



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CIPROFLOXACINA - ^{99m}Tc : MARCAÇÃO DE BIODISTRIBUIÇÃO
NO DIAGNOSTICO DE INFECÇÃO

PATRICIA DE ANDRADE MARTINS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

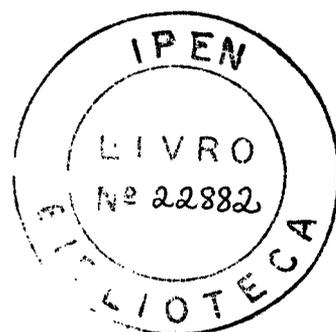
Orientadora:
Dra. Bluma Linitowski Faintucli

São Paulo
2004

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**CIPROFLOXACINA-^{99m}Tc: MARCAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO
NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO**

PATRICIA DE ANDRADE MARTINS



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear– Aplicações.

Orientadora:

Dra. Bluma Linkowski Faintuch

São Paulo
2004

Ao Criador, por tudo o que sou e pelas pessoas que tenho em minha vida.

Aos meus amados pais, por serem as melhores pessoas que conheço, pelo exemplo, por tudo o que já fizeram por mim, por tudo o que tenho, pelo apoio em todos os meus dias: meu amor, meu respeito, minha gratidão e minha admiração.

Ao meu irmão Guga, meu companheiro de vida, por estar sempre ao meu lado,
numa dupla imbatível: meu amor.

À memória de minha avózinha, Regina Célia Strasnky Martins, pelo exemplo de vida, por acreditar em mim, por suas orações, pelo apoio e estímulo: meu amor e
minha saudade.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente Dr. Cláudio Rodrigues, meu apreço.

À Dra. Constância Pagano Gonçalves, Gerente do Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade concedida, minha gratidão.

À Dra. Bluma Linkowski Faintuch, minha querida e eterna orientadora, pela orientação, estímulo, apoio, amizade, conselhos, broncas, risadas e muita paciência. Obrigada por acreditar e caminhar ao meu lado na concretização deste meu sonho. Minha eterna gratidão, meu carinho e profunda admiração.

À Dra. Nilda Petrona Sosa de Pereira, chefe da Divisão de Garantia da Qualidade, minha chefe, pela oportunidade, incentivo, amizade e paciência em todos estes anos em que trabalho no IPEN. Meus agradecimentos eternos.

À Dra. Emiko Muramoto, mestra, colaboradora, amiga. Difícil agradecer em palavras a incansável luz e participação neste trabalho. Meu carinho e admiração.

Ao Dr. João Alberto Osso Jr., mestre e amigo querido. Meu carinho e admiração.

Aos técnicos da Divisão de Garantia da Qualidade, meus companheiros de dia a dia: José Luis da Silva, Marcelo P. Ramos, Irene Vicente, Filomena Lúcia Rabelo, Cláudia Regina Pereira, Edson Vieira Alves, Antônio Carlos Gomes, Domingos de Campos, Renato Brito, Antônio Carlos Freire, Wilson Scapin dos Santos Jr., André Carlos Cabalo, Sueli Dall Evedove, Luiz Cabral do Nascimento e Laércio da Silva. Agradecimentos do fundo do coração valeu muito por tudo! Saibam que foram todos muito importantes.

À Neuza Fukumori e Margareth Mie Matsuda, que há pouco estão aqui, mas que muito me ajudaram e me apoiaram. Meu carinho e agradecimento.

Ao Jair Mengatti, chefe da Divisão de Produção de Radiofármacos, pelas facilidades oferecidas ao longo do trabalho. E estas facilidades nas pessoas de Regina Ribeiro Lima Bezerra, Reinaldo Félix de Lima, Haroldo Taurian, Luís Antônio Vilela, Geraldo Alves, Renato Bevenuto, Eli Soares: obrigada por tantos geradores de tecnécio. Minha gratidão às pessoas do grupo de Reagentes Liofilizados: Dra. Dulcila Lessa Bernardes, Claudia Elisabete Castanheira, José Alberto de Castro e Ednir Pereira. Obrigada pelo cloreto estanoso, frascos limpinhos e pela utilização do liofilizador. Obrigada a todos por nunca deixarem faltar nada para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Às minhas eternas amigas Fabiana C. Biondo e Andréa Tubor, pelo incentivo e por me ajudarem a acreditar em algo tão antigo quanto nossa amizade. Agradecendo amigos especiais, ao que mais me agüenta no CR, Francisco M. S. Reis. Espero poder ter vocês três sempre ao meu lado.

À minha amiga Vanessa Moraes, por todos os momentos de nossa amizade e pelo estímulo constante, minha gratidão e carinho.

Aos "Dancing Queens" de plantão, por todas as nossas festinha e reuniões, meu carinho.

À Donata C. Zanin, Marycel B. Figolds, Rosana Herrerias, Dra. Elaine B. de Araújo, Maria Tereza Colturato pela amizade, apoio, incentivo, contribuições e sugestões, sempre oportunas. Meus ternos agradecimentos.

Aos bolsistas Kátia Suzuki, Eliane Aldegheri, Tatiana Lavinias, Kátia Susi S. Silva e Alexandre de Oliveira, pela amizade, apoio e incentivo. Meu carinho.

À Dra. Nanci do Nascimento, chefe do Biotério do Departamento de Biologia Molecular do IPEN, pela disponibilidade de ajudar no mais variados momentos, meu apreço.

À Dra. Rosa Maria da Silva, da UNIFESP, pela colaboração neste trabalho, meu apreço.

Às Dras. Alcyone Artioli Machado e Ana Maria I. B. Ayrosa por gentilmente aceitarem fazer parte da Banca de Dissertação, meus sinceros agradecimentos.

Às minhas tias Adriana M. S. Martins, Erma S. Martins, Maria Aparecida de Andrade e Grauciria de Andrade; à memória de meus avós Conceição de Paula Vida, Jorge de Andrade e Ivo da Costa Martins, ao meu querido cachorro FLY e à todos meus demais familiares pelo apoio e pela torcida, meu carinho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – GENERALIDADES SOBRE ANTIBIÓTICOS	3
1.1.1 – Histórico	3
1.1.2 – Mecanismo de Ação dos Antibióticos	4
1.1.3 – Classificação dos Antibióticos	5
1.2 – CARACTERÍSTICAS DE UM RADIOFÁRMACO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFLAMAÇÃO/INFECÇÃO	9
1.3 - RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE INFLAMAÇÃO/ INFECÇÃO	10
1.3.1 – Radiotraçadores Não-Específicos	11
1.3.2 – Radiotraçadores de Ligação Específica	14
1.3.2.1 – Leucócitos	14
1.3.2.2 – Anticorpos Monoclonais	15
1.3.2.3 – Citoquinas	16
1.3.2.4 – Fluordeoxiglicose-Flúor-18 (FDG- ¹⁸ F)	18
1.3.2.5 – Antibióticos – Ciprofloxacina- ^{99m} Tc	19
1.4 - GENERALIDADES SOBRE O TECNÉCIO- ^{99m} m	22
1.4.1 – Histórico	22
1.4.2 – Propriedade Físicas	24
1.4.3 –Propriedades Químicas	25
1.5 – CONCEITOS EM LIOFILIZAÇÃO	27
2.OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 – MATERIAIS	31
3.2 – MÉTODOS	32
3.2.1 - Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m} Tc	32
3.2.2 - Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m} Tc	32

3.2.3 – Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc	33
3.2.4 – Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	34
3.2.5 – Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	34
3.2.6 – Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1 da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	34
3.2.7 – Estudos Biológicos	35
3.2.7.1 – Modelo Infeccioso	35
3.2.7.2 - Aquisição de Imagens Cintilográficas	36
3.2.7.3 – Biodistribuição (estudo invasivo)	36
3.2.8 – Liofilização	37
3.2.9 – Avaliação da Preparação Liofilizada	38
3.2.9.1 – Estabilidade Radioquímica	38
3.2.9.2 – Estabilidade Biológica	38
4. RESULTADOS	39
4.1 - Rendimento de Marcação das Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m}Tc	39
4.2 – Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc	39
4.3 - Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc	40
4.4 - Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	42
4.5 – Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	43
4.6 – Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1 da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	43
4.7 – Parâmetros Otimizados para Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	44
4.8 – Estudos Biológicos	45
4.8.1 e 4.8.2 – Modelo Infeccioso e Aquisição de Imagens Cintilográficas	45
4.8.3 – Biodistribuição	47
4.9 – Avaliação do Produto Liofilizado	48
4.9.1 – Estabilidade Radioquímica	49
4.9.2 – Estabilidade Biológica	50
5. DISCUSSÃO	52
5.1 - Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m}Tc e Rendimento de Marcação	52

5.2 – Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc	54
5.3 - Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc	56
5.4 - Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	58
5.5 e 5.6– Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc e Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1	59
5.7 – Estudos Biológicos	59
5.8 – Liofilização	62
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CIPROFLOXACINA-^{99m}Tc: MARCAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO

PATRICIA DE ANDRADE MARTINS

RESUMO

Realizou-se o estudo de marcação e biodistribuição do antibiótico ciprofloxacina utilizando como marcador o Tecnécio-99m. O objetivo principal foi otimização da marcação e a análise de sua eficácia no diagnóstico de sítios de infecção. Para isto, utilizaram-se animais sadios e portadores de lesão experimental de natureza bacteriana. A partir da otimização de vários parâmetros, estabeleceu-se uma formulação de reagente liofilizado contendo, por frasco, 2 mg de ciprofloxacina, 30 µg de SnCl₂ . 2H₂O e 5 mg de ácido ascórbico. Este produto era facilmente reconstituído com adição de solução de Na^{99m}TcO₄ utilizando atividade máxima de 3700 MBq e tempo de reação de 10 minutos. O produto apresentou rendimento de marcação superior a 95%, estabilidade radioquímica durante 6 horas após sua preparação e estabilidade de prateleira de 2 meses. Nos estudos de biodistribuição, mostrou elevada excreção renal, baixa captação hepática e em tecidos moles, e captação pelo foco infeccioso entre 1,7 e 2,4 superior ao tecido normal. Desta maneira, demonstrou-se o possível valor da ciprofloxacina-^{99m}Tc como radiofármaco para o diagnóstico por imagem de infecção.

CIPROFLOXACIN-^{99m}Tc: LABELING AND BIODISTRIBUTION IN INFECTION DIAGNOSTIC

PATRICIA DE ANDRADE MARTINS

ABSTRACT

Labeling and biodistribution studies with the antibiotic ciprofloxacin were done using as radiomarker Tc-99m. The aims were to optimize the labeling procedures as well as to analyze its efficacy in the diagnosis of infection sites, healthy and experimentally infected animals were employed to this purpose. On basis of optimized parameters a freeze-dried could be formulated containing 2 mg ciprofloxacin, 30 μ g SnCl₂ · 2H₂O and 5 mg ascorbic acid. This preparation could be easily activated by the addition of Na^{99m}TcO₄ with a maximum value of 3700 MBq after a reaction time of 10 minutes only. Yield of the labeling technique higher than 95%, radiochemical stability reached 6 hours after preparation, and shelf life till 2 months was demonstrated. Biodistribution investigations revealed high renal excretion, low concentration in liver and soft tissues, along with affinity for the bacterial focus 1.7-2.4 times higher than for normal tissues. This protocol demonstrated the potential of ciprofloxacin-^{99m}Tc as a diagnostic agent for infections process.

Este trabalho, incluindo as referências bibliográficas, foi padronizado de acordo com a publicação "Guia para elaboração de dissertações e teses", Igami, M. P. Z. & Zarpelon, L. M. C. IPEN/CNEN, São Paulo, 2002; preparado pela Divisão de Informação e Documentação Científicas, Biblioteca "Terezine Arantes Ferraz".

1 - INTRODUÇÃO

Em pacientes com lesões infecciosas aparentes, caracterizadas por um quadro de hipertermia e outras manifestações é de importância crítica a identificação rápida e inequívoca de sua origem. A conduta mais segura é a análise microbiana, pela cultura de fluidos e tecidos e o exame anátomopatológico. Para tanto é imprescindível identificação do local do processo. Métodos convencionais de análise anatômica como radiografia planar, ultra-sonografia e tomografia computadorizada são meios efetivos para localização da infecção, entretanto, a diferenciação inequívoca da lesão pode levar a formação de abscesso ⁽¹⁾.

Inflamação pode ser definida como uma reação localizada na microcirculação, caracterizada por transporte de leucócitos e fluido do sangue para tecidos extracelulares. No século II, Cornelius Celsus foi o primeiro a descrever as quatro características do processo inflamatório: rubor, calor, tumor e dor. O objetivo da resposta inflamatória é eliminar o estímulo patogênico, removendo o tecido danificado e regenerando o tecido original.

A inflamação é um fenômeno tecidual freqüente e pouco específico, associando-se a grande número de estados e enfermidades. Agentes agressores que podem ser físicos (calor ou frio extremo, traumas, esmagamentos), químicos (ácidos ou bases fortes e solventes orgânicos), imunológicos (alergia ao ar, comida, insetos) e endógenos (liberação a partir dos próprios tecidos corporais de enzimas, citoquinas), entram em contato com o organismo e provocando respostas locais.

Sempre que uma inflamação é deflagrada no organismo por microrganismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos e outros, o quadro é seguido de uma infecção o que simplesmente significa "invasão por microrganismos". Pode-se ter infecção sem inflamação, por exemplo, em pacientes gravemente imunossuprimidos, assim como inflamação sem infecção, desde que, a reação dos tecidos seja desencadeada em consequência da lesão (2).

Já que são vários os caminhos que podem levar a um processo inflamatório/infeccioso, o estudo feito a partir do emprego dos recursos diagnósticos em Medicina Nuclear pode ser de grande relevância para o tratamento de maior rapidez e eficácia.

Em alguns casos o diagnóstico é evidente, baseado no histórico clínico e exame físico do paciente; em outros requer maior investigação por serem os doentes assintomáticos ou sem sintomas específicos. Neste aspecto, a Medicina Nuclear procura desenvolver radiofármacos cuja peculiaridade permita discriminar diferentes classes de lesões (1).

Os produtos radiomarcados originados nessas últimas décadas mostram-se úteis para obtenção de imagens cintilográficas e no estudo de mudanças funcionais e histológicas em tecidos que permitam o diagnóstico de inflamação/infecção.

Dos vários radiofármacos pesquisados, cada um apresenta suas próprias vantagens, limitações e precisão de diagnóstico em diferentes condições patológicas.

1.1 – GENERALIDADE SOBRE ANTIBIÓTICOS

1.1.1 – Histórico

Antibióticos são substâncias químicas específicas produzidas por organismos vivos, bem como seus análogos estruturais obtidos por síntese ou semi-síntese, capazes de inibir, em concentrações baixas, processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos. São utilizados no combate as infecções.

