack, onde também ocorreu a etapa de purificação. A produção do ${}^{11}\text{C}$ -metiliodeto (${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$) foi realizada a partir do ${}^{11}\text{CO}_2$ recebido do ciclotron e adsorvido em uma coluna preenchida com peneira molecular e o catalisador de níquel (Shimalite-nickel – marca Shimadzu). Esta coluna recebeu também o gás H_2 e foi aquecida a 350°C para produção do ${}^{11}\text{CH}_4$. Na medida em que é formado, o ${}^{11}\text{CH}_4$ foi retido em outra coluna, preenchida com Carbosphere, matriz que adsorve o composto, e resfriados com nitrogênio líquido (-75°C). Após, o ${}^{11}\text{CH}_4$ -trap foi submetido a aquecimento (80°C) e o ${}^{11}\text{CH}_4$ foi liberado e transferido para o início do loop de produção do ${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$. Ali está localizado o forno contendo o reservatório de Iodo (cristais), o qual foi submetido a uma temperatura de 740°C para o recebimento do ${}^{11}\text{CH}_4$. À medida que o ${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$ foi formado no loop, este foi retido e acumulado em outra coluna, contendo Porapak Q (${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$ -trap), enquanto o ${}^{11}\text{CH}_4$ que não reagiu, recirculou, retornando para o início do loop, passando pelo forno de Iodo novamente. Ao ser liberado do ${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$ -trap (com aquecimento da coluna a 190°C e fluxo de hélio), o ${}^{11}\text{CH}_4\text{I}$ passou através de uma coluna CM Sep-Pak (marca Waters), preenchida com DMAE, onde ocorreu a reação de síntese e purificação da Colina (${}^{11}\text{C}$). A coluna CM Sep-Pak foi lavada com etanol e sequencialmente com água. O produto formado foi então eluído com

solução salina e coletado em frasco de produto. A dose final foi transferida para um frasco estéril, passando por um filtro esterilizante de 0,22 µm, e submetida ao controle de qualidade.

Os tempos de cada reação gasosa até a formação do $^{11}\text{CH}_4\text{I}$ foram avaliados quanto ao seu rendimento radioquímico e foi considerado adequado quando superior ao rendimento nominal especificado pelo fabricante do sintetizador, $30 \pm 7\%$ (GEMS, 2003). Foram testadas diferentes condições de síntese para a metilação do DMAE e foram avaliadas também quanto ao seu rendimento, adequabilidade e solventes residuais. Depois de definidas as condições com melhores rendimentos e menores teores de DMAE, a quantidade produzida no ciclotron foi recalculada, variando corrente e tempo de irradiação para se obter quantidade suficiente do radiofármaco Colina (^{11}C) para a realização de exame PET/CT em pelo menos um paciente (quantidade está estimada em pelo menos 3700 MBq do radiofármaco ao final da produção).

O rendimento da reação de metilação (equação 3) foi avaliado através da relação da quantidade do radiofármaco (medida através da atividade radioativa) obtida no momento do final do processo produtivo com a quantidade de $^{11}\text{CH}_4\text{I}$ (medida também através da atividade radioativa).

$$\text{Rendimento Radioquímico} = \frac{\text{Atividade em } ^{11}\text{C} - \text{Colina}}{\text{Atividade em } ^{11}\text{C} - [\text{CH}_4\text{I}]} \quad (3)$$

4.1.1. Adaptação do Módulo Sintetizador

Na Figura 4.2 é apresentado o esquema padrão do processo de síntese do módulo GE TracerLab FXC-Pro. Este módulo, por se tratar de um sintetizador *multitracer*, é equipado com um sistema de HPLC para purificação de alguns radiofármacos, como é o caso do PK11195 (^{11}C) e do PiB (^{11}C). Como a purificação da Colina (^{11}C) é realizada através da CM Sep-Pak (sem o sistema de HPLC), uma pequena alteração no módulo é necessária. A modificação sugerida por Xia Shao et al. (2010) consiste na realocação da válvula de três vias V30, original no

sistema de HPLC, para uma posição entre a válvula V11 e o *bulb* ou frasco de diluição de fundo redondo. Além disso, foi adicionada uma coluna Sep Pack em seguida a saída do *loop* de produção do iodeto de metila, após a V17.

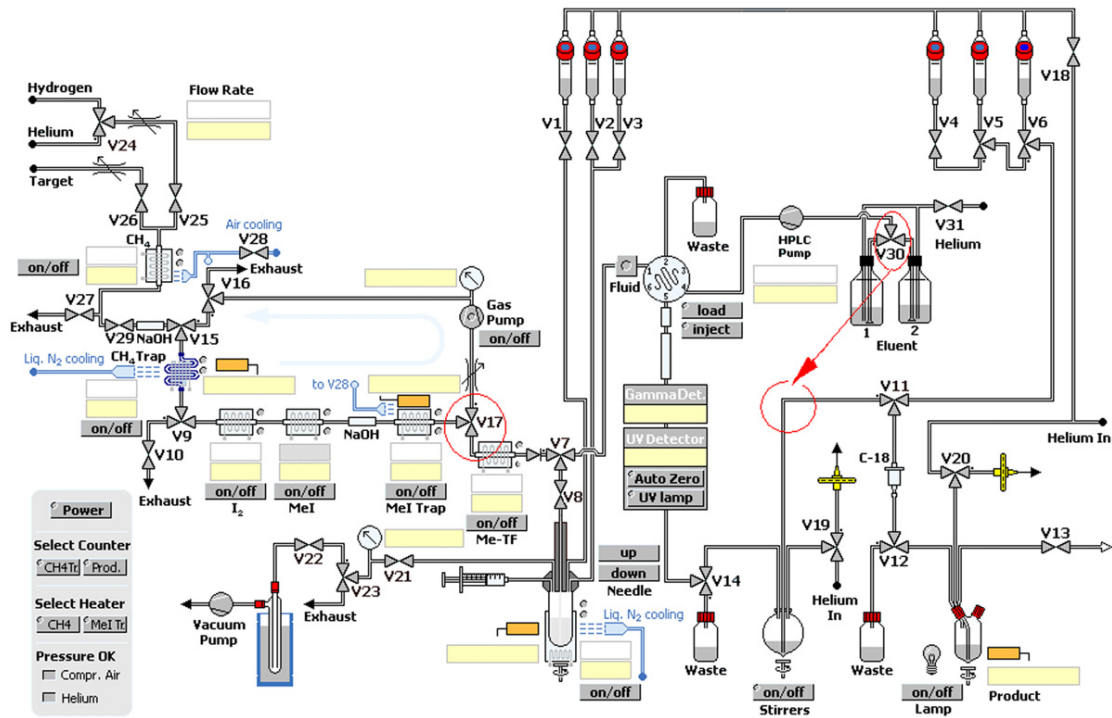


Figura 4.2. Esquema do TracerLab FXC-Pro Padrão.

Fonte: Xia Shao et al. (2010).

Na Figura 4.3 é apresentado o esquema de síntese adaptada. A válvula V30 é configurada normalmente aberta para a V17, o que permite a passagem do ^{11}C -iodeto de metila pela CM Sep-Pak através da V11 para reação. A ativação desta válvula desvia a água do frasco de diluição para o CM Sep-Pak para lavagem. A vantagem deste método é permitir que um volume maior de água de lavagem seja utilizado na tentativa de reduzir solventes residuais que possam ficar retidos na coluna junto do produto de interesse. Porém, com esta modificação, a utilização intermitente do módulo para outros radiofármacos pode ficar comprometida.

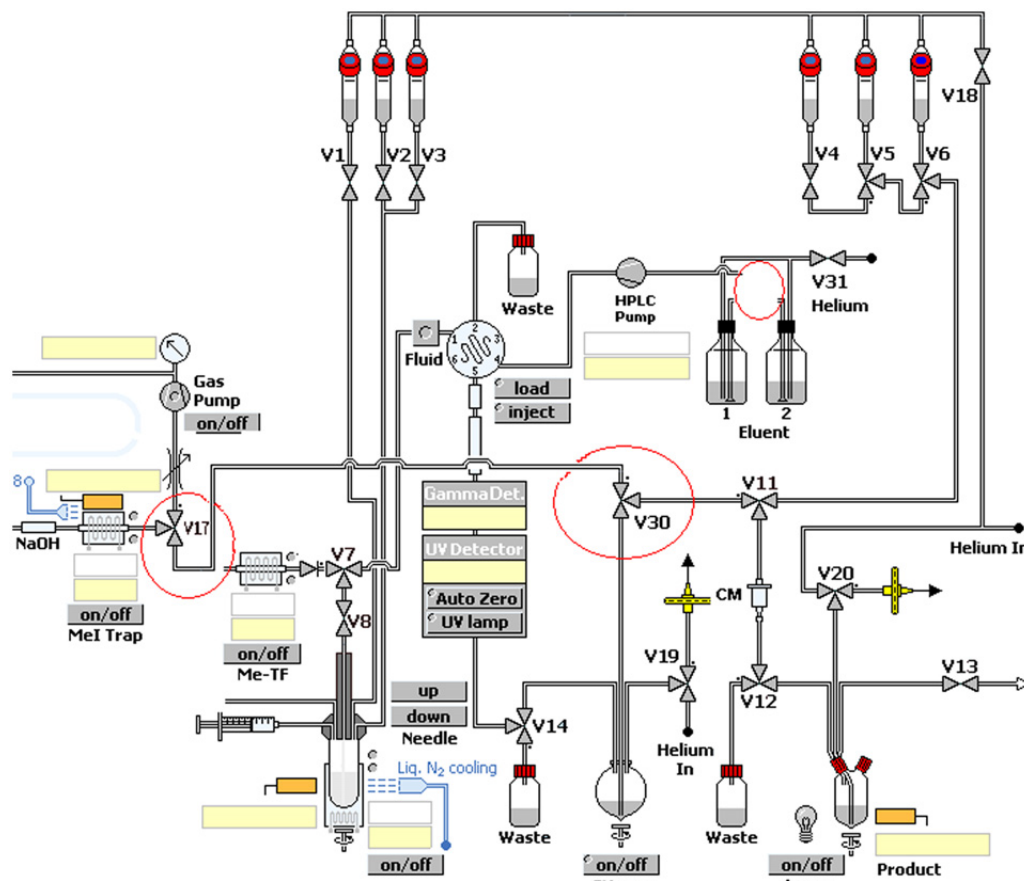


Figura 4.3. Esquema do TracerLab FXC-Pro Adaptado.

Fonte: Xia Shao et al. (2010).

Neste trabalho optou-se por utilizar apenas o vaso 5, identificado na figura como V5, para armazenar a água de lavagem. Desta forma, um volume menor de água para lavagem (10 mL) foi utilizado, porém a adaptação do módulo foi facilitada apenas sendo necessário conectar a saída da V17 até a V11 utilizando um tubo de TFZEL. O impacto do uso de um menor volume de água de lavagem da coluna também foi avaliado através da análise de solventes residuais.

4.1.2. Metilação e Purificação

Para a reação de metilação foram testados diferentes volumes de precursor DMAE e também dois diferentes tipos de coluna CM Sep-Pack. São eles: 40 μL , 60 μL e 80 μL e colunas Plus e Light, respectivamente. Não foi utilizado uma coluna complementar C18 devido o incremento no tempo de síntese relatado por Xia Shao

et al. (2010). O tempo de reação foi de 3 min com fluxo do iodeto de metila de 15 mL/min.

4.2. Controle de Qualidade da Colina (11C)

Uma vez que não existe monografia para o radiofármaco Colina (11C) em nenhum dos compêndios oficiais, as análises, os métodos e os parâmetros utilizados foram estabelecidos com base no artigo descrito por Shao et al. (2011) e nos capítulos gerais da United States Pharmacopeia (USP) (2015) e Farmacopeia Brasileira (2010).

Os parâmetros utilizados em cada método foram avaliados e definidos no momento do estudo. A alteração ou não de algum método esteve sujeita aos resultados dos testes durante a realização de cada metodologia analítica. A seguir são apresentadas as análises realizadas para determinar a qualidade do produto acabado.

4.2.1. Identidade e Pureza Radionuclídica

Para estabelecer a pureza radionuclídica da preparação, a radioatividade e a identidade de cada radionuclídeo presente devem ser conhecidas. Esta análise foi feita com intuito de garantir que o radioisótopo presente no radiofármaco seja o radioisótopo desejado e que não haja contaminação por outros tipos de radioisótopos acima de 0,5% ou pureza acima de 99,5%.

A pureza radionuclídica foi realizada através do espectro de energia de emissão do radiofármaco obtido através do analisador multicanal MCA - Analisador de Espectroscopia Gamma, fabricante Camberra, modelo 727. No espectro obtido, a energia de emissão do produto deve ser correspondente à energia dos emissores de pósitrons, atendendo a um percentual mínimo de 95% das emissões em 511 keV e/ou 1022 keV dentre todas as energias verificadas.

A identidade radionuclídica foi determinada através da verificação do tempo de meia-vida do radioisótopo presente no radiofármaco. Para isso foi utilizado um curiômetro modelo CRC25 PET, fabricante Capintec, e a atividade radioativa de determinada quantidade do produto foi medida em dois momentos. Através do decaimento em Δt a meia-vida foi inferida. O critério de aceitação para o Carbono-11 é de 18,4 a 22,4 min.

4.2.2. Pureza Radioquímica

A determinação da pureza radioquímica do fármaco requer a separação das substâncias químicas diferentes contendo o radionuclídeo e a estimativa da porcentagem da radioatividade associada à substância química declarada. A pureza radioquímica do Colina (11C) foi analisada através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de radiação acoplada (*in serie*), modelo Prominence, fabricante Shimadzu. O cromatograma obtido através do detector UV/Vis é utilizado para identificação dos picos radioativos do cromatograma obtido com o detector de radiação, principalmente o pico referente ao Colina (11C). A área relativa do pico radioativo referente ao Colina (11C) foi utilizada para inferir o grau (%) de pureza radioquímica.

Como ponto de partida, o método foi testado utilizando uma coluna Zorbax 300 SCX Analytical 4,6x150 mm 5 μ m com fase móvel 100% ácido fosfórico 0,01 M, polaridade negativa e fluxo de 1 mL/min. Além da coluna mencionada anteriormente, o método também foi testado fazendo uso de uma coluna Pursuit 10 μ m C18 300x3,9 mm com fase móvel 100% tampão fosfato 50 mM, polaridade negativa e fluxo de 1 mL/min.

O critério de aceitação de pureza radioquímica da Colina (11C) deve atender ao percentual mínimo de 95%.

4.2.3. Pureza Química

A pureza química foi definida como a fração do material na forma química desejada independentemente de ser radioativa ou não. As impurezas químicas originam-se de reagentes impuros ou que tenham sofrido decomposição. Esta análise foi realizada junto com a análise da pureza radioquímica (mesmo método e

mesma corrida), porém, no cromatograma, foi analisada a área relativa dos picos de UV/Vis. Não devem estar presentes na amostra mais que 0,2% de cada impureza e nem mais de 0,9% do total de impurezas.

4.2.4. Solventes Residuais

Os solventes residuais testados foram etanol e DMAE, utilizados na formulação do fármaco. A análise foi realizada por cromatografia Bruker 430-GC, equipado com detector FID e coluna BrukerFourFactorCapillary VF-200 ms, 30 m x 0,32 mm.

Como condição inicial para a análise de solventes residuais, testou-se o injetor a 150°C, detector a 200°C, temperatura do forno de 145°C até 5 min e uma taxa de 40°C por min até 180°C (tempo de análise de 6,88 min) e volume de injeção de 0,5 µL. Para avaliar o método considerou-se a separação adequada dos picos de cada solvente, resolução dos picos e tempo de corrida. Em virtude disso, partindo da condição inicial, alguns ajustes no perfil de temperatura do forno foram adicionalmente testados como temperatura do forno de 100°C até 2 min e uma taxa de 100°C por min até 200°C (tempo de análise de 5,2 min).

Os limites para solventes residuais devem ser menores a 10% de etanol e menos que 20 µg/mL de DMAE.

4.2.5. pH

O pH foi medido através de fitas reagentes. Duas fitas foram utilizadas, uma na faixa de medição de 5-10 e outra na faixa de 4-7.

O uso de fitas como alternativa para uso de um pHmetro tradicional se deu em virtude do volume necessário para realização do ensaio. Como trata-se de uma amostra radioativa, menores quantidades de amostra são preferíveis em função da exposição ocupacional do analista. Outra alternativa para a realização da análise seria a utilização de um pHmetro com microsonda, porém tal aparato não estava disponível durante a execução deste trabalho.

O valor de pH deve estar entre 4,5 e 8,0.

4.2.6. Esterilidade

A esterilidade do produto foi avaliada conforme método descrito no Capítulo Geral da USP (2015). Foi inoculado diretamente o produto, Colina (11C), em meio de cultura líquido e incubado por 14 dias, conforme segue:

- Caldo Tioglicolato com indicador resazurina: 30 – 35°C;
- Caldo Caseína-Soja (TSB): 20 – 25°C;

O meio de cultura com inóculo não deve apresentar turvação passados 14 dias de incubação para que se considere o produto estéril.

4.2.7. Integridade de Membrana Filtrante

A integridade da membrana filtrante, utilizada na esterilização final da Colina (11C), foi verificada através do teste de ponto de bolha, constante no Capítulo Geral da USP (2015). Consiste em inferir uma pressão sobre a membrana filtrante ainda úmida até que seja possível deslocar o líquido dos poros da mesma. Como a membrana é instalada dentro de um suporte plástico e uma agulha é utilizada na extremidade de saída do líquido, este deslocamento é verificado através da formação de bolhas na saída do aparato. Isso é possível uma vez que o teste é realizado com a agulha imersa em água. A pressão necessária para deslocar o líquido dos poros deve ser maior ou igual à especificada pelo fabricante da membrana, ≥ 50 psi, garantindo que os poros estejam íntegros ao final da produção e envase.