A história dos antibióticos inicia-se indiretamente com a observação de Pasteur, em que o crescimento de uma espécie bacteriana em um meio de cultura pode ser afetado se, ao mesmo tempo crescer outra bactéria. O primeiro antibiótico a ser isolado foi a *piocianase*, extraída de *Pseudomonas aeruginosa* por Emmerich e Low (1899), que observaram que bactérias patogênicas eram habitualmente destruídas no meio onde crescia *Pseudomonas aeruginosa*. Todavia, não se seguiram desdobramentos terapêuticos.

Em 1929, Fleming isolou de um cogumelo da família *Penicilium*, um material bruto capaz de destruir colônias de *Staphylococcus aureus* ao qual denominou de penicilina. Este produto continha cerca de 10% de substância pura e foi testado em animais com infecções, apresentando excelentes efeitos. A partir de 1943, a penicilina começou a ser produzida em larga escala e deu-se início a era dos antibióticos ⁽³⁾.

Na prática médica, *antibióticos* e *quimioterápicos* são duas entidades bem distintas. O termo *antibiótico* abrange todos os antibióticos naturais, os semi-sintéticos (trabalho de síntese para modificação da estrutura de uma substância cuja forma básica é produzida por um microrganismo) e fitobióticos (substâncias

de ação antimicrobiana produzida por vegetais superiores). Já o termo *quimioterápico* é geralmente reservado para substâncias artificiais obtidas unicamente através de síntese ⁽⁴⁾.

1.1.2 – Mecanismo de Ação dos Antibióticos

O mecanismo de ação de um antibiótico é condicionado pela anatomia e fisiologia bacteriana e de seus constituintes químicos, independentemente do microrganismo ser Gram-positivo ou Gram-negativo. Desta maneira, é interessante comentar, as principais diferenças entre esses dois grupos de bactéria.

Os cocos Gram-positivos possuem uma parede celular espessa, composta de 60% de mucopolissacarídeos, recoberta por uma camada de ácido teicóico e ribonucleato de magnésio. Quanto aos bacilos Gram-negativos, a parede celular é mais delgada e a camada de mucopolissacarídeos ocupa 10% do total ⁽⁴⁾.

O modo de ação dos antibióticos pode ser focalizado de quatro maneiras descritas a seguir ⁽⁵⁾:

1. Inibidores da Síntese da Parede Celular Bacteriana – a parede celular é um envoltório de proteção que reveste a membrana celular bacteriana. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular produzem uma parede com defeitos estruturais atuando sobre o processo de replicação celular.

2. Alteração da Membrana Celular – a membrana celular contém lipídios, proteínas e enzimas importantes para o metabolismo celular. Qualquer interrupção destas funções causará danos à célula.

3. Bloqueio da Síntese Protéica – para que haja reprodução bacteriana é indispensável que ocorra de modo repetitivo, a união de aminoácidos que

constituirão as moléculas de proteínas microbianas. A interrupção, em qualquer ponto desta cadeia por bloqueio de alguma função, susta o crescimento, eliminando a célula bacteriana.

4. Inibição da Replicação Cromossômica – atuam inibindo a síntese dos ácidos nucleicos. Podem atuar no DNA parasitário, inibir a síntese do RNA, inibir o ácido tetrahidrofólico ou reduzir a formação de nucleotídeos.

1.1.3 – Classificação dos Antibióticos

Os antibióticos ativos contra infecções podem ser divididos nas seguintes classes:

PENICILINAS - São derivadas do ácido 6-aminopenicilânico, com o anel beta-lactâmico fundido em um anel tiazolidínico. Sua ação se deve a inibição de uma enzima da formação da parede celular ⁽³⁾.

CEFALOSPORINAS - Seu mecanismo de ação é análogo às penicilinas, inibindo a síntese da parede celular bacteriana. São divididas em agentes de primeira, segunda, terceira e quarta gerações em função do espectro bacteriano; ao progredir da primeira para a quarta gerações, o espectro contra Gram-negativos se amplia, ocorrendo perda da eficácia para os microrganismos Gram-positivos ⁽³⁾.

BETA-LACTÂMICOS NÃO CLÁSSICOS - São antibióticos que contêm o anel beta-lactâmico com o mesmo mecanismo de ação de inibição da síntese da parede celular bacteriana ⁽³⁾.

ANFENICÓIS - Difundem-se através da membrana celular bacteriana e se unem de forma reversível à uma subunidade dos ribossomos bacterianos, evitando a transferência de aminoácidos às cadeias peptídicas em formação, o

que impede a biossíntese protéica. São tóxicos não devendo ser utilizados para tratamentos triviais ⁽³⁾.

TETRACICLINAS - Inibem a síntese de proteínas, bloqueando a união do RNA de transferência ao complexo ribossômico do RNA mensageiro. Diversas espécies de bactérias são resistentes as tetraciclina ⁽³⁾.

GLICOPEPTÍDEOS - Agem inibindo a formação de cadeias lineares dos peptidoglicanos, que compõem a parede celular bacteriana ⁽³⁾.

MACROLÍDEOS - Possuem mecanismo de ação análogo aos anfenicóis; ligam-se à uma subunidade dos ribossomos bacterianos, suprimindo a síntese protéica ⁽³⁾.

AMINOGLICOSÍDEOS - São transportados através da membrana celular bacteriana, unindo-se irreversivelmente a proteínas receptoras com uma subunidade ribossômica bacteriana e interferem com o complexo de iniciação do RNA mensageiro. Com isso causam erro na leitura de DNA impossibilitando a síntese correta de proteínas. Seu uso indiscriminado resultou no surgimento de cepas resistentes ⁽³⁾.

QUINOLONAS - As quinolonas são descritas no seu modo de ação como inibidoras da DNA-girase, uma enzima essencial à atividade metabólica das bactérias. Um cromossomo bacteriano com 1000 μm de comprimento, só pode caber numa célula bacteriana de 1–2 μm de diâmetro se for extremamente compactado e enrolado. Durante a fase metabólica ativa de uma bactéria, ocorre o enrolamento e o desenrolamento de certos segmentos do cromossomo. A DNA-girase é a enzima que promove o espiralamento do DNA. Inibindo a DNA-girase, o metabolismo bacteriano é interrompido, pois as mensagens vitais não podem ser mais originadas do cromossomo bacteriano ⁽⁶⁾.

O espectro de atividade das quinolonas inclui microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, apresentando rápida atividade bactericida durante a fase de multiplicação e na fase latente das bactérias.

As quinolonas são divididas em 5 grupos: naftiridinas, cinolinas, pirodopiromidinas, pirodo-benzoxacinas e quinolonas. O grupo que apresenta maior potência antimicrobiana são as quinolonas, também denominadas 6-fluorquinolonas. Seus compostos são: norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, lomefloxacina, levofloxacina e trovafloxacina⁽⁶⁾.

As fluorquinolonas foram marcadas com ^{18}F , por troca isotópica, e com medidas feitas em um Tomógrafo por Emissão de Pósitrons (PET) para o estudo da farmacocinética em animais e humanos normais e infectados. Entre as quinolonas marcadas, a ciprofloxacina mostrou ser mais potente que as estruturas de compostos similares⁽⁷⁾. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1⁽⁶⁾, abaixo:

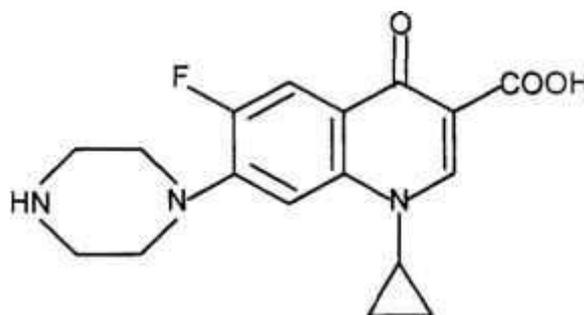


Figura 1 – Estrutura química da ciprofloxacina

A atividade da ciprofloxacina persiste durante a fase de repouso das bactérias e quando a síntese de proteína é bloqueada. Ao contrário da maioria dos outros inibidores da DNA-girase, a ciprofloxacina possui um duplo mecanismo

de ação sobre as bactérias: um que se baseia na síntese de proteína e outro tendo efeito sobre a DNA-girase.

O efeito inibidor da ciprofloxacina se dá somente nas DNA-girases bacterianas, uma vez que o sistema enzimático humano correspondente possui estrutura e funcionamento diferentes.

Infecções do trato respiratório superior e inferior, ouvido médio (otite), seios da face (sinusite), olhos, rins e trato urinário, órgãos genitais, abdômen, pele e tecidos moles, ossos e articulações são causadas por patógenos usualmente sensíveis à ciprofloxacina.

Além disso, este fármaco já foi preconizado para septicemia, infecções ou risco de infecção (profilaxia) em pacientes com defesas diminuídas e descontaminação intestinal seletiva em pacientes tratados com imunossupressores.

Os microrganismos que se seguem incluem cepas sensíveis à ciprofloxacina: *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Gardnerella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Brucella*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Chlamydia* ⁽⁶⁾.

1.2 - CARACTERÍSTICAS DE UM RADIOFÁRMACO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFLAMAÇÃO/INFECÇÃO ⁽⁸⁾

Nenhum dos radiofármacos existentes para o diagnóstico de inflamação/infecção apresenta amplo espectro na avaliação clínica e um resultado diferencial entre os dois processos.

A escolha do radiofármaco é baseada na situação clínica, na consideração dos mecanismos fisiopatológicos e da particularidade sintomática da doença. A farmacodinâmica e farmacocinética devem ser consideradas para averiguar se sua ação permitirá a identificação do processo no local de infecção/inflamação.

A dose de radiação também é um fator importante e a utilização de altas doses deve ser admitida somente quando o benefício clínico for significativo em relação ao dano da radiação.

Em resumo, o radiofármaco ideal para o diagnóstico de inflamação/infecção deve ter as seguintes características:

- Ausência de toxicidade
- Rápido diagnóstico por imagem cintilográfica
- Pronta disponibilidade
- Diagnóstico diferencial entre infecção e inflamação
- Preparação simples e rápida
- Baixo acúmulo em órgãos principais
- Rápida depuração do sangue e do organismo
- Baixa dose de radiação absorvida
- Baixo custo

1.3 - RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO/INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório desenvolve-se, de maneira geral, pela seqüência: extravasamento de fluidos, pequenas moléculas e proteínas; diapedese de células e acúmulo local de células, principalmente leucócitos ⁽⁹⁾.

Imagens cintilográficas dos locais de infecção/inflamação são possíveis de serem obtidas a partir de mecanismos não-específicos e específicos de captação.

1.3.1 – Radiotraçadores Não-Específicos

Focos infecciosos podem ser visualizados com traçadores sem a interação específica entre o agente e o componente do tecido, em um processo não-específico de localização devido ao aumento local da permeabilidade vascular, mas apresentam importantes limitações.

Primeiro, o extravasamento de macromoléculas é um processo lento e níveis altos de sangue são necessários para permitir difusão prolongada nos tecidos alvos. Entretanto, isto ocasiona alto nível de radiação basal, especialmente em tecidos perfusados.

Segundo, por terem um mecanismo similar de acúmulo em infecção/inflamação, eles não conseguem distinguir os dois processos ⁽⁹⁾.

Alguns traçadores não-específicos são descritos a seguir.

O Gálio-67 (⁶⁷Ga) foi utilizado pela primeira vez em 1969 para o diagnóstico da doença de Hodgkin e desde então, é empregado para localizar focos inflamatórios, infecciosos e inúmeras desordens do sistema ósseo.

Apesar de anos de experiência do uso deste radiofármaco, o mecanismo preciso de acúmulo nos tecidos normais e patológicos ainda não está completamente elucidado. O ^{67}Ga é aceito como um análogo do ferro e, uma vez na circulação, se liga às proteínas plasmáticas, principalmente a transferrina circulante na forma iônica. Em inflamações agudas, liga-se a lactoferrina excretada *in loco* por leucócitos ou a sideróforos, produtos de baixo peso molecular produzidos pelas bactérias.

Possui meia-vida física de 78 horas e decaimento por emissão de raios gama numa faixa de 93-880 keV, com energias predominantes nas regiões de 93, 184, 296 e 388 keV. É captado pelo fígado, osso, medula óssea, mucosa nasal e intestinal e excretado via renal e via trato gastro-intestinal.

O citrato de ^{67}Ga é caracterizado por boa sensibilidade, mas baixa especificidade, pois se acumula em tumores, lesões agudas, crônicas, sépticas e estéreis. A captação em infecções crônicas é atribuída à afinidade do complexo Lactoferrina- ^{67}Ga por macrófagos e ao tempo de residência relativamente alto do ^{67}Ga no plasma circulante.

Por possuir meia-vida física e biológica longa, o citrato de ^{67}Ga apresenta alta dose de radiação absorvida, bem como características físicas desfavoráveis para obtenção em imagens em gama-câmara, pois na sua utilização os cintilogramas são adquiridos com 24 e 48 horas da administração da droga ⁽⁸⁾.

Outros mecanismos de captação do citrato de gálio em infecções são as ligações em tecidos não-específicos resultantes da ruptura da integridade dos tecidos inflamados.

É comumente utilizado em pacientes com febre de origem desconhecida, infecções crônicas em tecidos moles e osteomielite, mostrando maior sensibilidade que leucócitos marcados, apesar de menor especificidade ⁽¹⁰⁾.

A Imunoglobulina Humana não-específica (IGH) radiomarcada é utilizada também no diagnóstico de sítios de inflamação/infecção. Seu uso é seguro, simples e como é de origem humana não produz reações alérgicas ou efeitos colaterais. Comercialmente é disponível na forma de conjunto de reativos liofilizados.

A observação do acúmulo de imunoglobulinas humanas radiomarcadas em locais de inflamação aguda foi acidental em um experimento onde foram utilizadas como controle para anticorpos monoclonais específicos.

Inicialmente, supôs-se que as IGH eram retidas em focos infecciosos devido à interação com receptores Fc- γ expressos na marginação leucocitária. Posteriormente demonstrou-se que a IGH radiomarcada acumulava-se em focos infecciosos por extravasamento não-específico devido ao aumento da permeabilidade vascular local.

Para uso clínico, as IGH são marcadas com Tecnécio-99m (^{99m}Tc) e Índio-111 (¹¹¹In), existindo, porém, diferenças significantes entre os dois radiofármacos.

Em estudo comparativo entre IGH-^{99m}Tc e IGH-¹¹¹In em modelo animal de inflamação, ambos apresentaram depuração sanguínea lenta e captação no fígado, baço e rins. Observou-se maior captação do segundo produto, devido ao acúmulo de ¹¹¹In livre no foco inflamatório, após a dissociação da IGH marcada. IGH-¹¹¹In é mais utilizada nos casos de inflamação crônica, mostra boa sensibilidade no diagnóstico de infecções pulmonares e abdominais, sendo indicada no estudo de articulações e ossos inflamados/infectados e em febres de

origem desconhecida. A IGH-^{99m}Tc é indicada para os casos de inflamação/infecção aguda do sistema músculo-esquelético.