A integridade dos poros ao final do envase garantem que durante o processo de filtração esterilizante não houve rompimento do meio filtrante e todo produto, Colina (11C), foi filtrado através dos poros de $0,22 \mu\text{m}$. Este ensaio, somado ao teste de esterilidade, conferem ao produto a esterilidade.

4.2.8. Teor de Endotoxinas

O teor de endotoxinas foi verificado utilizando o método turbidimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Para realização da análise utilizou-se

o equipamento automatizado Endosafe PTS (Charles River). O teor de endotoxinas deve ser inferior a 17,5 EU/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Adaptação e Programação do Módulo de Síntese

A proposta de adaptação do sintetizador para a produção da Colina (11C) permitiu que a mesma fosse simples e prática. O fato das válvulas a serem conectadas, V17 e V11, estarem localizadas na parte frontal do equipamento contribuiu muito para que a adaptação do módulo fosse feita facilmente. O acesso a parte posterior do módulo foi dificultado, já que este fica instalado dentro de uma célula quente de chumbo com o objetivo de garantir a segurança do usuário quanto a exposição à radiação. A remoção do sintetizador de dentro da célula quente para a realização de uma adaptação implicaria desconectar dutos de alimentação do alvo, de nitrogênio líquido, entre outros, gerando potenciais pontos de vazamentos a cada adaptação.

Na figura 5.1 é apresentado o esquema gráfico do módulo utilizado neste trabalho. É possível verificar a ligação direta entre as válvulas V17 e V11, contornando e suprimindo o sistema de purificação por HPLC presente na configuração original do equipamento e ilustrada na figura 4.1.

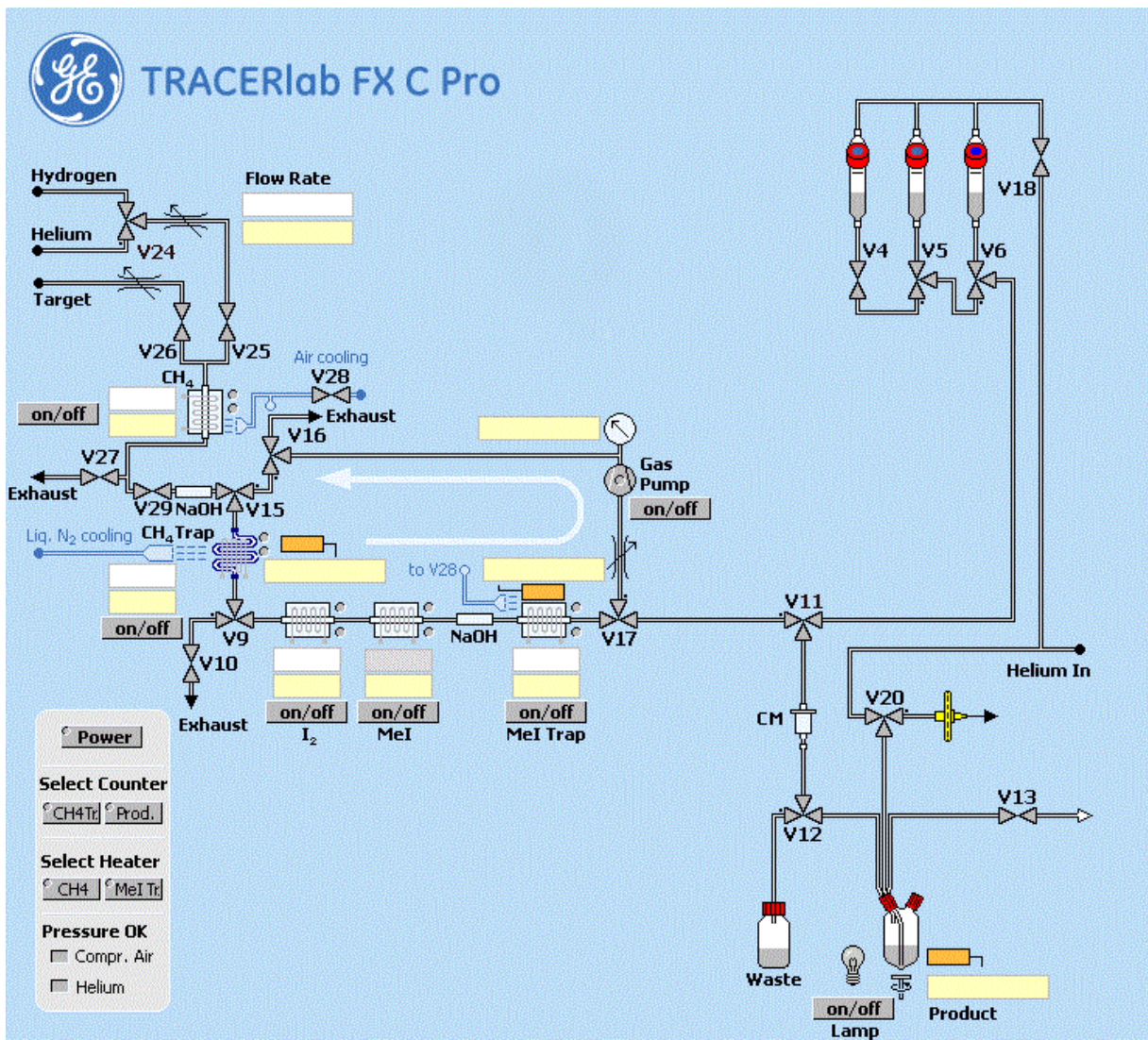


Figura 5.1. Esquema Gráfico do TracerLab FXC-Pro Adaptado.

Fonte: Adaptado de GEMS, 2003.

Todas as conexões realizadas para a adaptação do módulo foram testadas quanto a vazamentos, utilizando procedimentos indicados no protocolo do fabricante do TracerLab FXC-Pro (GEMS, 2003). A execução deste teste foi realizada utilizando um fluxo de gás hélio de 100 mL/min e colocando um conector cego na extremidade do tubo que adapta a CM Sep-Pack (identificada como CM na figura 5.1). O critério de aceitação indicado pelo fabricante (GEMS, 2003) é de que o fluxo de hélio deve iniciar a diminuir gradualmente e quando estabilizar não pode ser superior a 2 mL/min. A adaptação realizada no módulo garantiu vazamentos inferiores a 1 mL/min, atendendo o critério de aceitação.

O sintetizador TracerLab FXC-PRO é operado via software de interface e permite que o passo a passo de cada síntese seja programado previamente. Cada programação de síntese chamada de “método” é composta por *timelists*. A construção de um método, contendo os *timelists*, é uma etapa importante no processo, pois nele estão contidas todas as ações que o equipamento deve executar. Um comando fora de contexto ou com problema compromete a produção do radiofármaco.

Com base nos dados apresentados no manual do fabricante (GEMS 2003), uma programação com dois *timelists*, que iniciam automaticamente um após o outro, foi criada. O primeiro *timelist* inclui a programação da fase gasosa (produção do iodeto de metila e reação de metilação) e o segundo inclui as etapas de purificação e formulação. Foi realizada uma primeira síntese para verificar se todas as etapas programadas estavam corretas e ajustes e correções na programação originais foram realizados. Na figura 5.2 e 5.3 estão apresentados os *timelists* do método para a produção de Colina (11C).

Time	Device	Value	Dur.	Comme
0	Set Power	= On		
0.4	Set V24	= b (up)		Fluxo de H2
0.4	Set Temp. Reg. Switch Mel	= On		
0.6	Set Flow Rate Set Point	= 50		
1	Set V25	= Open		
5	Set V28	= Open		
5.5	Set Process Control	= Show message and wait		Pronto para resfriar o CH4 Trap?
t1+4	Set Temp. Set Point CH4 Trap	= -75		
t1+5	Wait Temp. Reg. Status CH4 Trap	= Temp. OK		
t2+1	Set Process Control	= Show message and wait		Pronto para receber atividade?
t3+1	Set Temp. Set Point I2	= 100		
t3+3	Set V26	= Open		Recebendo CO2
t3+5	Set V27	= Open		
t3+3'0	Set V26	= Close		Final do Recebimento de CO2
t3+3'1	Set Flow Rate Set Point	= 120		
t3+3'20	Set V27	= Close		
t3+3'28	Set V28	= Close		
t3+3'30	Set V25	= Close		
t3+3'35	Set V24	= a (down)		Fluxo de He
t3+3'36	Set Temp. Set Point CH4	= 350		
t3+3'37	Wait Temp. Reg. Status CH4	= Temp. OK		
t4+1'0	Set V10 Exhaust	= Open		
t4+1'1	Set V15 CH4 Trap Input	= b (left)		
t4+1'3	Set V29	= Open		
t4+1'4	Set Flow Rate Set Point	= 100		
t4+1'5	Set V25	= Open		
t4+1'50	Set V09	= b (right)		
t4+1'55	Set Process Control	= Start Region		CH4
t4+1'55	Set V16 Exhaust	= b (up)		
t4+2'4	Set V16 Exhaust	= a (down)		
t4+2'5	Set Process Control	= End Region		CH4
t4+2'5	Set V15 CH4 Trap Input	= a (right)		
t4+2'6	Set Gas Pump	= On		Inicio da Recirculacao
t4+2'7	Set Temp. Set Point CH4 Trap	= 80		
t4+2'7	Set Temp. Reg. Switch CH4	= Off		
t4+2'7	Set V28	= Open		Resfriamento do Mel Trap
t4+2'8	Set V25	= Close		
t4+2'9	Set V29	= Close		
t4+2'10	Set Select Heater	= 3B on, 3A off		
t4+6'40	Set Process Control	= Start Region		MEI
t4+6'50	Set Process Control	= End Region		MEI
t4+6'50	Set V28	= Close		
t4+6'50	Set Temp. Set Point Mel Trap	= 190		Liberacao do MEI do Trap
t4+6'50	Set Temp. Reg. Switch I2	= Off		
t4+6'50	Set Temp. Reg. Switch Mel	= Off		
t4+7'20	Set Gas Pump	= Off		Recirculacao por 5min
t4+7'22	Set V15 CH4 Trap Input	= b (left)		
t4+7'23	Set V29	= Open		
t4+7'24	Set V25	= Open		
t4+7'25	Set V16 Exhaust	= b (up)		
t4+7'31	Set Flow Rate Set Point	= 15		
t4+7'32	Set V16 Exhaust	= a (down)		
t4+7'33	Set V17	= b (down)		
t4+10'33	Set Flow Rate Set Point	= 0		

Figura 5.2. Programação para etapa da Fase Gasosa para produção da Colina (11C).

Time	Device	Value	Dur.	Comme
0	Set V11	= b (right)		
0.1	Set V12	= a (left)		
0.2	Set V18	= Open		
0.3	Set Select Counter	= 3B on, 3A off		
0.4	Set V06 Vial 6	= b (up)		
15	Set Process Control	= Show message and wait		Vial 6 ficou vazio?
t1+0.1	Set V06 Vial 6	= a (down)		
t1+0.2	Set V05 Vial 5	= b (up)		
t1+15	Set Process Control	= Show message and wait		Vial 5 ficou vazio?
t2+0.1	Set V05 Vial 5	= a (down)		
t2+0.2	Set V12	= b (right)		
t2+0.3	Set Lamp FDG1	= On		
t2+0.4	Set Stirrer	= On		
t2+0.5	Set V04 Vial 4	= Open		
t2+15	Set Process Control	= Show message and wait		Vial 4 ficou vazio?
t3+0.1	Set V04 Vial 4	= Close		
t3+0.2	Set Stirrer	= Off		
t3+0.3	Set V12	= a (left)		
t3+0.4	Set Process Control	= Start Region		Produto
t3+10.4	Set Process Control	= End Region		Produto
t3+10.5	Set Process Control	= Show message and wait		Pronto para transferir?
t4+0.1	Set V13	= Open		
t4+0.2	Set V20	= b (left)		
t4+15	Set Process Control	= Show message and wait		Finalizada a transferencia?
t5+1	Set Process Control	= Stop Synthesis		
t5+1.5	Set Process Control	= Reset		

Figura 5.3. Programação para etapa da Fase Líquida para produção da Colina (^{11}C).

5.2. Produção do $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$

A literatura apresenta diferentes configurações para produzir $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ e diverge a respeito de quais são melhores condições de temperatura de forno, tempo de reação e fluxo de hélio e hidrogênio utilizado (KNISS; RODE; WUEST, 2008; LARSEN et al., 1997; VAN LIER, 2007; SHAO et al., 2011). As condições utilizadas neste trabalho estão resumidas na tabela 5.1.

Etapa	Condição
Recebimento de $^{11}\text{C}\text{CO}_2$ no sintetizador	3 minutos e fluxo H_2 a 50 mL/min.
Redução do $^{11}\text{C}\text{CO}_2$ em $^{11}\text{C}\text{-CH}_4$	1 minuto e temperatura de 350 °C
Recebimento do $^{11}\text{C}\text{CH}_4$ no $^{11}\text{C}\text{CH}_4\text{-trap}$	1 minuto He a 100 mL/min. Temperatura: -75 °C
Liberação do $^{11}\text{C}\text{CH}_4$ do $^{11}\text{C}\text{CH}_4\text{-trap}$ para o loop	Temperatura: 80 °C

Temperatura do forno do reator de quartzo	Temperatura: 740 °C
Temperatura do forno de iodo	Temperatura: 100 °C
Tempo de recirculação no loop	5 minutos
Liberação do [¹¹ C]CH ₃ I do [¹¹ C]CH ₃ I- trap para a Coluna CM	3 minutos He a 15 mL/min. Temperatura: 190 °C

Tabela 5.1 Condições de produção do ¹¹CH₃I.

Partindo de aproximadamente 45500 MBq foi possível produzir uma atividade média de $14.689 \pm 79,35$ MBq de ¹¹CH₃I (n=9). Considerando a atividade teórica de partida (atividade de ¹¹CO₂) utilizada nas corridas, o rendimento médio percentual foi de $32 \pm 0,06\%$, não corrigido pelo decaimento, o que condiz com o especificado pelo manual do equipamento ($30 \pm 7\%$) (GEMS, 2003) e com o que está apresentado na literatura (SHAO et. al., 2011; KNISS; RODE; WUEST, 2008). É importante considerar que o valor percentual de rendimento é calculado com base em uma estimativa para a atividade recebida (equação 1) do ciclotron, já que o TRACERlab FX-C PRO não é equipado com monitor de radiação na coluna que recebe o ¹¹CO₂.

Muitos são os fatores que atuam sobre a atividade de ¹¹CO₂ produzido no ciclotron mesmo que a atividade teórica calculada seja sempre a mesma. Dentre estes, as variações na pureza do gás irradiado, o condicionamento do alvo gasoso de nitrogênio, as perdas maiores ou menores na transferência do ¹¹CO₂ do ciclotron até o sintetizador, as variações na retenção do ¹¹CO₂ da peneira molecular e a produção de altas taxas de monóxido de carbono ¹¹CO são os que mais afetam (SAVIO, 2010; ALVES, 2012; GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012; MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995).

O tempo de 3 min configurado foi suficiente para o recebimento de todo ¹¹CO₂ oriundo do alvo do ciclotron na coluna de peneira molecular localizada após a válvula V26 (figura 5.1). O tempo foi adequado para que a pressão do alvo atingisse os valores de *baseline* e não foi excedente a ponto de proporcionar perda excessiva de atividade pelo decaimento. Em relação à pressão no sistema, o fluxo de H₂ de 50

mL/min incidido na coluna com peneira molecular, também foi adequado. Um fluxo muito elevado poderia causar contrapressão na linha de transferência, comprometendo o envio do $^{11}\text{CO}_2$ do ciclotron até o sintetizador, além de problemas na retenção do $^{11}\text{CO}_2$ na peneira molecular (MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995). Como já mencionado, não foi possível avaliar a eficiência da retenção de $^{11}\text{CO}_2$ da coluna de peneira molecular devido à ausência de detector na mesma.

Shao et al. (2011) cita a realização da redução do $^{11}\text{CO}_2$ a $^{11}\text{CH}_4$ a uma temperatura de 350°C durante 20 s enquanto Kniess, Rode e Wuest (2008) utilizaram tempos muito mais longos também em um TRACERlab FX-C PRO (de 4 a 7 min). Considerando que a reação é tempo dependente (KNISS; RODE; WUEST, 2008), neste trabalho adotou-se a mesma temperatura, porém durante 60 s, levando em consideração os níveis mais altos de atividade em relação ao encontrado na literatura (MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995; SHAO et al., 2011; GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012).

Depois de reduzido o $^{11}\text{CO}_2$ em $^{11}\text{CH}_4$, o tempo de 1 min para o recebimento do $^{11}\text{CH}_4$ a -75°C no $^{11}\text{CH}_4$ -trap (Carboxen), sob fluxo de He de 100 mL/min, foi o suficiente para garantir que toda a atividade ($^{11}\text{CH}_4$) ficasse retida no trap. Van Lier (2007) utilizou um tempo maior para esta etapa (~ 6 min), mas obteve uma menor eficiência de aprisionamento em relação à peneira molecular com o $^{11}\text{CO}_2$.