Por apresentarem alta atividade sangüínea, não possibilitam imagens de lesões vasculares e necessitam de um tempo relativamente longo entre a administração do radiofármaco e o diagnóstico (24-48 horas) ⁽⁸⁾.

Os Nanocolóides são partículas pequenas (10-80 nm de diâmetro), produzidas através da albumina e captadas pelas células do sistema endotelial. Quando marcados com ^{99m}Tc são rapidamente depurados da circulação e excretados pelos rins e intestinos. Eles fluem nos tecidos inflamados devido ao aumento da permeabilidade vascular e acumulam-se após a fagocitose dos macrófagos.

A técnica não é cara e é de fácil execução. A captação dos nanocolóides-^{99m}Tc em lesões inflamatórias é relativamente baixa em comparação com outros radiofármacos, mas como possuem uma rápida depuração no sangue a imagem é usualmente obtida em uma hora.

São utilizados no diagnóstico de osteomielite, artrite reumatóide, nas rejeições de transplante renal e no estudo de inflamação do músculo esquelético e mostram resultados comparáveis a Leucócitos-¹¹¹In. No estudo de artrite reumatóide, apresentam um potencial diagnóstico similar aos leucócitos marcados com IGH-^{99m}Tc e HMPAO-^{99m}Tc.

Entretanto, como a maioria dos radiofármacos desta classe, não apresenta propriedades em distinguir a inflamação aguda infecciosa da estéril ⁽⁸⁾.

1.3.2 – Radiotraçadores de Ligação Específica

Mecanismos específicos de ligação a partir da migração leucocitária para o local da lesão e liberação de mediadores químicos para o combate da lesão, se tornam alternativas para a produção de radiofármacos capazes de diagnosticar de maneira mais rápida e inequívoca locais de infecção/inflamação ⁽⁹⁾.

1.3.2.1 – Leucócitos

O papel da migração de leucócitos na reação inflamatória levou ao desenvolvimento de técnicas para radiomarcagem destas células como poderoso método para localização de sítios de inflamação/infecção.

Primeiramente, coleta-se a amostra sanguínea do paciente, separa-se os leucócitos de outros componentes (eritrócitos e plaquetas), adiciona-se o radioisótopo e reinjeta-se o leucócito marcado no paciente. Embora o procedimento de marcação seja direto, o tempo de manipulação é grande e deve ser realizado sob condições estéreis ⁽¹⁰⁾.

Após a administração intravenosa, os leucócitos migram especificamente para os tecidos inflamados, por adesão ao endotélio ativado em resposta a fatores quimiotáticos liberados durante o processo inflamatório ⁽¹¹⁾.

Os leucócitos podem ser marcados com Oxima-In-111, Tropolonato-In-111 e Hexametilpropilenoaminaoxima-Tc-99m (HMPAO-^{99m}Tc).

O In-111 (¹¹¹In) em combinação com oxima ou tropolonato, após difusão nas células, dissocia-se do complexo lipofílico e liga-se de modo irreversível a componentes intracelulares e nucleares. O ¹¹¹In decai por emissão de dois fótons com energia de 173 e 247 keV e possui meia vida de 67 horas. Estas energias não são ideais para a obtenção de imagens em gama-câmaras, mas a meia vida

alta e a estabilidade *in vivo* permitem a aquisição de imagens tardias e de maior sensibilidade.

O ^{99m}Tc possui características físicas ótimas para a obtenção de imagens em gama-câmaras (140 keV, $t_{1/2}$ de 6 horas). Entretanto, o complexo HMPAO- ^{99m}Tc não apresenta estabilidade desejada de 6 horas liberando um composto lipofílico secundário que é excretado através dos rins e intestinos.

Marcados com ^{111}In , os leucócitos são preferíveis para investigação de inflamações nos rins, bexiga e vesícula biliar e quando necessária obtenção de imagens tardias como em infecção crônica ou febre de origem desconhecida.

Marcados com HMPAO- ^{99m}Tc são utilizados para o diagnóstico de infecção intestinal, lesões no fígado, baço e pulmões⁽⁸⁾.

A utilização de leucócitos marcados data de mais de 20 anos e é considerado "gold standard" para detecção de inflamação. Entretanto, a técnica de preparação é trabalhosa e demorada, necessitando de profissionais experientes, equipamentos e local específico para ser concretizada. A técnica apresenta alta precisão no diagnóstico de processos agudos, mas para os processos crônicos é mais limitada⁽¹¹⁾.

1.3.2.2 – Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais também são utilizados para a detecção de processos inflamatórios/infecciosos, podendo ser marcados com ^{123}I , ^{111}In e ^{99m}Tc .

Sua utilização apresenta várias vantagens sobre leucócitos marcados. Não há a necessidade de manipulação sanguínea, apresentam maior especificidade e afinidade em algumas condições patológicas e podem ser utilizados como

receptores de outras células, sendo possível a cintilografia de linfócitos ^(2, 8).

O anticorpo monoclonal CEA-47 liga-se ao antígeno NCA-95, expresso em granulócitos, e foi um dos primeiros anticorpos a serem marcados e estudados com ¹²³I. Por apresentar alta captação pela medula óssea e indução do efeito HAMA (Human Anti-Mouse Immunoglobulins) com reações alérgicas auto-imune, sua utilização foi substituída ⁽²⁾.

O anticorpo monoclonal BW250/183 também é específico para o antígeno NCA-95 e está disponível na forma de reagente liofilizado para pronta marcação com ^{99m}Tc. As imagens cintilográficas são obtidas 6 horas após a administração do radiofármaco. Apresenta bons resultados no diagnóstico de inflamações crônicas de fígado e infecções vasculares ^(2, 8).

O SSEA-1 é um anticorpo monoclonal que possui boa afinidade pelo antígeno CD15, expresso em neutrófilos. Estudos mostram que não há indução do efeito HAMA. Isto é um grande atrativo já que esta é a maior limitação da utilização dos anticorpos monoclonais.

Algumas limitações da aplicação clínica dos anticorpos monoclonais: alto peso molecular que pode comprometer a difusão nos locais de inflamação; depuração sanguínea lenta; metabolização hepática; excreção intestinal; longo intervalo de tempo entre a administração do radiofármaco e a aquisição da imagem cintilográfica e principalmente a indução do efeito HAMA.

A utilização de fragmentos de anticorpos mostra maior viabilidade, pois são menos imunogênicos e apresentam uma depuração sanguínea mais rápida ⁽⁸⁾.

1.3.2.3 - Citoquinas

Alguns mediadores da resposta inflamatória são substâncias químicas

endógenas, que provém da ativação de células inflamatórias por uma reação imune.

As citocinas são um tipo de mediador químico representando um extenso grupo de proteínas. As mais envolvidas nas inflamações e infecções são as interleuquinas 1, 2, 6, 8, 12 e o fator de necrose tumoral (TNF- α)⁽²⁾.

Algumas citocinas são marcadas com $^{123/125}\text{I}$ e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresentando bom potencial diagnóstico em várias condições patológicas.

A interleuquina-1 (IL-1) liga-se a receptores expressos em granulócitos, monócitos e linfócitos, com alta afinidade. Marcada com ^{123}I , foi estudada em ratos infectados com *S. aureus* apresentando boa captação no local da infecção⁽¹¹⁾. Infelizmente, quando utilizadas em seres humanos, produz efeitos colaterais (cefaléia) devendo ser administrada em doses muito baixas, o que impede seu uso clínico. Por apresentar alta captação intestinal, não é recomendável no diagnóstico de lesões abdominais.

A interleuquina-2 (IL-2) liga-se aos receptores expressos em linfócitos T. Estudos em pacientes com diabetes com uso de insulina, doença de Graves, doença de Crohn e outras doenças auto-imunes demonstram localização de IL-2- ^{123}I ou IL-2- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nos locais de infiltração de linfócitos⁽¹¹⁾.

A interleuquina-8 marcada com ^{125}I , IL-8- ^{125}I , foi estudada em modelos animais de inflamações agudas e seu acúmulo em abscesso é comparado com o ^{67}Ga e leucócitos marcados com ^{111}In . Com IL-8- ^{131}I detectou foco de infecção em pacientes com osteomielite sem causar efeitos colaterais, encorajando um possível papel diagnóstico desta citocina no homem⁽⁹⁾.

Por serem mediadoras químicas de respostas biológicas induzindo efeitos colaterais, as citocinas são utilizadas em doses muito baixas. Para um aumento

da dose da citocina, elas devem ser processadas com alta atividade específica e sua marcação deve ser cuidadosamente estudada para prevenir que a capacidade de ligação ao receptor fique prejudicada⁽⁶⁾.

1.3.2.4 – Fluorodeoxiglicose-Flúor-18 (FDG-¹⁸F) ⁽¹¹⁾

A utilização de FDG-¹⁸F tornou-se uma ferramenta importante para a diferenciação de tumores malignos e benignos, assim como para avaliação da eficácia do tratamento em pacientes com câncer.

Desde 1931 estudos *in vitro* demonstram o aumento do metabolismo da glicose em tumores malignos. Cintilografias de infecção com FDG-¹⁸F estão baseadas no fato de que os granulócitos e macrófagos utilizam glicose como fonte de energia. Quando ativados através da infecção, o metabolismo da glicose aumenta e desta maneira a captação de FDG-¹⁸F.

Estudos em pacientes com ampla variedade de infecções, incluindo lesões de origem bacteriana e fungos, tuberculose, tecidos moles e infecções ósseas (osteomielite) têm apresentado boa sensibilidade e especificidade.

Apesar da indicação e sucesso do FDG-¹⁸F em uma série de estudos de quadros infecciosos, o mecanismo de captação a partir do aumento do metabolismo da glicose de granulócitos e macrófagos presentes nos locais de inflamação/infecção acaba por limitar a utilização deste radiofármaco, diminuindo sua especificidade. Ele também não discrimina lesões tumorais de inflamatórias. Outra limitação é o custo elevado, pois a modalidade de imagens por PET é extremamente sofisticada⁽¹⁷⁾.

1.3.2.5 – Antibióticos – Ciprofloxacina-^{99m}Tc

A ciprofloxacina é um agente antimicrobiano, da classe das quinolonas, conhecida no seu modo de ação como inibidora da DNA – girase, uma enzima que promove o espiralamento do DNA ⁽⁶⁾.

Os primeiros estudos da ciprofloxacina marcada com ^{99m}Tc foram realizadas no Hospital Santo Bartolomeu, pertencente à Fundação Imperial de Pesquisa de Câncer, em Londres, em 1996, pela equipe do Doutor Britton ⁽¹²⁾. Desde então se tem estudado sua eficácia no diagnóstico nas mais diversas doenças e quadros infecciosos.

Britton e col.⁽¹⁾, Vinjamuri e col.⁽¹²⁾ e Hall e col. ⁽¹³⁾ utilizaram o ácido sulfônicoformamidina (FSA) como agente redutor do ^{99m}TcO₄⁻ e realizaram estudos em pacientes com infecções de próteses de quadril e joelho, osteomielite, artrite reumatóide, endocardite, pneumonia, infecções no trato urinário, gastrintestinal, na pele e em tecidos moles. Comparados aos leucócitos marcados com ^{99m}Tc, os resultados e as imagens cintilográficas são de resolução e sensibilidade superiores e obtidas em menor tempo.

Esta formulação foi modificada pela substituição do agente redutor FSA para tartarato estanoso. É elaborada na forma de kit e comercialmente ficou conhecida como Infecton ^(14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Yapar e col ⁽¹⁵⁾, Sonmezoglu e col. ⁽¹⁶⁾ e Larikka e col. ^(17, 18) estudaram aproximadamente 200 pacientes com diferentes quadros de infecção utilizando o Infecton. Os dados obtidos pelos autores, em comparação com modalidades tradicionais de diagnóstico, como o uso de citrato de ⁶⁷Ga e leucócitos radiomarcados, demonstram a superioridade do uso do Infecton em estudos de infecções de próteses e quadros de osteomielite.

O Infecton combina as vantagens físicas do ^{99m}Tc com o amplo espectro bacteriano da ciprofloxacina e podem-se citar algumas de suas vantagens sobre os leucócitos marcados ^(15, 18).

(1) Não há captação pela medula óssea, podendo identificar infecção na coluna vertebral e em partes proximais dos membros;

(2) O método de marcação é independente do estado dos leucócitos do paciente e tem a vantagem de identificar pacientes com leucopenia;

(3) Pode ser distribuído como conjunto de reagente liofilizado tornando sua marcação tecnicamente mais fácil e menos trabalhosa que a de leucócitos,

(4) Como não há manipulação sanguínea ou de seus componentes durante a preparação, os riscos de hepatite B e infecção pelo Vírus da (HIV) estão descartados.

As imagens obtidas nos estudos clínicos apresentam valores de sensibilidade, especificidade e precisão entre 84-94%, 83-96% e 89-90% respectivamente ^(1, 12, 13, 15, 16, 17, 18).

Dumarey e col. ⁽¹⁹⁾ estudaram pacientes com osteomielite e artrite séptica e observaram captação também em tecidos livres de infecção. Alguns resultados mostram captação do Infecton em locais de inflamação, resultando em um valor de sensibilidade da ordem de 54,5%.

Larikka e col. ^(17, 18) também observaram discreta captação do Infecton em locais de inflamação estéril. Imagens obtidas com 24 horas têm apresentado maior especificidade do que as obtidas entre 1-4 horas ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Embora o mecanismo de captação da ciprofloxacina radiomarcada não esteja devidamente estabelecido, ela é considerada como traçador específico para infecções bacterianas, pela ligação com a enzima DNA-girase.

A ciprofloxacina é transportada por macrófagos, monócitos e neutrófilos e possui capacidade de penetrar na fibrina, um componente essencial da resposta inflamatória ⁽⁶⁾. É uma molécula pequena e com baixa ligação as proteínas plasmáticas (20-30%), que está na forma não ionizada, podendo ser rapidamente difundida, penetrando livremente em áreas inflamadas ^(17, 18) pelo aumento da permeabilidade capilar e transporte de líquidos para tecidos extracelulares ⁽²⁾ resultantes do processo inflamatório.

De Winter e col. ⁽¹⁴⁾ estudaram a dosimetria e biodistribuição do Infecton em pacientes normais demonstrando rápida excreção urinária, alta captação renal, ausência de captação pelo cérebro, pulmão, medula óssea, vesícula biliar, baixa captação pela tireóide e moderada captação hepática. O tempo de meia vida de depuração foi de 4 horas e ao final de 24 horas, aproximadamente 60% da atividade administrada depurou-se via rins. A excreção urinária se ocorreu devido a baixa ligação da ciprofloxacina com proteínas plasmáticas ^(14, 17, 18).

Estes dados demonstram características dosimétricas favoráveis para a aplicação clínica do Infecton sem causar danos aos pacientes. O uso do ^{99m}Tc como radionuclídeo resulta em um diagnóstico de melhor resolução e menor tempo entre a administração da droga e a aquisição das imagens em comparação com ⁶⁷Ga e ¹¹¹In ^(15, 16, 18).

Outra recomendação para a utilização do Infecton é a obtenção de imagens cintilográficas antes do tratamento com antibióticos, ou na fase inicial, pois a terapia anterior ou paralela pode causar resultados falso-negativos ^(12, 16, 17).

A terceira formulação é proposta por Obradivic e col. ⁽²¹⁾. Um estudo utilizando o kit por ele desenvolvido, realizado em 27 pacientes com suspeita de infecção ortopédica mostrou resultados com boa especificidade.

A quarta formulação foi realizada na Grécia por Pimerttis e col. ⁽²²⁾ e a quinta foi feita na República Tcheca por Kleisner e col. ⁽²³⁾.

Gano e col. ⁽⁷⁾, Pimerttis e col. ⁽²²⁾ e Kleisner e col. ⁽²³⁾ estudaram a eficiência e sensibilidade da ciprofloxacina marcada com ^{99m}Tc em ratos da raça Wistar. Estudos em animais sadios mostraram baixa captação pelo fígado, tecidos moles, coluna, ossos, com depuração sanguínea e excreção renal rápidas. Para os animais portadores de infecção, foram obtidas imagens cintilográficas que delinearão o foco infeccioso induzido. A razão de captação entre o tecido alvo e não alvo foi de 2 a 5 vezes maior.

Sarda e col. ⁽²⁰⁾ avaliaram o perfil do Infecton em coelhos da raça Nova Zelândia portadores de próteses de joelho infectadas, porém sem a discriminação entre os grupos de animais infectados com *S. aureus* dos animais normais.

Gano e col. ⁽⁷⁾ e Oh e col. ⁽²⁴⁾ realizaram estudos *in vitro* para avaliar a ligação da ciprofloxacina-^{99m}Tc em cepas de *S. aureus* e *E. coli*, concluindo que não há perda de atividade antimicrobiana com a marcação da molécula de ciprofloxacina.

1.4 - GENERALIDADES SOBRE O TECNÉCIO-99m

1.4.1 – Histórico ⁽²⁵⁾

O tecnécio, elemento 43 da tabela periódica, foi descoberto em 1937 por Ségre e seus colaboradores que realizavam estudos utilizando o ciclotron da Universidade da Califórnia, em Berkeley.

Ségre, com a assistência de Carlo Perrier, analisando vários fragmentos metálicos do interior do ciclotron, separou o tecnécio do molibdênio, que era um

dos materiais que formavam o defletor do ciclotron. Uma vez isolado, foi possível medir a meia-vida do tecnécio.

Por um processo minucioso de eliminação, os autores descartaram a possibilidade da substância ser um radioisótopo de zircônio, nióbio, molibdênio, rutênio ou manganês. Eles observaram que a substância possui propriedades químicas similares ao rênio.

Com o desenvolvimento do reator nuclear, foi possível produzir o elemento 43 pela fissão do urânio. O nome deste primeiro elemento radioativo produzido artificialmente é derivado do grego *technetos*, que significa artificial.

Os 21 isótopos de Tc variam em massa atômica de 90 a 110, e as meias-vidas variam de 0,86 segundos a $2,6 \times 10^6$ anos. Destes, apenas um, o ^{99m}Tc , apresenta propriedades físicas ideais ($t_{1/2} = 6,02$ horas e $E_\gamma = 140$ keV) para detecção externa, promovendo pequena exposição do paciente. Outros nuclídeos de Tc que podem ser úteis em pesquisa clínica são ^{96}Tc , um emissor gama com tempo de meia-vida de 4,35 dias e o ^{94m}Tc , um emissor de pósitron com tempo de meia-vida de 53 minutos.

Por vários anos, a descoberta do tecnécio permaneceu como uma curiosidade científica. Em 1950, no processo de separação dos produtos de fissão do urânio, o grupo de Brookhaven desenvolveu o gerador de telúrio-132/iodo-132 (^{132}Te - ^{132}I). Este gerador consistia do produto de fissão ^{132}Te adsorvido numa coluna de alumina e o ^{132}I eluído da coluna com hidróxido de amônio diluído. O ^{132}I continha traços de ^{99m}Tc , e desta forma o grupo deduziu que o molibdênio-99 (^{99}Mo) seguia a química do ^{132}Te .

Nos anos subseqüentes foram idealizados os primeiros geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, aumentou-se a pureza do produto de fissão e da solução do eluído e

diminuiu-se o nível de contaminação dos eluídos do ^{99m}Tc com ^{99}Mo e outros radionuclídeos.

O uso clínico do pertecnetato de sódio como radiofármaco data de 1964, bem como a utilização de colóide de enxofre marcado com ^{99m}Tc . Em 1968, o ácido dietilenotriamino pentaacético (DTPA) foi marcado com ^{99m}Tc e em 1970, tinha-se o primeiro reagente disponível para marcação com ^{99m}Tc , que reunia o ligante e o agente redutor na forma liofilizada para pronta marcação com a solução de pertecnetato de sódio.

As técnicas de rotina hospitalar devem ser práticas e acessíveis. Com a disponibilidade comercial de vários reagentes liofilizados para pronta marcação pelo ^{99m}Tc , este deve ser de fácil aquisição e deve apresentar características ideais de produto farmacêutico injetável e de uso médico.

Obtém-se após a adição da solução eluente ao gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, um líquido transparente, livre de pirogênio e de carregadores. Desde a sua origem, o emprego de radiofármacos tem-se difundido de forma excepcional, interligando várias áreas médicas e fazendo da Medicina Nuclear, uma fonte de estudo e investigação inesgotável.

1.4.2 – Propriedades Físicas ⁽²⁵⁾

O ^{99m}Tc por apresentar um decaimento favorável, é um dos radioisótopos mais empregados e considerado ideal para a técnica de diagnóstico por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Simples (SPECT). Ele possui uma meia-vida física de 6 horas e decai 100% por transição isomérica, para ^{99}Tc , conforme a Figura 2 abaixo:

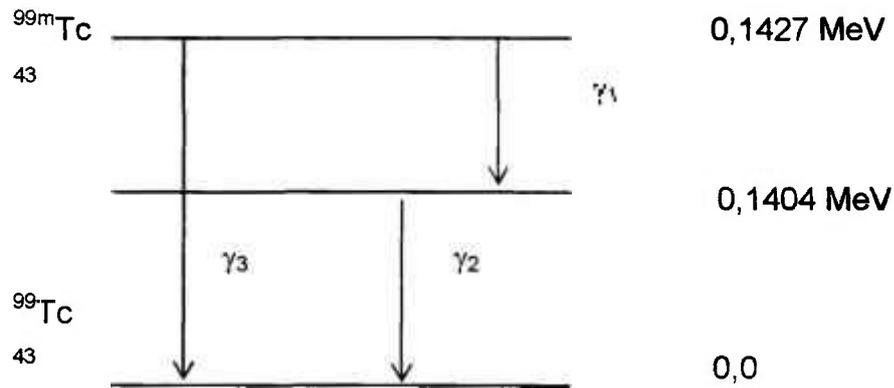


Figura 2 – Esquema de Decaimento do ^{99m}Tc

Neste esquema, a energia γ_2 é a principal emissão, cuja energia dos fótons monocromáticos é de 140 keV (87,5%). Isto os torna potencialmente colimáveis, permitindo a obtenção de imagens com resolução espacial superior. Esta energia é ideal para a penetração nos tecidos e para o uso nos detectores utilizados na Medicina Nuclear, cuja faixa de operação situa-se entre 100 e 300 keV.

Sem a emissão de radiação corpuscular, podem ser administradas maiores atividades ao paciente com baixa dose de radiação e as imagens obtidas possuem uma resolução melhor ainda.

O ^{99m}Tc também é obtido de maneira prática e fácil a partir dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, podendo ser transportado com segurança a diferentes locais, inclusive a longas distâncias.

1.4.3 – Propriedades Químicas ⁽²⁶⁾

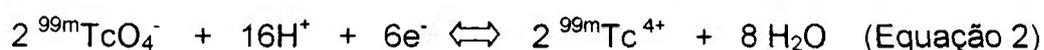
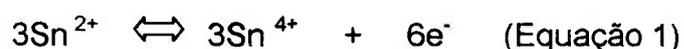
O tecnécio é um metal de transição do grupo VIIB que possui 7 elétrons além da configuração eletrônica de um gás nobre. Os outros elementos deste grupo são o Manganês (Mn) e o Rênio (Re); juntos eles formam a tríade (Mn, Tc, Re).

O tecnécio pode se apresentar em oito estados de oxidação, de 1- a 7+, que resultam na perda dos elétrons dos orbitais 4d e 5s ou no ganho de elétrons para o orbital 4d. A estabilidade destes estados de oxidação depende do tipo de ligante e do meio químico. Os estados 7+ e 4+ são os mais estáveis e estão presentes em óxidos, sulfitos, haletos e pertecnetatos. Os estados mais baixos de oxidação, 1-, 1+, 2+ e 3+, são normalmente estabilizados pela complexação com ligantes. Os estados 5+ e 6+, freqüentemente passam para os estados 4+ e 7+. O número de coordenação dos complexos de ^{99m}Tc varia entre 4 e 9.

Amostras de ^{99m}Tc são obtidas a partir da eluição de geradores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc , na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). A concentração de pertecnetato obtida por eluição de um gerador varia de 10^{-6} a 10^{-9} M.

O número de oxidação do ^{99m}Tc obtido dos geradores é 7+. Quimicamente, neste estado de oxidação, o tecnécio não é capaz de complexar diretamente seus ligantes, sendo necessária a sua redução. Vários são os redutores que têm sido utilizados, tais como, citrato estanoso, tartarato estanoso, ácido clorídrico concentrado, sulfato ferroso, borohidreto de sódio e preferencialmente cloreto estanoso diidratado em meio ácido.

A reação química que ocorre durante o processo de redução do tecnécio com cloreto estanoso diidratado está descrita conforme equações abaixo:



Durante o processo de redução, a presença do ligante estabiliza o tecnécio quando este se encontra em estado de oxidação menor. Caso contrário forma-se o tecnécio coloidal, TcO_2 , como subproduto.

Os ligantes utilizados podem ser ânions inorgânicos ou uma molécula orgânica contendo átomos doadores de elétrons (átomos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre) que servem como átomos de coordenação.

Assim, um radiofármaco de tecnécio é um produto da reação do tecnécio reduzido e um ligante orgânico ou inorgânico e como impurezas pode-se ter o excesso de $^{99m}TcO_4^-$ livre; a forma coloidal, $^{99m}TcO_2$; ^{99m}Tc -Hidrolizado e o $^{99m}TcO_4^-$ reoxidado. O produto é chamado de complexo e sua estabilidade depende das forças de ligação entre o metal e o ligante. A ligação (marcação) entre o tecnécio e o ligante pode-se dar de maneira direta ou indireta.

Na marcação direta, o tecnécio é reduzido em presença do ligante. Na marcação indireta, um ligante intermediário é utilizado para estabilizar o estado de oxidação reduzido do tecnécio. Assim, outro ligante que compete pelo metal transfere o metal do ligante intermediário para o ligante de interesse.

1.5 – CONCEITOS EM LIOFILIZAÇÃO ⁽²⁷⁾

Por vários anos a liofilização foi utilizada como operação farmacêutica para a desidratação a baixa temperatura de sistemas injetáveis. Com a necessidade de se preparar novas drogas na forma sólida, estável e que possam ser facilmente reconstituídas antes da administração parenteral, os princípios físico-químicos que regem o processo de liofilização têm sido reexaminados e pesquisados para aumentar a estabilidade química e física de tais produtos.

A liofilização é definida como uma técnica que permite a desidratação de um produto previamente congelado, no qual a água é removida por sublimação sob pressão reduzida.

É um método ideal para produtos ou substâncias de natureza complexa que possuam constituintes sujeitos a alterações por calor, presença de oxigênio e umidade.

As vantagens da liofilização em relação aos outros processos para a produção de fármacos são:

- A baixa temperatura durante todo o processo que evita qualquer alteração química das substâncias sensíveis ao calor e umidade;
- Redução da perda de constituintes voláteis;
- Fácil reconstituição devido a estrutura porosa resultante da saída de água;
- Redução na tendência de aglomeração que alguns produtos apresentam quando são dessecados por outras técnicas;
- Maior estabilidade dos sólidos liofilizados que as soluções aquosas equivalentes.

O processo de liofilização é realizado em três etapas: congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária.

Como já descrito, o ^{99m}Tc é um dos radionuclídeos mais utilizados em Medicina Nuclear por apresentar excelentes características químicas e físicas, com pronta disponibilidade a partir de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Possui capacidade de redução de seu número de oxidação e complexação com diversas moléculas orgânicas com bioafinidade a vários órgãos/tecidos alvos para radiodiagnóstico.

Estas moléculas orgânicas podem estar disponíveis na forma liofilizada, compondo o que chamam de Reagentes Liofilizados, os kits. Os kits são produtos não-radioativos (frios) liofilizados, compostos de um ligante e de um agente redutor, que posteriormente serão reconstituídos com ^{99m}Tc eluído do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Espera-se o tempo de reação adequado e o radiofármaco estará pronto para administração intravenosa ao paciente.

O gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ normalmente é adquirido pelas clínicas semanalmente e eluído diariamente. Os kits podem ser comprados e estocados para preparação diária e apresentam as vantagens do prolongamento da vida útil, confiabilidade processual e facilidade de reconstituição.

A vida útil de um kit é da ordem de seis meses, sendo possível um rigoroso controle de qualidade anterior à utilização.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos principais:

- 1) A otimização da marcação da ciprofloxacina com ^{99m}Tc ,
- 2) A análise de sua eficácia no diagnóstico de sítios de infecção e
- 3) Pretendeu-se o desenvolvimento do produto na forma liofilizada com acompanhamento de seus parâmetros radioquímicos e biológicos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

Os materiais e equipamentos utilizados para a marcação da ciprofloxacina com ^{99m}Tc estão relacionados nas Tabela 1 e 2, respectivamente:

Tabela 1 – Materiais utilizados na marcação ciprofloxacina- ^{99m}Tc

MATERIAL	MARCA/ORIGEM
Hidrocloreto de Ciprofloxacina, Pureza 99%	BAYER
$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	Gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, IPEN
Suporte Cromatográfico ITLC-SG	Gelman Science
Suporte Cromatográfico TLC-Al	Merck
Suporte Cromatográfico Whatman 3MM	Whatman
Cloreto Estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Reagentes, Grau de Pureza Para Análise	Merck
Uretana	Sigma
Nitrogênio, Pureza 99,5%	White Martins
Ratos Wistar e Camundongos Swiss Sadios	Biotério do IPEN
Cepas de <i>Escherichia coli</i> – C-600	UNIFESP

Tabela 2 – Equipamentos utilizados na marcação ciprofloxacina- ^{99m}Tc

EQUIPAMENTO	MARCA/MODELO
Contador Gama	Packard, COBRA II
Detector de Radiação	Capintec, CRC-15R
Mini Gama Câmara	Berthold-Gamma Budapest, MB9420
Balança Analítica	Denver Instrument, M220
Liofilizador	Edwards/Super Modulyo 12K

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m}Tc

Foram elaboradas duas formulações, denominadas Preparação 1 e Preparação 2, para marcação da ciprofloxacina com ^{99m}Tc que continham 2 mg/mL de ciprofloxacina dissolvida em água purificada e 30 μL de uma solução 4,4 mM de cloreto estano diidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em HCl 0,1N previamente nitrogenado.