A temperatura de recebimento do $^{11}\text{CH}_4$ no trap parece ser um fator determinante para redução desta perda de atividade (VAN LIER, 2007). Apesar de outros autores utilizarem a mesma temperatura utilizada neste estudo (SHAO et al., 2011), há estudos que recomendam temperaturas menores, como por exemplo - 196°C (VAN LIER, 2007). Alba (2016) realizou um teste (n=1) com o $^{11}\text{CH}_4$ -trap a - 150°C para o recebimento do $^{11}\text{CH}_4$, porém não observou diferenças perceptíveis na atividade final obtida.

O aquecimento a 80°C do $^{11}\text{CH}_4$ -trap sob fluxo de 100 mL/min de gás hélio para liberação do $^{11}\text{CH}_4$ para reação com iodo é descrito com frequência na literatura (Gómez-Vallejo et al., 2012; ALVES, 2012; MOCK; VAVREK; MULHOLLAND, 1995, Shao et al., 2011). A configuração se mostrou adequada,

uma vez que a atividade residual observada no Geiger Muller da coluna ao final do tempo de recirculação já atingia níveis muito baixos e estáveis, isto é, não reduziam. Este fato demonstrou que o tempo de 5 min para o *loop* foi apropriado, o que foi reforçado pelo comportamento do medidor Geiger-Muller da coluna de Porapak Q ($^{11}\text{CH}_3\text{I-trap}$). Ao final do tempo, houve estabilidade no sinal do detector, ou seja, o platô de atividade foi atingido. Tempos maiores nesta etapa fariam com que a perda por decaimento superasse o ganho de atividade. Além disso, o forno de iodo a 100°C e o forno do reator de quartzo a 740°C também proporcionaram uma produção adequada de $^{11}\text{CH}_3\text{I}$. O fluxo do gás no *loop* foi controlado pela bomba própria desta etapa do sistema e foi fixo. Este fluxo não é ajustável através da programação.

A transferência do $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ da coluna para a CM Sep-Pak trata-se de um ponto crítico do processo. Variáveis, como o fluxo de hélio, são determinantes para uma boa retenção da atividade (GÓMEZ-VALLEJO et al., 2012; ALVES, 2012; GEMS 2003). Com as configurações estabelecidas ($^{11}\text{CH}_3\text{I-trap}$ a 190°C , fluxo de hélio 15 mL/min durante 3 min) obteve-se a situação desejada, isto é, uma transferência lenta o suficiente para o bom aprisionamento do material radioativo e em um tempo não excessivo a ponto de originar perdas pelo decaimento.

5.3. Reação de Metilação e Purificação da Colina (11C)

A reação de metilação do precursor DMAE para obtenção do radiofármaco Colina (11C) teve rendimentos radioquímicos variando ligeiramente em função do volume de precursor e do tipo de coluna CM Sep-Pak utilizada. Os resultados de rendimento radioquímico, corrigido pelo decaimento e com $n=2$ (tabela 5.2).

Volume DMAE (μL)	Tipo de Coluna CM	Rendimento Mel-Colina	Rendimento CO_2 -Colina
40	Light	9,91%	7%
60	Light	7,88%	5%
40	Plus	12,69%	9%

60	Plus	23,82%	10%
80	Plus	32,35%	18%

Tabela 5.2 Resultados de rendimento radioquímico das reações de produção da Colina (11C).

Dentre as combinações testadas, o maior rendimento radioquímico global corrigido obtido foi 18% utilizando uma CM Sep-Pak Plus carregada com 80 μ L de DMAE. O rendimento radioquímico global da reação foi calculado utilizando a atividade radioativa obtida no produto final, corrigida para hora do final da irradiação, e a atividade de partida, CO₂ produzido no ciclotron. A média do rendimento radioquímico não corrigido pelo decaimento foi de 10%, o que se aproxima dos resultados obtidos por Biassiotto (2012), 13,94% \pm 2,18%, porém abaixo do rendimento corrigido pelo decaimento relatado por Xia Shao (2010), 20,7%.

Era esperado que a utilização de uma quantidade maior de precursor pudesse proporcionar rendimentos radioquímicos mais altos, porém a alta concentração de DMAE residual no final do processo pode inibir a incorporação de Colina (11C) nas membranas celulares.

5.4. Controle de Qualidade

As análises de controle de qualidade foram realizadas em 16 lotes. Na tabela 5.3 estão apresentados os resultados dos ensaios de pH, identidade radionuclídica, pureza radionuclídica, teor de endotoxinas bacterianas e esterilidade.

Lote	pH	Identidade radionuclídica (min)	Pureza radionuclídica (%)	Teor de Endotoxinas Bacterianas (EU/mL)	Esterilidade
Colina-1	5,0	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-2	5,5	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-3	4,7	20,5	>99,5	<10	Estéril
Colina-4	5,0	20,6	>99,5	<10	Estéril
Colina-5	5,0	20,5	>99,5	<10	Estéril
Colina-6	5,0	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-7	4,7	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-8	4,7	20,5	>99,5	<10	Estéril
Colina-9	5,0	20,3	>99,5	<10	Estéril
Colina-10	5,0	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-11	5,5	20,5	>99,5	<10	Estéril

Colina-12	5,0	20,3	>99,5	<10	Estéril
Colina-13	4,7	20,3	>99,5	<10	Estéril
Colina-14	5,0	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-15	5,5	20,4	>99,5	<10	Estéril
Colina-16	4,7	20,4	>99,5	<10	Estéril
Especificação	4,5 – 7,3	18,4 – 22,4	>95%	<17,5 EU/mL	Estéril
Referencia	Farmacopeia Brasileira 5ª Edição	USP (2015)	USP (2015)	Farmacopeia Brasileira 5ª Edição	Farmacopeia Brasileira 5ª Edição

Tabela 5.3 Resultados dos ensaios de CQ do produto Colina (11C).

Todos radiofármacos administrados devem ter um pH com um valor próximo de 7,4 (pH do sangue), mas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição pode variar entre 4,5 e 7,3, isto devido a alta capacidade tamponante do sangue. O pH obtido no produto Colina (11C) se mostrou bastante estável com um desvio de $\pm 0,3$ e média 5,0 atendendo o critério de aceitação.

A identidade radionuclídica permitiu identificar o radioisótopo carbono-11 com tempo de meia-vida médio de $20,41 \pm 0,08$ min. Quanto à análise de pureza radionuclídica obteve-se pureza superior a 99,5%. Na figura 5.4 é apresentado o cromatograma de análise da pureza radionuclídica para o lote 10. As contagens no canal de interesse comprovam as emissões em 511 keV.

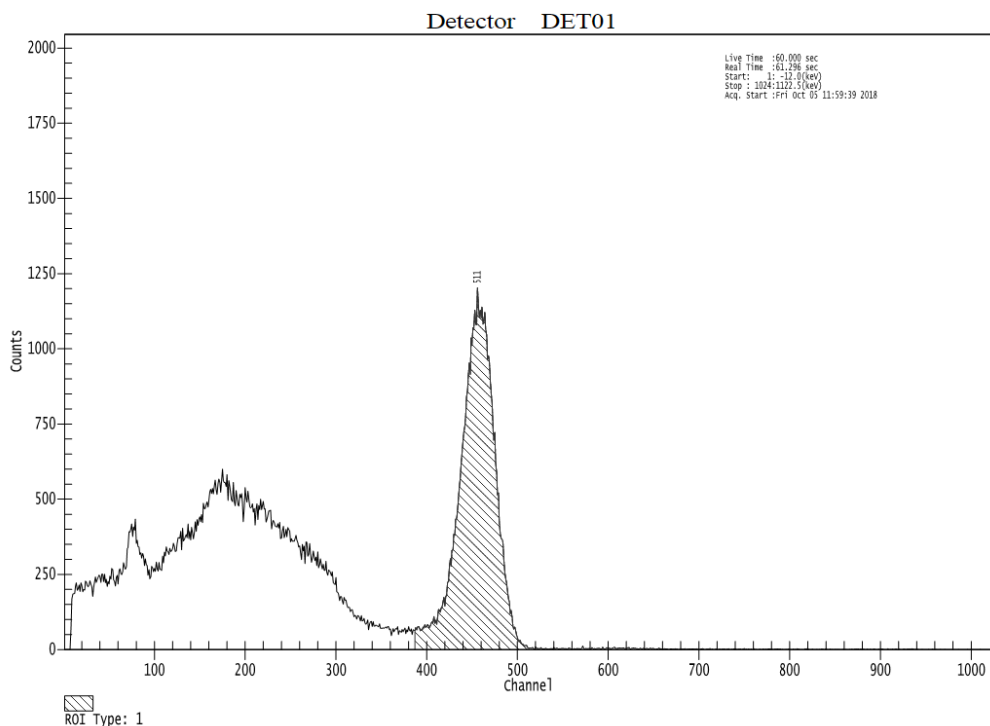


Figura 5.4. Espectro de Raio Gama da Colina (11C) referente ao lote 10.