À Preparação 2 juntou-se também 1 mL de solução tampão fosfato 0,02M, pH 7,5 previamente nitrogenado.

A cada formulação adicionou-se 55,5 MBq (1,5 mCi), com volume entre 0,5-1,0 mL de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$).

As preparações foram deixadas em repouso, à temperatura ambiente, por 30 minutos para completa reação.

3.2.2 – Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

Na literatura encontram-se descritos conjuntos de suportes (fase estacionária) e solventes (fase móvel) para determinação da pureza radioquímica dos radiofármacos de ^{99m}Tc mais comumente utilizados.

A eficiência de marcação foi avaliada utilizando como suportes papel Whatman 3MM e camada delgada ITLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography – Sílica Gel) bem como TLC-Al (Thin Layer Chromatography – Alumin).

Os solventes, ou misturas de solventes, utilizados na presente investigação foram: acetona; acetona 90%; metiletilcetona (MEC); metanol 85%; butanol;

solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, a 20% e a 30%; ácido fosfórico (H_3PO_4) 1,1 M; ácido clorídrico (HCl) 1N; a mistura diclorometano:metanol:amônia 25%:acetonitrila (4:4:2:1) e a mistura amônia 25%:acetonitrila (3:1).

Os suportes cromatográficos (fitas) foram cortados em tiras de 1,5 cm x 18 cm. As fitas foram marcadas a 1,5 cm de sua origem para aplicação da amostra com tubo capilar e a 10 ou 15 cm distante deste ponto para denotar o final do desenvolvimento da fase móvel (frente do solvente). As fitas foram subsequentemente inseridas em cubas cromatográficas, vedadas, contendo as fases móveis, cujo nível deve estar abaixo do ponto de aplicação da amostra.

Por capilaridade a fase móvel se move em fluxo ascendente até a frente do solvente. O suporte foi retirado da cuba e aguardou-se a secagem. Depois foram divididos horizontalmente em segmentos de 1 cm a partir do ponto de aplicação da amostra e a radioatividade de cada segmento foi determinada em contador gama tipo poço.

A porcentagem de pureza radioquímica foi calculada pela razão da radioatividade dos segmentos associados ao produto e a radioatividade total da tira de papel multiplicada por 100.

As cromatografias foram realizadas em duplicata.

3.2.3 – Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

Procedeu-se à otimização das preparações com variação da concentração do agente redutor de 30 a 100 μg de uma solução 4,4 mM de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl 0,1N e da atividade do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em 55,5, 1850 e 3700 MBq (1,5, 50 e 100 mCi).

As preparações para a otimização foram deixadas em repouso, à temperatura ambiente, por 30 minutos para completa reação.

3.2.4 – Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Para as preparações otimizadas selecionaram-se tempos menores de reação, nominalmente 1, 5, 10 e 20 minutos, a fim de avaliar se eles seriam suficientes para a obtenção de rendimento de marcação comparável ao obtido com 30 minutos.

3.2.5 – Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Para as preparações com os melhores resultados em termos de massa de cloreto estanoso e atividade máxima de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, a estabilidade foi estimada, utilizando as técnicas cromatográficas mencionadas no parágrafo 3.2.2, pelo período de 6 horas.

3.2.6 – Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1 da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Para a Preparação 1, os resultados preliminares com o uso de altas atividades de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tempos maiores de estabilidade mostraram-se insatisfatórios.

Para correção deste fator, valeu-se do uso de um agente antioxidante.

Adicionou-se 5 mg de ácido ascórbico (solução 0,145 M) e a Preparação 1 foi reavaliada para atividades de 1850 e 3700 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e estabilidade pelo período de 6 horas.

Para a Preparação 2 não houve modificação.

3.2.7 – Estudos Biológicos

3.2.7.1 – Modelo Infeccioso

Estudaram-se três procedimentos/protocolos de modelo infeccioso *in vivo* para avaliação da biodistribuição da Ciprofloxacina-^{99m}Tc. A indução da infecção foi realizada 24 horas antes da administração da droga.

O primeiro protocolo foi realizado como o descrito na literatura. O modelo de indução infecciosa utilizado pelos pesquisadores foi a partir de injeções de *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*, com concentração entre 10^6 e 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no flanco direito de ratos ou camundongos. O sacrifício foi efetuado entre 1-4 horas após a administração do radiofármaco (7, 20, 22, 23).

Neste trabalho, o abscesso foi criado no flanco direito de ratos da raça Wistar (200-250g, n=40) por inoculação subcutânea profunda de 0,1 ml de cultura de *Escherichia coli* (*E. coli*), com concentração de 2×10^8 de UFC.

Todavia os animais revelaram-se resistentes aos microrganismos, assim se potencializou o abscesso mediante agressão físico-química tecidual.

No segundo protocolo, através de uma pequena incisão realizada no flanco direito de ratos da raça Wistar (200-250g, n=40), foi induzida uma queimadura com fio metálico aquecido, bem como traumatismo local do tecido mediante esmagamento parcial do subcutâneo com pinça cirúrgica, seguido da introdução de 0,1 ml de bactérias fecais (*E. coli*, 10^6 - 10^7 UFC) e de fragmento de 1 cm de fio cirúrgico (corpo estranho), com sutura final da incisão.

No terceiro protocolo utilizaram-se camundongos da raça Swiss (30-40 g, n=36). Devido à pequena dimensão destes animais e dificuldades técnicas para produção da queimadura e outras manipulações, optou-se por um potencializador

químico, com o mesmo inóculo microbiano. No flanco direito injetou-se primeiramente 0,05 ml de terebentina e após 1 hora, 0,15 ml de bactérias fecais (*E. coli*, 10^9 - 10^{10} UFC).

A solução de bactéria fecais foi preparada com a dissolução de 1 grama de fezes recém coletadas dos animais utilizados, em 10 mL de solução salina 0,9% e filtrada em recipiente sob banho de gelo. A quantidade de Unidades Formadoras de Colônia foi determinada em microscópio.

3.2.7.2 - Aquisição de Imagens Cintilográficas

As preparações 1 e 2 otimizadas foram administradas intravenosamente em animais sadios, previamente anestesiados (ratos Wistar, n=6 para cada preparação) e portadores de infecção segundo os protocolos 1 e 2.

As imagens cintilográficas foram adquiridas em gama-câmara 4 horas após a administração da droga.

3.2.7.3 – Biodistribuição (estudo invasivo)

O estudo de biodistribuição foi realizado em camundongos Swiss sadios e infectados (30-40 g, n=6) conforme o terceiro protocolo, com a indução da infecção utilizando 0,1 mL de bactérias fecais (*E. coli*, 10^6 - 10^7 UFC).

Os preparados radiomarcados foram injetados na veia caudal e os animais sacrificados 4 horas depois.

Tecidos (sangue) e órgãos (fígado, rins, osso, baço, estômago, intestino, bexiga, tecido do flanco normal e tecido homônimo infectado) foram retirados e suas atividades radioativas foram medidas em contador gama.

Os resultados foram expressos em porcentagem de dose injetada por

grama de cada órgão (%D/g). Utilizaram-se os valores da contagem radioativa de cada órgão, o peso dos animais e dos órgãos retirados e a medida da dose total idêntica (padrão) à administrada nos animais.

A %D/g sangüínea foi calculada assumindo-se que este tecido representa 7% do peso total do corpo. Nos animais infectados, onde se pode determinar a %D/g da bexiga, esta foi cuidadosamente atada, retirada e pesada para o cálculo.

3.2.8 – Liofilização

Foram preparados 50 frascos com 1 mL cada um contendo: 2 mg de ciprofloxacina, 30 μ g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de ácido ascórbico.

Foram submetidos ao processo de liofilização conforme Programa PNR2 do Liofilizador Supermodulyo 12K da marca Edwards. As condições do processo foram as seguintes ⁽³⁰⁾:

- temperatura de congelamento de - 45 °C, onde as amostras permanecem nesta temperatura por 4 horas;
- temperatura de condensação de - 50 °C;
- pressão de 6×10^{-2} mbar;
- processo de desidratação realizado nas 18 horas seguintes, a temperatura eleva-se de - 45 °C para 20 °C para sublimação da água;
- ao ser atingido 20 °C, o produto permaneceu por mais duas horas na câmara visando estabilização físico-química.

A preparação liofilizada foi reconstituída com 1,5-2 mL de solução contendo 3700 MBq de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$.

3.2.9 – Avaliação da Preparação Liofilizada

A estabilidade radioquímica e biológica do produto liofilizado foram estimadas por um período de dois meses.

3.2.9.1 – Estabilidade Radioquímica

Ao final de cada mês, avaliou-se a pureza radioquímica de dois frascos marcados com a atividade máxima de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (3700 MBq), mencionada no parágrafo 3.2.6 e pelo período de 6 horas após a reconstituição, como mencionado no item 3.2.5.

3.2.9.2 – Estabilidade Biológica

Estudos de biodistribuição invasivos foram realizados ao final do 1º e 2º meses da liofilização, em animais sadios e portadores de infecção (conforme protocolo 3, item 3.2.7.1).

4 – RESULTADOS

4.1 - Rendimento de Marcação das Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m}Tc

Para as preparações 1 e 2 obteve-se um rendimento de $97,27 \pm 1,8 \%$ e $97,40 \pm 0,7 \%$, respectivamente.

4.2 – Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

Foram estudados diversos modelos cromatográficos para melhor definir os picos de diferentes espécimes radioativos que poderiam integrar a marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc como impurezas. Basearam-se, a princípio, nos sistemas de solventes e suportes já comumente utilizados para avaliação de outros complexos de ^{99m}Tc e nos citados na literatura para a ciprofloxacina marcada.

Na Tabela 3 têm-se os suportes, solventes e os Fatores de Retenção (R_f) dos espécimes radioativos da marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc que melhores reprodutibilidades apresentaram nos ensaios deste trabalho.

Tabela 3 – Relação de Solventes e Suportes para determinação da Pureza Radioquímica da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc

Solvente / Suporte	R_f	R_f	R_f
	Ciprofloxacina- ^{99m}Tc	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_2$
Acetona 90 % / Whatman 3 MM	0,0	1,0	0,0
MEC / Whatman 3 MM	0,0	1,0	0,0
Amônia 25%:Acetonitrila (3:1)/ITLC-SG	1,0	1,0	0,0
H_3PO_4 1,1 M / ITLC-SG	1,0	1,0	0,0

Para a preparação 1 os solventes que apresentaram o melhor perfil cromatográfico foram acetona 90 % e a mistura amônia 25 % : acetonitrila (3:1) nos suportes indicados na Tabela 3. Para a preparação 2 o melhor perfil cromatográfico foi obtido com MEC e H₃PO₄ 1,1 M.

4.3 - Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

Dois parâmetros foram inicialmente avaliados para otimização da marcação. O primeiro foi a massa do agente redutor, cloreto estanoso, e o segundo a atividade crescente do radioisótopo até 3700 MBq.

As Tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, os resultados da otimização da marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc para as preparações obtidas através de fracionamento cromatográfico utilizando as técnicas descritas no item 4.2.

Tabela 4 – Pureza Radioquímica para Ciprofloxacina-^{99m}Tc – Preparação 1

Atividade ^{99m} TcO ₄ ⁻ (MBq)	Massa SnCl ₂ .2H ₂ O (µg)	% Produto (X ± D.P.)	% ^{99m} TcO ₄ ⁻	% ^{99m} TcO ₂
55,5	30	97,27 ± 1,8	1,95	0,78
	50	97,25 ± 1,8	2,16	0,39
	75	94,40 ± 2,0	3,97	1,94
	100	96,02 ± 2,2	2,20	1,78
1850	30	94,31 ± 0,5	2,86	2,83
	50	91,84 ± 0,7	1,39	6,78
	75	89,51 ± 0,9	1,00	9,50
	100	87,30 ± 0,6	0,92	11,78
3700	30	74,24 ± 1,5	10,49	15,27
	50	74,68 ± 1,4	5,35	19,97

Atividade ^{99m} TcO ₄ ⁻ (MBq)	Massa SnCl₂.2H₂O (μg)	% Produto (X ± D.P.)	% ^{99m}TcO₄⁻	% ^{99m}TcO₂
3700	75	73,42 ± 2,4	2,31	24,27
	100	73,78 ± 2,6	1,58	24,64

X – Média; D.P. – Desvio Padrão; n=6

Tabela 5 – Pureza Radioquímica para Ciprofloxacina-^{99m}Tc – Preparação 2

Atividade ^{99m} TcO ₄ ⁻ (MBq)	Massa SnCl₂.2H₂O (μg)	% Produto (X ± D.P.)	% ^{99m}TcO₄⁻	% ^{99m}TcO₂
55,5	30	97,40 ± 0,7	0,70	1,90
	50	96,92 ± 1,1	0,79	2,29
	75	96,00 ± 1,5	1,25	2,75
	100	97,30 ± 0,3	0,30	2,41
1850	30	97,92 ± 0,4	0,84	1,24
	50	97,46 ± 0,2	0,82	1,72
	75	95,95 ± 0,8	0,42	3,63
	100	97,54 ± 0,5	0,51	1,95
3700	30	96,69 ± 0,7	1,19	2,13
	50	95,70 ± 3,0	0,58	3,72
	75	96,87 ± 0,3	0,46	2,68
	100	96,64 ± 1,3	0,43	2,93

X – Média; D.P. – Desvio Padrão; n=6

Os primeiros estudos foram realizados com a preparação 1 sem a utilização de solução tampão, como observado na literatura.

Os melhores rendimentos obtidos foram observados para atividades do radioisótopo até 1850 MBq e massa de cloreto estano de 30 μg. Com atividade de 3700 MBq o rendimento caiu 20,07 % em relação ao anterior.

A possibilidade da utilização de uma atividade superior para marcação é um fator de interesse. Por esta razão foi feita uma segunda preparação contendo solução tampão fosfato 0,02M. Obteve-se assim, um rendimento de $96,69 \pm 0,70\%$ com uma massa de $30 \mu\text{g}$ de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e atividade de 3700 MBq de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

4.4 - Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Um outro parâmetro para otimização é o tempo de reação. Quanto menor ele for, mais rapidamente o produto estará disponível para uso. Estudaram-se tempos de reação que variaram de 1 a 30 minutos.

A ciprofloxacina demonstrou marcação imediata pelo $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ tanto para a preparação 1 como para 2, pois o rendimento após um minuto de reação foi semelhante aos de tempos maiores, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 1-30 Minutos

Tempo (minutos)	Preparação 1	Preparação 2
1	$98,70 \pm 0,4$	$97,03 \pm 0,3$
5	$98,79 \pm 0,6$	$97,45 \pm 0,5$
10	$98,98 \pm 0,8$	$96,92 \pm 0,6$
20	$98,58 \pm 0,4$	$97,28 \pm 0,9$
30	$97,27 \pm 1,8$	$97,40 \pm 0,7$

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 30 \mu\text{g}; ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- - 55,5 \text{ MBq}; n=6$

Por segurança optou-se por realizar as marcações da Ciprofloxacina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizando 10 minutos de reação para ambas as preparações.

4.5 – Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Os resultados de pureza radioquímica no período de 360 minutos foram avaliados para as duas preparações nas condições de massa de cloreto estanoso e atividade máxima de ^{99m}TcO₄⁻ otimizadas (Tabelas 4 e 5) e são observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc até 360 minutos

Tempo (minutos)	Preparação 1 (^{99m} TcO ₄ ⁻ - 1850 MBq)	Preparação 2 (^{99m} TcO ₄ ⁻ - 3700 MBq)
10	98,87 ± 0,2	97,11 ± 0,4
60	94,00 ± 0,5	96,41 ± 0,2
120	89,65 ± 0,3	96,00 ± 0,3
240	65,74 ± 0,5	95,49 ± 0,8
360	54,10 ± 0,4	95,70 ± 0,5

SnCl₂. 2H₂O = 30 µg; n = 6

A preparação 1 permaneceu estável apenas pelo período de 1 hora, enquanto a preparação 2 mostrou-se estável por 6 horas mantendo rendimento radioquímico no período.

4.6 – Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1 da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Como apresentado na Tabela 7, a preparação 1 foi estável somente pelo período de 1 hora. Para a melhora deste parâmetro utilizou-se uma solução 0,145M de AA, para atividades de 1850 e 3700 MBq de ^{99m}TcO₄⁻, avaliando-se a pureza radioquímica pelo período de 10 minutos a 6 horas.

Com esta alteração a Ciprofloxacina-^{99m}Tc apresentou-se estável (Tabela 8):

Tabela 8 – Rendimento de Marcação da Preparação 1 com AA

Tempo (minutos)	1850 MBq ^{99m} TcO ₄ ⁻	3700 MBq ^{99m} TcO ₄ ⁻
10	98,73% ± 0,1	95,85% ± 0,7
60	97,34% ± 0,5	95,04% ± 0,7
120	97,27% ± 0,4	94,42% ± 0,3
240	96,82% ± 0,8	94,09% ± 0,4
360	93,68% ± 0,5	92,87% ± 0,3

SnCl₂. 2H₂O – 30 µg; n=6

4.7 – Parâmetros Otimizados para Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

A Tabela 9 resume os parâmetros avaliados e as modificações realizadas quando necessário, definindo as formulações para as Preparações 1 e 2.

Tabela 9 – Parâmetros para Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc

Parâmetro	Preparação 1	Preparação 2
Massa de Ciprofloxacina (mg/mL)	2	2
SnCl ₂ . 2H ₂ O (µg)	30	30
Ácido Ascórbico (mg)	5	-
Tampão Fosfato 0,02M, pH 7,5 (mL)	-	1
Atividade Máxima TcO ₄ ⁻ (MBq)	3700	3700
Tempo de Reação (minutos)	10	10
Estabilidade (minutos)	360	360

4.8 – Estudos Biológicos

4.8.1 e 4.8.2 – Modelo Infeccioso e Aquisição de Imagens Cintilográficas

As eficácias dos protocolos 1 e 2 utilizados foram determinadas baseadas na observação de captação pelo foco induzido, nas imagens cintilográficas obtidas quando o radiofármaco foi administrado. Para o protocolo 3 foi baseada na mortalidade dos animais nas primeiras 24 horas.

A eficácia do primeiro modelo ensaiado foi modesta, pois houve extrema resistência dos roedores às infecções exógenas, talvez por ter ocorrido diminuição da viabilidade dos microrganismos durante seu transporte, ou ainda pela inexistência de uma agressão inflamatória local que favorecesse a implantação do foco infeccioso.

O segundo e terceiro protocolos desenvolvidos proporcionaram números mais aceitáveis de abscessos desenvolvidos, conforme elucidado na Tabela 10:

Tabela 10 – Eficácia dos Modelos de Infecção

Nº Protocolo	Animal	Nº Animais	Modelo	% Eficácia
1	Rato Wistar	40	Cultura <i>E. coli</i>	5%
2	Rato Wistar	40	Queimadura/ traumatismo/ <i>E. coli</i>	20%
3	Camundongo Swiss	36	Terebentina/ <i>E. coli</i>	60%

As imagens cintilográficas foram adquiridas em animais sadios, apresentando grande reprodutibilidade entre si.

As Figuras 3 e 4 apresentam imagens cintilográficas de animais sadios obtidas 4 horas após a administração da ciprofloxacina-^{99m}Tc segundo as preparações 1 e 2 respectivamente.

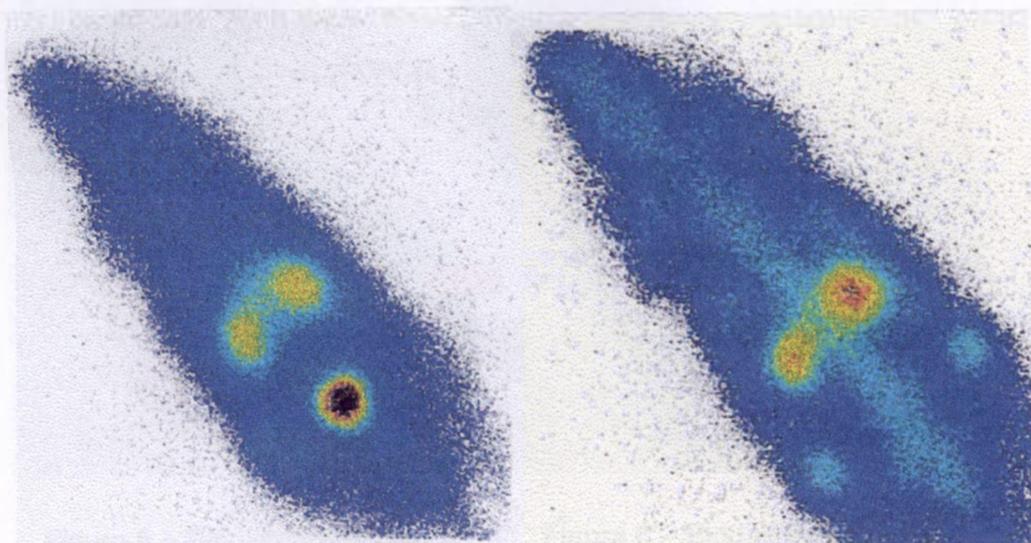


Figura 3 – Biodistribuição da ciprofloxacina-^{99m}Tc, Preparação 1

Figura 4 – Biodistribuição da ciprofloxacina-^{99m}Tc, Preparação 2

Observou-se que a Ciprofloxacina-^{99m}Tc foi distribuída pelo corpo e excretada via renal, como mostra a alta captação pelos rins e bexiga. Não se observou captação hepática. Efetivamente, na Figura 3 se identifica claramente os dois rins em amarelo e o complexo uretra/bexiga em preto. Na Figura 4 estas imagens são semelhantes, notando-se em contrapartida o traçado azulado da captação óssea.

Para animais infectados as melhores imagens foram obtidas segundo o protocolo 2. As imagens cintilográficas são apresentadas nas Figuras 5 e 6 respectivamente.

ÓRGÃO	P1 - 5.0µg (A + D + P)	P2 - 5.0µg (A + D + P)
ACAO	2.74 ± 0.1	2.85 ± 0.3
RIS	0.01 ± 0.0	1.74 ± 0.1
OSO	2.25 ± 0.1	15.41 ± 0.1
BAG	0.58 ± 0.2	2.10 ± 0.2
ESTOMAGO	1.01 ± 0.1	2.84 ± 0.4

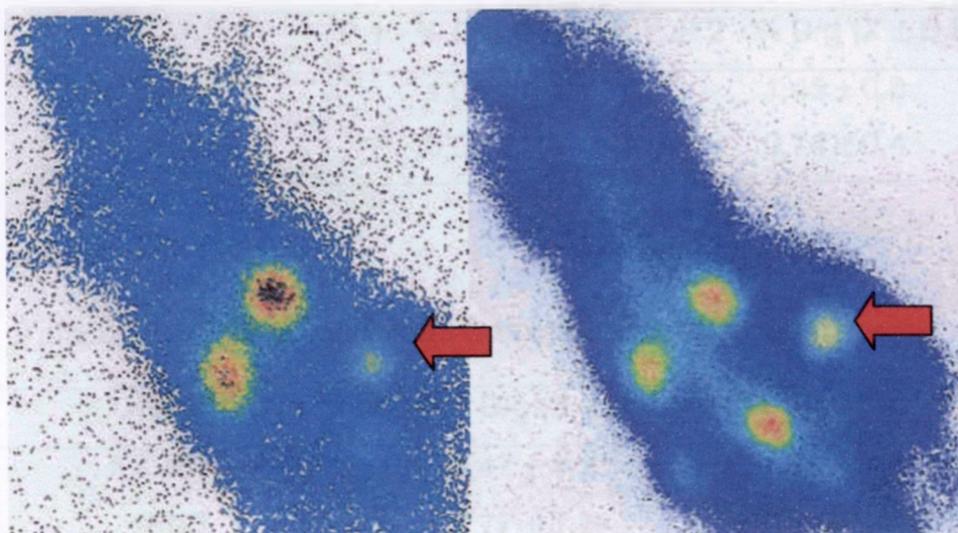


Figura 5 – Biodistribuição da ciprofloxacina-^{99m}Tc, Preparação 1

Figura 6 – Biodistribuição da ciprofloxacina-^{99m}Tc, Preparação 2

Além do padrão já descrito para animais saudáveis, houve captação dos produtos pelos focos infecciosos, traduzidos por amarelo-azulado nos flancos direitos dos animais, a meia distância entre o rim e a bexiga, como indicados pelas flechas.

4.8.3 – Biodistribuição

Nas Tabelas 11 e 12 acompanham-se os resultados de biodistribuição expressos em %Dose/g para camundongos saudáveis e infectados, respectivamente, obtidos para as preparações 1 e 2 conforme item 3.2.3.

Tabela 11 – Biodistribuição em Camundongos Saudáveis

ÓRGÃO	P 1 - % D/g (X ± D.P.)	P 2 - % D/g (X ± D.P.)
FÍGADO	3,34 ± 0,3	2,85 ± 0,3
RINS	6,61 ± 0,6	5,74 ± 0,1
OSSO	2,35 ± 0,3	15,41 ± 0,1
BAÇO	0,64 ± 0,2	2,63 ± 0,5
ESTOMAGO	1,01 ± 0,7	2,84 ± 0,4

ÓRGÃO	P 1 - % D/g (X ± D.P.)	P 2 - % D/g (X ± D.P.)
INTESTINO	1,09 ± 0,1	1,45 ± 0,8
SANGUE	0,58 ± 0,2	0,74 ± 0,4

n = 6

Tabela 12 – Biodistribuição em Camundongos Infectados

ÓRGÃO	P 1 - % D/g (X ± D.P.)	P 2 - % D/g (X ± D.P.)
FIGADO	3,47 ± 1,1	2,86 ± 0,9
RINS	6,77 ± 1,2	6,67 ± 1,4
OSSO	1,04 ± 0,4	11,01 ± 1,4
BAÇO	1,38 ± 0,4	2,44 ± 0,9
ESTOMAGO	0,92 ± 0,6	3,07 ± 0,7
INTESTINO	3,27 ± 1,0	1,72 ± 0,4
BEXIGA	70,54 ± 2,4	65,89 ± 3,0
SANGUE	0,45 ± 0,2	0,79 ± 0,6
PATA NORMAL (PN)	0,56 ± 0,7	1,40 ± 0,5
PATA INFECTADA (PI)	1,35 ± 0,7	1,96 ± 0,8
PI/PN	2,4	1,4

n = 6

Os produtos apresentaram alta captação renal e a preparação 2 também apresentou captação óssea, confirmando as imagens cintilográficas para animais sadios e infectados. Para os animais infectados a preparação 1 apresentou captação no flanco infectado 2,4 vezes a mais que no lado de controle, o que não aconteceu para a preparação 2, contendo tampão.

4.9 – Avaliação do Produto Liofilizado

Após ciclo de 24 horas de liofilização, os 50 frascos foram lacrados e armazenados sob temperatura de 2-8 °C.

Uma semana após a produção do kit, foram reconstituídos 2 frascos e a pureza radioquímica foi avaliada por um período de 6 horas após a adição de 3700 MBq do radioisótopo. A Tabela 13 mostra estes resultados.

Tabela 13 – Pureza Radioquímica do Produto Liofilizado

Tempo (minutos)	% Produto (X ± D.P.)	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	% $^{99m}\text{TcO}_2$
10	97,61% ± 0,7	0,62%	1,77%
120	96,31% ± 1,0	0,60%	3,09%
240	92,85% ± 1,2	0,85%	6,30%
360	91,92% ± 1,5	1,83%	6,25%

X – Média; D.P. – Desvio Padrão

O rendimento radioquímico no período de seis horas foi dentro dos limites de aceitação (90%) e se apresentaram reprodutíveis como mostra os valores de desvio padrão.

Foi observado aumento progressivo na formação do colóide, $^{99m}\text{TcO}_2$ e de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre.

4.9.1 – Estabilidade Radioquímica

A estabilidade foi avaliada após o termino do primeiro e segundo meses de sua produção. Determinou-se a pureza radioquímica para certificação de que o produto permanecia em condições apropriadas de uso (Tabela 14).

Tabela 14 – Rendimento de Marcação do Produto Liofilizado

Tempo (minutos)	1º Mês (X ± D.P.)	2º Mês (X ± D.P.)
10	95,43% ± 0,3	96,34% ± 0,4
120	94,87% ± 0,2	93,42% ± 0,6
240	93,37% ± 0,1	92,53% ± 0,2
360	91,89% ± 0,4	91,44% ± 0,3

X – Média; D.P. – Desvio Padrão

Observa-se a estabilidade do kit durante os 2 meses mantendo-se constante seu rendimento radioquímico.