Os ensaios de esterilidade e endotoxinas bacterianas apresentaram resultados dentro das faixas especificadas na Farmacopeia Brasileira 5^a Edição, estéril e <17,5 EU/mL respectivamente. O volume de 0,1 mL do produto Colina (11C) inoculado diretamente nos dois tubos contendo os meios de cultura não apresentou crescimento de bactérias e fungos após 14 dias de incubação. A concentração de endotoxinas bacterianas encontrada foi <10 EU/mL para todos os lotes produzidos e testados.

A análise de solventes residuais visou garantir não apenas que os limites aceitáveis de concentração de solventes não fossem ultrapassados, mas também detectar concentrações de DMAE em níveis elevados que poderiam prejudicar a qualidade da imagem do PET. Como condição inicial para a análise de solventes residuais, testou-se o injetor a 150° C, detector a 200° C, temperatura do forno de 145° C até 5 min e uma taxa de 40° C por min até 180° C (tempo de análise de 6,88 min) e volume de injeção de 0,5 µL. Foi avaliado no cromatograma resultante da análise a resolução entre os picos e o tempo de corrida. O valor deste primeiro parâmetro reflete o grau de perfeição com que dois picos foram separados, tendo em conta a contribuição da eficiência e da seletividade. Considerou-se a melhor

condição de análise picos com resoluções superiores a 1,5 e tempo de corridas menores possíveis.

Nas condições inicialmente testadas, obteve-se uma resolução superior a 4,0 entre o etanol e o DMAE. Entretanto, o pico do DMAE, nestas condições de análise, não apresentou uma boa resolução, como é possível observar na figura 5.5.

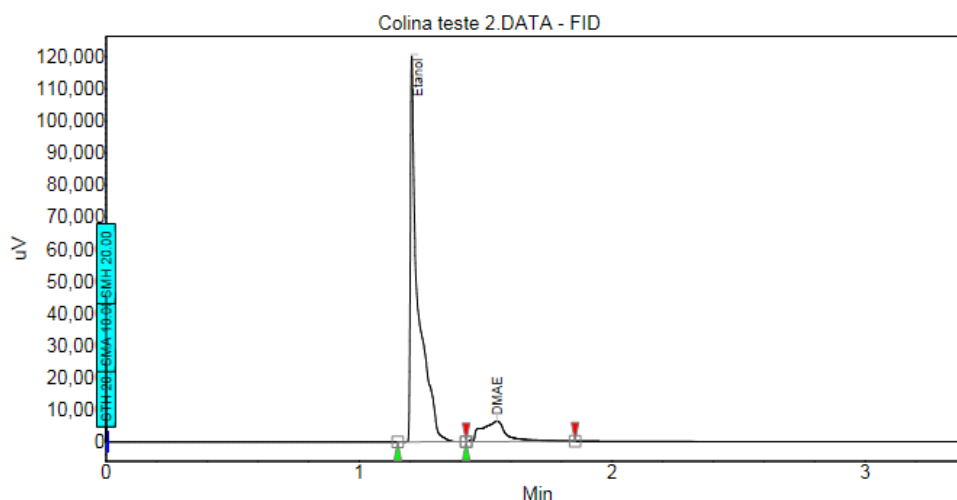


Figura 5.5. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº1.

Com o objetivo de melhorar a resolução do pico cromatográfico do DMAE, foram realizadas as seguintes alterações no método cromatográfico: injetor a 150° C, detector a 200° C, temperatura do forno de 40° C até 2,5 min e uma taxa de 100° C por min até 160° C (tempo de análise de 5,00 min) e volume de injeção de 0,5 µL. O emprego destas novas condições resultou em uma resolução superior a 50 entre o etanol e o DMAE e um pico cromatográfico com melhor resolução para o DMAE. No entanto, o último pico ficou muito próximo ao final da corrida, o que pode prejudicar a análise em virtude de possíveis picos da matriz (branco) que podem sair após o solvente de interesse (figura 5.6).

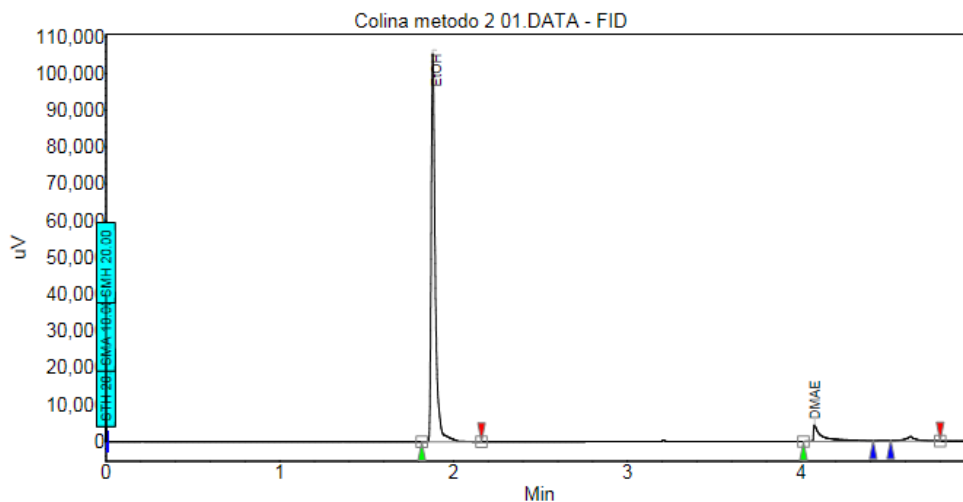


Figura 5.6. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº2.

Dessa forma, as condições otimizadas para a análise foram as seguintes: temperatura do injetor: 150°C; temperatura do detector: 200°C; temperatura do forno: 100°C por 2 min e uma rampa de 100°C por min até 200°C. Tempo de análise: 5,2 min e volume de injeção: 0,5 µL. Essas condições apresentaram uma resolução superior a 10 entre o etanol e o DMAE e tempo de retenção de aproximadamente 2,2 min para o DMAE, tempo significativamente inferior ao tempo de análise (figura 5.7).

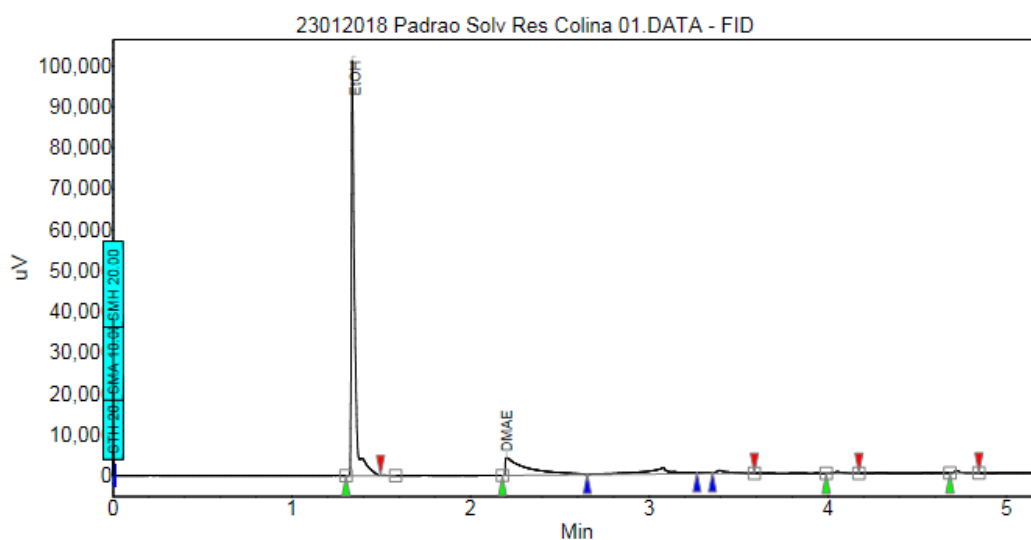


Figura 5.7. Cromatograma da Análise de Solventes Residuais – Método Cromatográfico nº3.

Os resultados obtidos com esse método mostraram-se adequados, visto que o método foi capaz de identificar os teores de solventes residuais nas amostras de Colina (11C).

A análise de pureza radioquímica quantifica o teor de colina na amostra e outras impurezas químicas. Além disso, é possível quantificar o percentual de colina radioativa na amostra, a colina marcada, e possíveis impurezas radioativas. Como a Colina (11C) não apresenta grupamentos cromóforos em sua estrutura, decidiu-se utilizar um detector amperométrico (de condutividade) acoplado em série com um detector de radiação. O cromatograma originado pelo detector de condutividade permite identificar a quantidade de colina presente na amostra, porém quando ligado em série com o detector de radiação permite saber quanto desta colina está ligada ao radioisótopo de carbono-11. Além da pureza radioquímica, esta análise permite realizar a identificação da colina presente na amostra através do tempo de retenção do pico.

Inicialmente nesta análise foi utilizada uma coluna Zorbax 300 SCX Analytical 4,6x150 mm 5 μ m com fase móvel 100% ácido fosfórico 0,01 M, polaridade negativa e fluxo de 1 mL/min. Foi injetado um padrão de colina diluído em água na concentração de 48 μ g/mL. O pico cromatográfico para o padrão foi seletivo e bem resolvido. O tempo de retenção do padrão da colina foi de 1,8 min (figura 5.8).

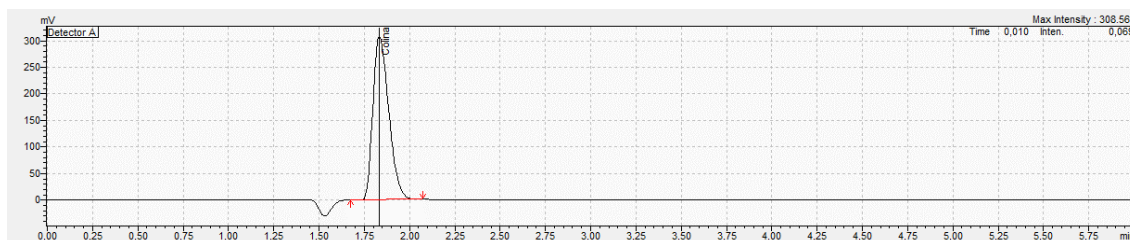


Figura 5.8. Cromatograma do padrão de colina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).

No entanto, para a amostra contendo o padrão colina + a solução salina de cloreto de sódio 0,9% (solvente do medicamento), não foi possível obter a separação dos picos. O que justifica este comportamento é que a solução salina de cloreto de sódio 0,9% tenha sido detectada no mesmo tempo de retenção do padrão de colina (figura 5.9).

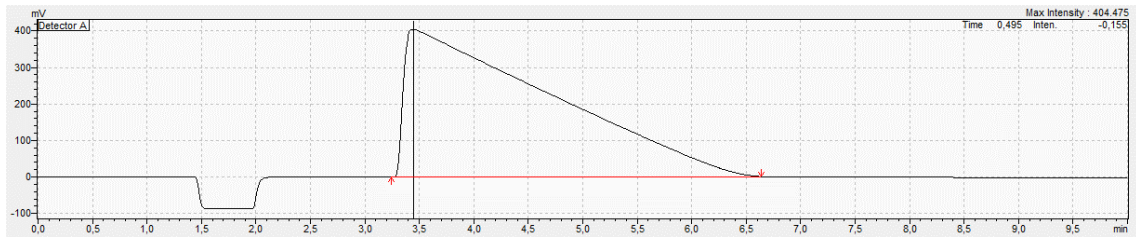


Figura 5.9. Cromatograma de colina com salina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).

Para confirmar este comportamento, foi injetado, sob mesmas condições, apenas a solução salina e evidenciou-se o mesmo tempo de retenção do ativo (figura 5.10).

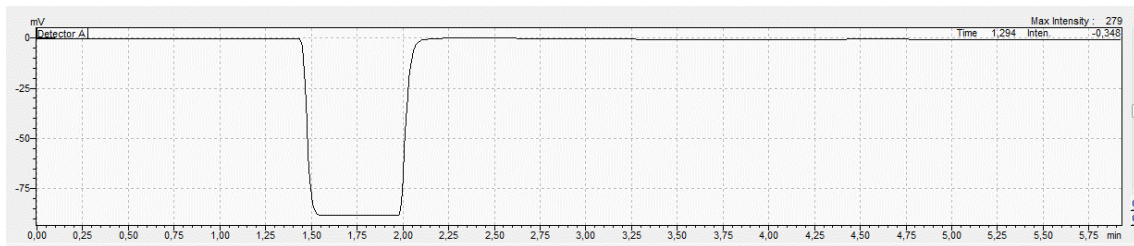


Figura 5.10. Cromatograma da solução salina (Detector de Condutividade + Coluna Zorbax).

Com objetivo de resolver o problema de separação dos picos de colina e da solução salina, foi proposto mudar de coluna cromatográfica. Foi utilizada a coluna Pursuit 10 μm C18 300 x 3,9 mm com fase móvel 100% tampão fosfato 50 mM e pH 5, polaridade negativa e fluxo de 1 mL/min. O pico cromatográfico para o padrão de colina na concentração de 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi seletivo e bem resolvido (figura 5.11). No entanto, a injeção de cloreto de sódio 0,9% apresentou mais uma vez o mesmo tempo de retenção do ativo, não sendo possível a sua separação (figura 5.12).

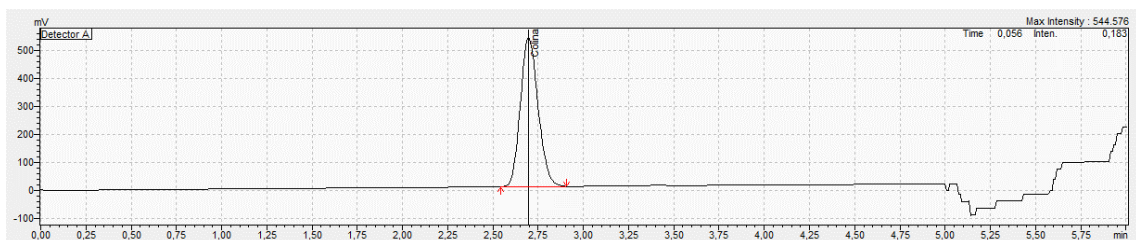


Figura 5.11. Cromatograma do padrão de colina (Detector de Condutividade + Coluna C18).

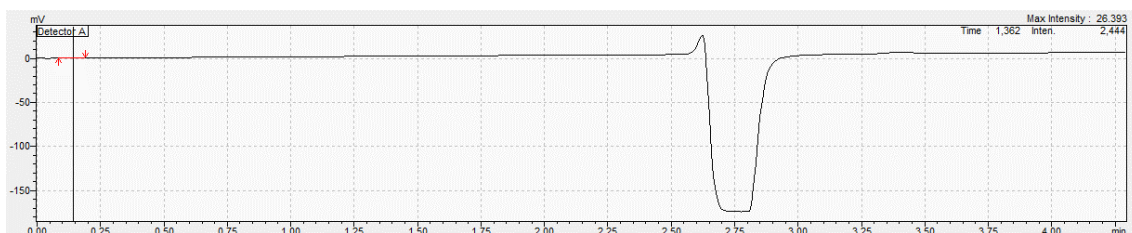


Figura 5.12. Cromatograma da colina (Detector de Condutividade + Coluna C18).

A troca da coluna cromatográfica não resolveu o problema de separação dos picos de colina e da solução salina. Testes de ajustes de fluxo, da inclusão de acetonitrila na fase móvel e ajustes de pH também foram incapazes de solucionar o problema da separação dos picos, portanto a pureza radioquímica e química não puderam ser definidas.

Ainda assim, o método pôde ser utilizado para identificar o radiofármaco Colina (11C) formado na reação. Na figura 5.13 é possível identificar através do cromatograma originado pelo detector de radiação que o tempo de retenção foi o mesmo que do padrão de colina obtido no cromatograma de condutividade apresentado na figura 5.11.

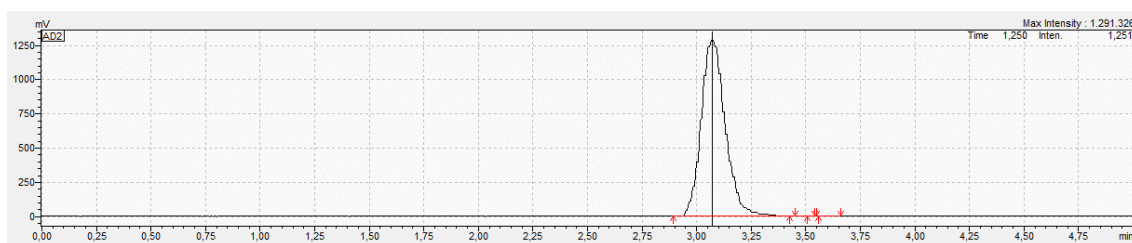


Figura 5.13. Cromatograma da colina (Detector Radioativo + Coluna C18).

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do protocolo de produção do Colina (11C), utilizando o equipamento TRACERlab FX-C PRO foi realizado e as condições de síntese empregadas permitiram um rendimento global médio corrigido de 18%. Este valor de rendimento está dentro dos parâmetros exigidos para um exame PET e foi possível ser alcançado a partir de modificações realizadas no módulo sintetizador. As adaptações realizadas para suprimir o sistema de purificação por HPLC, original do módulo, foram simples e factíveis.

Os métodos de controle de qualidade propostos para a análise do produto acabado permitiram avaliar as propriedades do Colina (11C) com exceção da pureza química e radioquímica. As análises de pH, endotoxinas bacterianas, esterilidade, identidade radionuclídica, pureza radionuclídica e integridade de membrana filtrante foram implantadas, modificadas e definidas a partir de metodologias encontradas na literatura para outros radiofármacos. A metodologia de análise de solventes residuais e da identidade e pureza radioquímicas se mostrou mais desafiadora devido à dificuldade de separação da colina e da solução salina na análise cromatográfica.