4.9.2 – Estabilidade Biológica

A estabilidade também foi avaliada para o kit liofilizado quanto ao seu perfil biológico para animais sadios e infectados. Os resultados, expressos em %D/g, estão nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 – Biodistribuição do Produto Liofilizado em Camundongos Sadios

ÓRGÃO	1º Mês % D/g (X ± D.P.)	2º Mês - % D/g (X ± D.P.)
FIGADO	3,87 ± 0,5	2,18 ± 0,4
RINS	6,10 ± 0,7	5,52 ± 1,1
OSSO	2,19 ± 0,3	2,35 ± 0,3
BAÇO	0,98 ± 1,01	0,64 ± 0,20
ESTOMAGO	1,52 ± 0,68	2,01 ± 1,66
INTESTINO	2,75 ± 0,34	1,64 ± 1,10
SANGUE	0,58 ± 0,21	0,34 ± 0,10

n = 6

Tabela 16 – Biodistribuição do Produto Liofilizado em Camundongos Infectados

ÓRGÃO	1º Mês % D/g (X ± D.P.)	2º Mês - % D/g (X ± D.P.)
FIGADO	3,81 ± 0,6	4,56 ± 1,0
RINS	6,37 ± 1,4	6,67 ± 1,4
OSSO	1,78 ± 0,8	2,72 ± 1,0
BAÇO	1,92 ± 0,4	1,15 ± 0,3
ESTOMAGO	1,19 ± 0,2	1,75 ± 0,6
INTESTINO	2,01 ± 0,9	2,94 ± 0,8
BEXIGA	60,97 ± 2,4	72,03 ± 11,7
SANGUE	0,83 ± 0,3	0,48 ± 0,2
PN	0,95 ± 0,5	1,02 ± 0,3
PI	1,90 ± 0,8	1,78 ± 0,3
PI/PN	2,0	1,7

n=6

A distribuição biológica em animais sadios permaneceu semelhante ao longo dos dois meses avaliados. Para os animais infectados a relação PI/PN diminuiu ligeiramente, sem que haja uma justificativa óbvia para isto.

5 – DISCUSSÃO

5.1 - Formulações da Ciprofloxacina para Marcação com ^{99m}Tc e Rendimento de Marcação

A Tabela 17 resume alguns parâmetros de marcação da ciprofloxacina- ^{99m}Tc das cinco formulações encontradas na literatura e comentadas no decorrer do trabalho.

Tabela 17 – Formulações para Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

Referência	Massa Cipro (mg)	Ag. Red./ Massa(μg)	Atividade (MBq)	% Produto	Impureza	Estabil (h)	Tempo Reação (min)
1, 7, 12, 13	2	FSA*/400	400	95-98	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	8	10
14-20	2	Tart. Sn**/ 500	400	89-96	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	8	5-15
21	3,8	Clor. Sn***/390	555	>90	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$	4	20
22	1	Clor. Sn/200	1850	>95	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$	-	10
23	2	Polímero/ 5000	25	>95	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$	8	20-30

* FSA – ácido sulfônicoformamidina; ** Tart. Sn – tartarato estanoso;

*** Clor. Sn – cloreto estanoso

O primeiro kit preparado (1, 7, 12, 13) utilizava FSA como agente redutor para marcação da ciprofloxacina com $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Quando utilizado para esta finalidade, é necessário o aquecimento dos reagentes a 100 °C por 10 minutos. O FSA é um composto orgânico que compete com o ligante adicionado resultando na formação de mais de um complexo. Pelo aquecimento pode haver decomposição do FSA, originando compostos que também podem ser marcados com ^{99m}Tc

derivando em um produto final de baixa pureza radioquímica, com a necessidade de purificação do mesmo em coluna Sephadex⁽²⁴⁾.

Etapas adicionais de manipulação acabam por inviabilizar a preparação de um radiofármaco para pronta marcação com ^{99m}Tc onde, o ideal é que o médico somente tenha que inserir a solução com o radioisótopo, aguardar o tempo necessário para a reação de complexação e, retirar a dose para administração ao paciente. Maiores procedimentos mesmo que simples, requerem um tempo adicional e uma infra-estrutura adequada de laboratório.

Esta formulação foi modificada pela substituição do FSA por 500 µg de tartarato estanoso ⁽¹⁴⁻²⁰⁾ para eliminar a etapa de purificação do processo de marcação.

Os produtos feitos por Obradivic e col. ⁽²¹⁾ e por Pimerttis e col. ⁽²²⁾ utilizam cloreto estanoso (SnCl₂ · 2H₂O) para redução do ^{99m}TcO₄⁻.

A formulação de Obradivic e col. ⁽²¹⁾ é composta de 3,8 mg de ciprofloxacina, 390 µg de cloreto estanoso e 4,4 mg de cloreto de sódio. O pH deve ser elevado para 3,4 com solução tampão de ácido acético/acetato de sódio.

A formulação realizada por Pimerttis e col. ⁽²²⁾ contém 1 mg de ciprofloxacina, 200 µg de cloreto estanoso como agente redutor do ^{99m}TcO₄⁻, 1,5 mg de ácido ascórbico e 10 mg de manitol.

O kit feito na República Tcheca por Kleisner ⁽²³⁾ utiliza 500 mg de um polímero redutor com ácido iminodiacético, em matriz de dextran, que deve permanecer em reação por 10 horas com a solução contendo ciprofloxacina, seguido de uma etapa de purificação.

Os resultados de rendimento de marcação que constam na literatura estão na faixa de 89-98%, com agentes redutores diferenciados, entretanto requerendo

manipulações adicionais.

As preparações do presente trabalho foram desenvolvidas desde o início utilizando cloreto estanoso como agente redutor do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, pela fácil disponibilidade e, principalmente, por não necessitar de fases adicionais no procedimento de marcação, como a etapa de purificação ou ajustes de pH do produto final.

No início do estudo somente a Preparação 1 foi realizada. Quando estavam sendo realizados os ensaios de otimização observou-se uma queda significativa nos rendimentos de marcação para atividades superiores a 1850 MBq, mesmo utilizando concentrações mais altas de cloreto estanoso. Desta maneira, procedeu-se a Preparação 2.

Os resultados de rendimento obtidos foram semelhantes aos da literatura, como apresentado na Tabela 17 e com a vantagem de terem sido obtidos a partir de uma massa de agente redutor 7-13 vezes menor.

5.2 - Definição do Sistema Cromatográfico Seletivo para Avaliação do Rendimento de Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

O extenso uso de radiofármacos de ^{99m}Tc requer técnicas que determinem sua pureza radioquímica de maneira rápida e eficiente. É importante que um radiofármaco possua este atributo para que as impurezas não denigrem os perfis de imagens cintilográficas com um radiodiagnóstico distorcido. Isto levaria a um novo exame com dose de radiação desnecessária ao paciente ⁽²⁸⁾. O método mais utilizado para este fim é a Cromatografia Ascendente em Papel e em Camada Delgada.

A cromatografia é um método físico-químico de separação de

componentes de uma mistura através da capacidade de migração destes componentes entre duas fases que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um deles seja retido seletivamente pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais ⁽²⁹⁾.

A unidade utilizada para configurar o padrão de migração é o R_f que pode ser descrito na Equação 3:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância de interesse}}{\text{distância percorrida pela frente da fase móvel}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em Cromatografia Ascendente em Papel ou Camada Delgada, para a maioria dos sistemas empregados para radiofármacos de ^{99m}Tc , o R_f da impureza $^{99m}\text{TcO}_2$ na forma coloidal, é 0,0 e para o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é 1,0 ⁽³¹⁾. Para a separação das impurezas por cromatografia às vezes é necessário usar um sistema de solventes quando o R_f de uma das impurezas coincide com o R_f do produto. Normalmente utiliza-se um solvente orgânico e outro inorgânico ou uma mistura de ambos.

Os diversos sistemas cromatográficos foram estudados não apenas para obtenção do melhor perfil cromatográfico em termos de definição de desenvolvimento (arraste), mas devido à dificuldade de encontrar um sistema capaz de deslocar o produto do ponto de aplicação de maneira a separá-lo da impureza coloidal $^{99m}\text{TcO}_2$.

O Infecton é um produto muito utilizado comercialmente, mas a pureza do produto de sua formulação está baseada somente na avaliação da quantidade de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (14-20).

Obradivic e col. (21), Pimerttis e col. (22) e Kleisner e col. (23) utilizaram sistemas cromatográficos para determinação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ presentes na marcação da ciprofloxacina- ^{99m}Tc .

A quantificação do $^{99m}\text{TcO}_2$ é importante pois a sua presença em alto valor, tende a ser captado pelo fígado, podendo resultar em um diagnóstico de baixa especificidade.

Neste estudo foi possível a quantificação das impurezas presentes na marcação da ciprofloxacina segundo as preparações 1 e 2. Selecionaram-se sistemas cromatográficos capazes de mover a ciprofloxacina- ^{99m}Tc da linha de origem da fita, distanciando da fração do $^{99m}\text{TcO}_2$, portanto definindo o valor real do composto radiomarcado.

5.3 - Otimização da Marcação da Ciprofloxacina com ^{99m}Tc

A otimização das marcações é realizada para que se possa obter um produto com o melhor rendimento possível nas condições de reação mais adequadas.

Quando o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é eluído, está disponível com número de oxidação 7+. Quimicamente, neste estado de oxidação o tecnécio não é capaz de complexar diretamente seus ligantes, sendo necessária sua redução. O agente redutor mais utilizado é o cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (31).

No preparo de um radiofármaco de tecnécio a quantidade de pertecnetato livre deve permanecer em limites aceitáveis. A quantidade de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

presente em uma marcação com ^{99m}Tc deve ser suficiente para que todo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ seja reduzido e complexado, não se apresentando na forma de impureza livre ⁽²⁸⁾.

A presença de oxigênio pode levar a oxidação do íon estanoso de maneira que a sua quantidade para redução do Tc^{+7} diminui, levando ao aumento de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre. Além disso, altas atividades $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na presença de oxigênio podem causar radiólise da água ou de outros compostos como hidróxidos e peróxidos, aumentando a probabilidade de impurezas ⁽²⁸⁾.

Se em excesso, o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ reduzirá uma parcela do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ao estado 4+ para formação do complexo, porém, o restante poderá formar a espécie coloidal $^{99m}\text{TcO}_2$ ⁽²⁸⁾.

Biologicamente, o $^{99m}\text{TcO}_2$ é captado pelo fígado e o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pela tireóide e pelo estômago, sendo que a presença dos mesmos em quantidades indesejáveis resulta na obtenção de uma imagem de resolução cintilográfica pobre, podendo prejudicar a avaliação correta do diagnóstico.

A quantidade de cloreto estanoso diidratado também deve ser a menor possível já que o mesmo é tóxico em grandes proporções ⁽³²⁾.

Um segundo parâmetro importante de avaliação, é a atividade máxima com que se consegue marcar um produto. Os reagentes liofilizados são enviados às clínicas de diagnóstico somente para adição do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluído do gerador. Estes são preparados para o exame de 4-5 pacientes, e dependendo da enfermidade, idade e sexo, o médico determina a dose de radioatividade a ser injetada. Os kits são confeccionados para a utilização máxima de 3700 MBq (100 mCi) em um volume médio de 3 mL.

Na literatura, as atividades de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ utilizadas para as preparações são tipicamente baixas, com exceção da realizada por Pimerttis e col. ⁽²²⁾, na Grécia, com 1850 de MBq.

Nas formulações desenvolvidas nesse trabalho, a massa de 30 μg de agente redutor mostrou-se suficiente para a redução do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com bons rendimentos mesmo para altas atividades.

O desempenho do produto de Pirmettis e col. ⁽²²⁾ em comparação com os resultados da preparação 1, poderiam ser interpretados como superiores. Porém, a massa de cloreto estânico utilizada foi de 200 μg , 7 vezes maior que a utilizada neste trabalho.

Nas preparações 1 e 2 otimizadas, os valores de $^{99m}\text{TcO}_2$ não excederam 2,83% e os de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 2,86%.

5.4 - Tempo de Reação da Marcação da Ciprofloxacina- ^{99m}Tc

As cinco formulações apresentadas na Tabela 17 descrevem tempos de reação que variam entre 5 e 30 minutos. Para as formulações deste trabalho estabeleceu-se 10 minutos, de acordo com o que já se tem proposto comercialmente ⁽¹⁴⁻²⁰⁾ e experimentalmente ^(7, 21-23).

Este tempo de reação demonstra uma grande vantagem para sua utilização em clínicas de radiodiagnóstico. A partir do kit liofilizado, o profissional adiciona $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e quase imediatamente pode administrá-lo ao paciente para realização de exames.

5.5 e 5.6 – Estabilidade Radioquímica da Marcação da Ciprofloxacina-^{99m}Tc e Adição de Solução de Ácido Ascórbico à Preparação 1

A meia-vida física do ^{99m}Tc é de 6 horas, sendo de interesse comercial que o radiofármaco seja estável pelo menos durante este período.

Deve-se levar em conta que, o ^{99m}Tc é facilmente reoxidável na presença do oxigênio do ar e, portanto, muitas vezes, após certo período ocorre um aumento da impureza de pertecnetato livre. Desta maneira, toda manipulação do preparo deve ser efetuada em ambiente nitrogenado.

Encontramos que a preparação 1 foi estável apenas pelo período de 1 hora e a preparação 2 por 6 horas.

Antioxidantes são substâncias utilizadas nos complexos marcados com ^{99m}Tc que contribuem para a estabilidade do produto. Estas substâncias competem com os sais estanosos na reação com o oxigênio. O ácido ascórbico (AA) é um dos agentes antioxidantes muito utilizados para este fim ⁽³³⁾.

Com adição de uma solução 0,145 M de AA à preparação 1, obteve-se um produto estável pelo período desejável de 6 horas com 1850 MBq de ^{99m}TcO₄⁻ (anteriormente otimizado como atividade máxima) e com 3700 MBq de ^{99m}TcO₄⁻, que mostrou-se viável somente para a preparação 2.

Desta maneira, as preparações de marcação da ciprofloxacina-^{99m}Tc propostas neste trabalho podem ser efetuadas com atividades de ^{99m}TcO₄⁻, duas vezes maior que o encontrado na literatura ⁽²²⁾.

5.7 – Estudos Biológicos

Mesmo com as características de massa de ligante, massa de agente redutor, pH, atividade máxima do radioisótopo, tempo de reação e estabilidade

definidos e otimizados, a análise da distribuição *in vivo* é um parâmetro paralelo de avaliação para a conclusão de um perfil apropriado para o radiofármaco.

É essencial conhecer a estabilidade do radiofármaco no organismo, seu mecanismo de acumulação e eliminação e, seu tempo de residência em órgãos alvos e não-alvos indicados em termos de porcentagem da dose administrada ou em relação à radioatividade concentrada no corpo inteiro.