Por fim, o objetivo do projeto foi alcançado e o radiofármaco Colina (11C) pôde ser sintetizado para uso em um exame PET. Além disso, o projeto foi muito importante enquanto contribuiu na construção do conhecimento para a produção de radiofármacos marcados com carbono-11, já que foi possível compreender e aprimorar a operação do equipamento e as etapas comuns a todos os radiofármacos marcados com este radioisótopo.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os trabalhos futuros poderia ser proposta a otimização da fase gasosa de produção do iodeto de metila. Como o carbono-11 tem um tempo de meio-vida curto, os rendimentos de reação são conseqüentemente baixos, portanto melhorias nesta etapa da síntese podem proporcionar grandes ganhos de atividade no produto final.

Além das oportunas melhorias no processo de síntese do Colina (11C), no âmbito de controle de qualidade, proporia novos testes com outras colunas de HPLC para análise de pureza radioquímica e testes que permitam diminuir o limite de detecção de DMAE na análise de solventes residuais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice (2008). Viena, Austria: 19; 24; 34.

BAILAR, J.C., Mellinger G.T., Gleason D.F. Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation-preliminary report. Cancer Chemother Rep [Internet]. 1966 Mar; 50(3):129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5948715>.

BIASIOTTO, G. et al. Description of high purity and high specific activity of [11C]Choline synthesis using TRACERlab FXc module, and detailed report of quality controls. Med Chem (Shāriqah (United Arab Emirates)) [Internet]. 2012 Nov 1;8(6):1182–9. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4064&volume=8&issue=6&spage=1182>.

BRAUNWALD, E. et al. Harrison Medicina Interna. 17^o Edição. 2009. 596 – 600.

CARROL, P.R. et al. Prostate Cancer Early Detection, Version 2.2015. J Natl Compr Canc Netw [Internet]. 2015 Dec; 13(12):1534–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656522>.

CHEUNG, M., Ho C. A simple, versatile, low - cost and remotely operated apparatus for [11C]acetate, [11C]choline, [11C]methionine and [11C]PIB synthesis. Appl Radiat Isot [Internet]. 2009 Apr; 67(4):581 – 589. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168366>

CLARY, G. L., Cheu-Fen Tsai, Robert W. Guynn. Substrate specificity of choline kinase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 254, Abril 1987, 214-221

Comissão Nacional de Energia Nuclear - DIACO/CGMI/DRS. Guia de Licenciamento de Instalações Produtoras de Radioisótopos com Cíclotrons. CNEN; 2013. p. 20.

DE JONG, I et al. Visualisation of Bladder Cancer Using 11C-Choline PET: First Clinical Experience. 2002.

DE JONG, I.J. et al. Preoperative staging of pelvic lymph nodes in prostate cancer by 11C-choline PET. *J Nucl Med [Internet]*. 2003 Mar; 44(3):331–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620996>.

EDGE, Stephen B., Compton, C. Carolyn. *AJCC Cancer Staging Manual*. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2010. p. 1726.

SAVIO, Eduardo, O. García, V. Trindade, P. Buccino, J. Giglio, H. Balter, and H. Engler. Improving Production of 11C to Achieve High Specific Labelled Radiopharmaceuticals, *AIP Conference Proceedings* 1509, 185 (2012).

ELIAS, D. R., et al. In vivo imaging of cancer biomarkers using activatable molecular probes. *Cancer Biomarkers* (2008). 4: 287–305

EVANGELISTA L., et al. Choline PET or PET/CT and biochemical relapse of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Nucl Med [Internet]*. 2013 May; 38(5):305–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486334>.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Volume 1. 5ª Edição. 2010

FERNANDES, F. de Amorim, 2016. Dissertação de Mestrado. Produção e Avaliação de um radiofármaco para Reestadiamento dos Canceres da Próstata.

GANDHI R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010. 221:7–14.

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

HARA T., Kosaka N., Kishi H. PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline. *J Nucl Med* [Internet]. 1998 Jun; 39(6):990–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627331>

HARA T., Yuasa M. Automated synthesis of [11C]choline, a positron - emitting tracer for tumor imaging. *Appl Radiat Isot* [Internet]. 1999 Mar; 50(3):531 – 3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070713>.

HARA T., Kosaka N, Shinoura N, Kondo T. PET imaging of brain tumor with [methyl-11C]choline. *J Nucl Med* [Internet]. 1997 Jul;38(6):842–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18052089>.

HORWICH A. et al. Prostate cancer: ESMO consensus conference guidelines 2012. *Ann Oncol*. 2013;24(5):1141– 62.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [cited 2014 May 31]. 124 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

JAMILLE A. Lopes Tavares; Marcus Aurélio P. dos Santos; Renata F. de Lira. Avaliação do controle de qualidade de radiofármacos em serviço de medicina nuclear, 2015.

Khalil, Magdy. M. Basic Sciences of Nuclear Medicine. Berlim: Springer, 2011. 423 p.

KOTZERKE J. et al. Experience with carbon-11 choline positron emission tomography in prostate carcinoma. *Eur J Nucl Med* [Internet]. 2000 Sep;27(9):1415–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007527>.

LARSON, S.M. et al. Tumor localization of 16beta-18 F-fluoro-5alpha-dihydrotestosterone versus 18 F-FDG in patients with progressive, metastatic prostate cancer. 2004, 366–373.

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

LODI, F. et al. A simple Tracerlab module modification for automated on-column [11C]methylation and [11C]carboxylation. *Appl. Radiat. Isot.*, 2007, 65(6), 691-695

LING, E. A.; Leblond, C. P.J. *Comp. Neurol.* 1973, 149, 73-81.

ALBA, M. V. Desenvolvimento do Processo de Síntese e dos Ensaios de Controle de Qualidade do Radiofármaco [11C]-(R)-PK11195 no Centro de Produção de Radiofármacos no Instituto do Cérebro/RS para utilização em PET/CT. (2016)

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

MISHANI, E., et al. [C-11]choline-automated preparation and clinical utilization. *J. Labelled. Compd. Rad.*, 2001, 44, S379-S381

MOHLER, J.L. et al. Prostate Cancer, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2016 Jan;14(1):19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733552>

MOTTET, N. et al. Guidelines on Prostate Cancer - update 2015 [Internet]. European Association of Urology; 2015. p. 156. Available from: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Prostate-Cancer-2015-v2.pdf>

NAKAMURA, Y. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25, 945-953.

NIMMERJAHN, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. Science 308, 1314–1318 (2005).

PERRY, V. H. Brain Behav. Immun. 2004, 18, 407-413.

PASCALI, C., et al. [11C]Methylation on C18 Sep-Pak cartridge: a convenient way to produce [N-methyl-11C]choline. J. Labelled. Compd. Rad., 2000, 43(2), 195-203

QUINCOCES G. et al. Simple automated system for simultaneous production of 11C - labeled tracers by solid supported methylation. Appl Radiat Isot [Internet]. 2006 Jul;64(7):808 – 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624561>.

REISCHL G, et al. Highly efficient automated synthesis of [(11)C]choline for multi dose utilization. Appl Radiat Isot [Internet]. 2004 Jun;60(6):835 – 838. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110347>.

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

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

VALLABHAJOSULA, S. Molecular Imaging Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. 2009. 167- 176 e 215-220.

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

WILLEGAIGNON, J., et al. Princípios Básicos da Terapia com Radionuclídeos.

Medicina Nuclear: Princípios e Aplicações. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2012, Volume 1, 433-442.

WILLIAM, J. Catalona. et al. Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men, 2017.

WOLF, A.M., et al. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Prostate Cancer Update 2010. Cancer Journal, The. 2010;60(2):70–98

S. R. Cherry, J. A. Sorenson, and M. E. Phelps, Physics in Nuclear Medicine, Fourth Edi. Philadelphia, 2012, pp. 307–343.

SUTINEN, E. et al. Kinetics of [(11)C]choline uptake in prostate cancer: a PET study. Eur J Nucl Med Mol Imaging [Internet]. 2004 Mar;31(3):317–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14628097>.

VALICENTI, R.K. et al. Adjuvant and Salvage Radiation Therapy After Prostatectomy: American Society for Radiation Oncology/American Urological Association Guidelines. Int J Radiat Oncol [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;86(5):822–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301613005713>

XIA SHAO, et al. Fully automated preparation of [11C]choline and [18F]fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. Appl. Radiat. Isot., 2011, 69(2), 403-409

XIA SHAO, et al. Fully Automated Preparation of [11C] Choline and [18F] Fluoromethylcholine using Tracerlab Synthesis Modules and Facilitated Quality Control Using Analytical HPLC, 2010.

XIA SHAO, et al. Highlighting the versatility of the Tracerlab synthesis modules. Part 2: fully automated production of [11C]-labeled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FXC-Pro, 2011.

ZEIZSEL S.H. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology, *Annu
Ver Nutr* 1:95-121. 1981.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br