Segundo a literatura, após a administração intravenosa, a ciprofloxacina marcada com ^{99m}Tc , é amplamente distribuída pelo corpo e excretada por via renal. A imagem realizada em pacientes sadios mostra alta captação nos rins, com excreção pelo sistema urinário, moderada captação pelo fígado e baço e, nenhuma captação pelos ossos, medula óssea ou outros tecidos moles. Imagens iniciais, em torno de 1 hora, mostram atividade acentuada no "pool" sangüíneo, que é reduzida em imagens mais tardias. Imagens em pacientes com suspeita de quadro infeccioso mostraram uma intensa captação nos sítios de infecção bacteriana (1, 12-19).

Estudos em animais (7, 20, 22, 23) mostram excreção renal, baixa captação pelo fígado, tecidos moles, coluna e ossos, depuração sanguínea rápida e captação pelos focos infecciosos para os animais portadores de infecção.

As imagens cintilográficas deste trabalho foram adquiridas com 4 horas após a administração da dose.

Para animais sadios e portadores de infecção, as preparações 1 e 2 otimizadas apresentaram padrão de imagens cintilográficas semelhantes ao da literatura (7, 20, 22, 23). A radioatividade encontrou-se distribuída em regiões de afinidade com uma quantidade elevada excretada pelo sistema urinário. Isto pode ser observado nas imagens cintilográficas apresentadas. Pôde-se observar

também, ausência de captação hepática, afinidade do produto pelo foco infeccioso e captação óssea para a preparação 2. Isto, provavelmente, devido a presença de complexos fosfonados que são facilmente marcados com $^{99m}\text{TcO}_4^-$, e exibem esta afinidade óssea.

Alguns autores que utilizaram o Infecton ⁽¹⁴⁻²⁰⁾ obtiveram imagens cintilográficas com alguma captação hepática. Isto pode ocorrer devido à presença de tecnécio como forma coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$), pois a massa de estanho utilizada foi elevada, e considerando a falta de disponibilidade de métodos cromatográficos apropriados para determinação prévia dos valores desta impureza.

Os dados de distribuição biológica para a Preparação 1 apresentados indicam homogeneidade no percentual de radioatividade localizada em cada órgão e tecidos indicando que a farmacologia do produto otimizado exibe características creditáveis de um bom radiofármaco.

Os baixos valores obtidos de %Dose/g para fígado, intestino e estômago são um forte indicativo da baixa concentração de impurezas e da estabilidade *in vivo* do complexo. Estes dados estão de acordo com os valores de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, obtidos por cromatografia, demonstrando uma vantagem sobre o produto comercial correntemente utilizado e de acordo com as outras formulações descritas.

As imagens cintilográficas da preparação 2 mostraram captação óssea confirmada pelo estudo invasivo com valores de 15,41% e 11,01% expressos em %Dose/g para animais sadios e infectados, nesta ordem. Estes valores são acentuados em relação à preparação 1. Ainda para esta formulação, a razão de

%Dose/g de tecido infectado em relação ao tecido normal, foi inferior à da primeira formulação.

Somente para os animais portadores de abscessos foi possível a determinação de %Dose/g para a bexiga, talvez consequência da lesão bacteriana. Para animais sadios não foi possível a obtenção deste valor, pois houve excreção da urina nas quatro horas de espera para o sacrifício.

Os dados de captação do radiofármaco na região lesionada revelam boa interação e tempo de retenção suficiente para a análise do local.

A reprodutibilidade dos dados de pureza radioquímica e de biodistribuição apresentados por dois meses são um ótimo referencial para o produto otimizado.

5.8 – Liofilização

Reagentes liofilizados para pronta marcação com ^{99m}Tc , devem ser de formulação e reconstituição simples, preferentemente exigindo somente a adição da solução de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$.

O Infecton ⁽¹⁴⁻²⁰⁾ comercializado é um kit manufaturado composto por dois frascos. O frasco 1 contendo 2 mg de ciprofloxacina e o frasco 2, 500 µg de tartarato estanoso. O conteúdo do frasco 2 é dissolvido em 1 ml de cloreto de sódio 0,9% e adicionado ao conteúdo do frasco 1 seguido da adição de 370-400 MBq de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$.

Os produtos propostos por Obradivic e col. ⁽²¹⁾, Pimerttis e col. ⁽²²⁾ e Kleisner e col. ⁽²³⁾, são compostos de um único frasco e reconstituídos com solução de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, mas foram desenvolvidos, como o Infecton, para aplicação única.

Para radiofármacos de ^{99m}Tc é interessante a utilização do kit para mais de um paciente contribuindo para diminuição de custos.

Após os estudos que foram realizados com as duas formulações, a segunda forneceu dados comprometedores para o seu uso. Acentuada captação óssea e baixa relação PI/PN, resultaram no abandono aos estudos desta formulação, com a liofilização da Preparação 1.

O produto foi avaliado por dois meses baseado no controle de pureza radioquímica e do perfil de biodistribuição. Observou-se uma ligeira queda quanto à estabilidade radioquímica para o período de 6 horas com aumento na quantidade de colóide. Normalmente os kits são administrados aos pacientes logo após o seu preparo ou no intervalo máximo de 1 hora. De qualquer maneira, se necessária a administração com 6 horas de preparo, os resultados de rendimento radioquímico estariam dentro dos limites de aceitabilidade (90%).

Na avaliação biológica não foi observado aumento de captação hepática que seria atribuída a este aumento da espécie coloidal. Isto ocorreu porque o produto foi administrado nos animais com um máximo de 30 minutos após o seu preparo.

É desejável a avaliação de estabilidade por um período de 6 meses, o que não foi possível por dificuldades técnicas encontradas para a experimentação com animais infectados.

Os produtos propostos por Obradivic e col. ⁽²¹⁾, Pimerttis e col. ⁽²²⁾ e Kleisner e col. ⁽²³⁾ foram estáveis de 4 a 6 meses, sendo que o produto de Kleisner não foi liofilizado mas armazenado a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Alguns autores relatam captação da ciprofloxacina- ^{99m}Tc em locais de inflamação estéril ^(7, 19, 20, 21, 22). Não foi objetivo deste trabalho a análise deste

fator, uma vez que a falta de disponibilidade e infra-estrutura dificulta a realização deste estudo de diferenciação.

6 – CONCLUSÕES

- 1) Os estudos realizados com a preparação 2, contendo solução tampão fosfato 0,02M, apresentaram bons rendimentos de marcação. Porém, para os estudos de biodistribuição, mostrou alta captação óssea e baixa captação pelo foco infeccioso induzido o que levou ao abandono desta formulação
- 2) Propôs-se uma formulação do kit de ciprofloxacina para marcação com ^{99m}Tc , contendo 2 mg de ciprofloxacina, 30 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de ácido ascórbico, por frasco.
- 3) A adição de ácido ascórbico é essencial para a estabilidade radioquímica e utilização para atividades até 3700 MBq.
- 4) A marcação/reconstituição do produto liofilizado foi simples e reprodutível, com a adição apenas da solução de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ e tempo de reação de 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 5) O produto demonstrou estabilidade radioquímica por um período de 6 horas e estabilidade de prateleira nos dois meses subsequentes de estudo, devendo-se estender este estudo até seis meses após a produção por ser o período de validade dos reagentes liofilizados.
- 6) A captação do produto marcado pelo foco infeccioso foi 2,4 superior ao tecido normal, com uma ligeira queda no valor quando o produto foi liofilizado.
- 7) A ciprofloxacina é um antibiótico de fácil aquisição e suscetível de marcação eficiente com ^{99m}Tc . Nas condições estudadas, demonstrou valor potencial como radiofármaco para diagnósticos por imagem de quadros de infecção.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Britton, K. E.; Vinjamuri, S.; Hall, A. V.; Solanki, K.; Siraj, Q. H.; Bomanji, J.; Das, S. S. Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the localization of bacterial infection. *Eur. J. Med.*, v. 24, p. 553-556, 1997.
2. Weiner, R. E.; Thakur, M. L. Imaging infection/inflammations - pathophysiologic basis and radiopharmaceuticals. *Q. J. Nucl. Med*, v. 13, p. 2-8, 1999.
3. Korolkovas, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 1995/1996 ed. São Paulo, S. P.: Guanabara Koogan, 1995/1996, capítulo 18.36.
4. Zanini, A. C., Oga, S. **Farmacologia Aplicada**. 3. ed. São Paulo, S. P.: Atheneu Editora, 1985, p. 519-520.
5. São Paulo (Estado). Farmácia Médica: Antibióticos.
Disponível em:
<http://geocities.yahoo.com.br/cyjr2000/atbhome.htm>, Acesso em 7 out. 2003.
6. Bayer Brasil. Ciprofloxacina Oral: antibiotico de amplo espectro. Catalogo, 1986.
7. Gano, L.; Patricio, L.; Cantinho, G.; Pena, H.; Marques, E. Ciprofloxacina in imaging of infective versus sterile inflammation. *International Symposium on Moders Trends in Radiopharmaceuticals fou Diagnosis and Therapy*, IAEA – SM 355/42, Lisboa, Portugal, 1998.
8. Chianelli, M.; Mather, S. J.; Martin-Comin, J.; Signore, A.
Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: a review. *Nucl. Med. Com.*, v. 18, p. 437-455, 1997.
9. Rennen H. J. J. M.; Corstens F. H. M.; Oyen W. J. G.; Boerman O. C. New concepts in inflammation/infection imaging. *Q. J. Nucl. Med.*, v. 45, p. 167-73, 2001.
10. Mountford P. J.; Coakley A. J. **Nuclear medicine in Clinical Diagnosis and Treatment**, 2. ed., London, U. K.: Churchill Livingstone, 1998, v. 1, p. 145-153.

11. Rennen H. J. J. M.; Boerman O. C.; Oyen W. J. G.; Corstens F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001.
12. Vinjamuri, S.; Hall, A. V.; Solanki, K.; Bomanji, J.; Siraj, Q. H.; O'Shaughnessy, E.; Das, S. S.; Britton, K. E. Comparison of ^{99m}Tc -Infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet*, v. 347, p. 233-235, 1996.
13. Hall, A. V.; Solanki, K.; Vinjamuri, S.; Britton, K. E.; Das, S. S. Evaluation of the efficacy of ^{99m}Tc - Infecton, novel agent for detecting sites of infection. *J. Clin. Pathol.*, v. 51, p. 215-219, 1998.
14. De Winter F.; Van de Wiele C.; Dumont F.; Van Durme J.; Solanki K.; Britton K.; Slegers G.; Dierckx R. A.; Thierens H. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -ciprofloxacin, a promising agent for the diagnosis of bacterial infection. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 570-574, 2001.
15. Yapar Z.; Kibar M.; Yapar A. F.; Togrul E.; Kayaselçuk U.; Sarpel Y. The efficacy of technetium- ^{99m}Tc ciprofloxacin (Infecton) imaging in suspected orthopaedic infection: a comparison with sequential bone/gallium imaging. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 822-830, 2001.
16. Sonmezoglu K.; Sonmezoglu M.; Halac M.; Akgun I.; Turkmen C.; Onsel C. Kanmaz B.; Solanki K.; Britton K. E.; Uslu I. Usefulness of ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: comparative study with ^{99m}Tc -HMPAO Leukocyte Scintigraphy. *J. Nucl. Med.*, v. 42, p. 567-574, 2001.
17. Larikka M. J.; Ahonen A. K.; Niemela O.; Junila J. A.; Hamalainen M. M.; Britton K.; Syrjala H. P. ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. *Nucl. Med. Commun.*, v. 23, p. 167-170, 2002.
18. Larikka M. J.; Ahonen A. K.; Niemela O.; Junila J. A.; Hamalainen M. M.; Britton K.; Syrjala H. P. Comparison of ^{99m}Tc ciprofloxacin, ^{99m}Tc white blood cell and three-phase bone imaging in the diagnosis of hip prosthesis infections: improved diagnostic accuracy with extended imaging time. *Nucl. Med. Commun.*, v. 23, p. 655-661, 2002.

19. Dumarey N.; Blocklet D.; Appelboom T.; Tant L.; Schoutens A. Infection is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 530-535, 2002.
20. Sarda L.; Saleh-Mghir A.; Peker C.; Meulemans A.; Crémieux A.; Le Guludec D. Evaluation of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *J. Nucl. Med.*, v. 43, p. 239-245, 2002.
21. Obradovic V.; Artiko V.; Petrovic N.; Davidovic B.; Nikolic N.; Vucetic C.; Sobic-Saranovic D.; Ovic-Tirnanic M.; Vlajkovic M. Preliminary results of imaging orthopaedic infection with Tc-99m ciprofloxacin using a newly developed simple labeling kit. *World J. Nucl. Med.*, v. 2, p. 269-274, 2003.
22. Pirmettis I.; Limouris G. S.; Papadopoulos M.; Chiotellis E. Development of kit formulations for the preparation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin and ^{99m}Tc -norfloxacin. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 26, p. 1108-1113, 1999.
23. Kleisner I.; Komarek P.; Komarkova I.; Konopkova M. A new technique of ^{99m}Tc -ciprofloxacin preparation. *Nuklearmedizin*, v. 41, p. 224-229, 2002.
24. Oh S. J.; Ryu J.; Shin J. W.; Yoon E. j.; Ha H.; Cheon J. H.; Lee H. K. Synthesis of ^{99m}Tc -ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 57, p. 193-200, 2002.
25. Reprier, C.; Segre E. Radioactive Isotopes of Element 43. *Nature*, v. 140, p. 193, 1937.
26. Saha, G. B. ***Fundamentals of Nuclear Pharmacy***, 4. ed., New York, N. Y.: Springer-Verlag, 1992, p. 98-109.
27. Ayrosa, A. M. I. B. ***Estudo dos parâmetros de liofilização e comportamento higroscópico de conjuntos de reativos para marcação com tecnécio-99m utilizados em medicina nuclear***. FAPESP, São Paulo, 2000, p. 5-24.
28. Faintuch, B. L. ***Estudo de marcação, biodistribuição e análise compartimental da n-acetil cisteína marcada com Tc-99m. Investigação comparativa com MIBI- ^{99m}Tc em modelo tumoral***. 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

29. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. ***Introdução a Métodos Cromatográficos***, 4. ed., Campinas, S. P.: Editora da UNICAMP, 2000, p. 13-33.
30. Supermodulyo 12K Freezer Dryer, Instruction Manual, 1994.
31. Robbins P. J. ***Chromatography of Technetium-99m Radiopharmaceuticals – A Practical Guide***, New York, N. Y.: The Society of Nuclear Medicine, INC., 1986.
32. Hung J. C., Ponto J. A., Hammes R. J. Radiopharmaceutical – related pitfalls and artifacts. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 26, p. 208-255, 1996.
33. Sampson C. B. *Textbook of Radiopharmacy – Theory and Practice*, Amsterdam, Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers, 1999, p. 39-41.