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

**ESTUDO PARA IMPLANTAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO
RADIOFÁRMACO FES-¹⁸F EM SISTEMA AUTOMATIZADO: ABORDAGEM DE
VALIDAÇÃO DE PROCESSO E DE MÉTODOS ANALÍTICOS.**

LUIZA MASCARENHAS BALIEIRO

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

Orientadora:
Profa. Dra. ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO

**São Paulo
2020**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de métodos analíticos.

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

LUIZA MASCARENHAS BALIEIRO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Prof^a. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

SÃO PAULO
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

BALIEIRO, Luiza. M. **Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de métodos analíticos.** 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em : <http://www.teses.usp.br>

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pela autora.

Balieiro, Luiza Mascarenhas

Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de métodos analíticos / Luiza Mascarenhas Balieiro. Orientadora Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araujo. São Paulo, 2020

120p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear. Área de concentração (Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo.

1. FES-¹⁸F. 2. Radiofármaco. 3. Síntese Automatizada

Folha de Aprovação

Autor: Luiza Mascarenhas Balieiro

Título: Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de métodos analíticos.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 31/07/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo.

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Maria Inês Calil Cury Guimaraes.

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Carolina Passarelli Gonçalves

Instituição: Universidade Anhanguera de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho ao meu marido Lucas, meus pais,
meus filhos, minha Hanna, meus sogros,
meus familiares, amigos e professores,
“in memoriam” de meu irmão e avós.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus e aos mentores espirituais que iluminaram essa trajetória e contribuem para o caminho diário.

Minha família, Lucas (meu marido), Eduardo e Élide (meus pais), Catharina e Luiz Thomaz (meus filhos) que acreditaram em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Ao companheirismo e conforto da minha pet, Hanna.

Meus sogros, parentes e familiares que contribuíram nesta conquista.

“In memoriam” de meu irmão e meus avós que acreditaram e com toda certeza estão vibrando comigo por esta etapa concluída.

Em especial a minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, um exemplo de profissional e pessoa, que admiro muito e agradeço pela confiança, pelos ensinamentos e pelas palavras de carinho e compreensão, sempre.

Dra Neuza Taeko O. Fukumori pela disponibilidade, paciência e recomendações realizadas no Seminário de Área.

Ao querido professor Dr. Henrique Barcellos de Oliveira, com quem criei um vínculo de amizade, muito obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas e compreensão.

À toda equipe da Dra Maria Helena Bellini do Centro de Biotecnologia.

Aos grupos de Moléculas Marcadas, Garantia e Controle de Qualidade e Aceleradores Cíclotron, do Centro de Radiofarmácia pela valiosa contribuição.

Aos queridos amigos que o IPEN me trouxe e que estão sempre ao meu lado, dentro e fora do IPEN; Efrain Perini Araújo, Vanessa Gomes Batista e Tânia Brambilla.

Ao nosso grupo da pós-graduação e as pessoas que me ajudaram na realização desse trabalho, Cristian, Carolina, Ana Claudia, Renata, Bianca, Rafael e Sofia Nascimento dos Santos, meu muito obrigada, a ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste projeto.

Meus amigos, Renata Grattão e Pedro Guillaumon que me socorreram em momentos cruciais.

Aos Membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao IPEN e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida (projeto 2018/13096-0).

RESUMO

Balieiro, Luiza M. **Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de métodos analíticos.** 2020. 120p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

O radiofármaco **16 α -[¹⁸F]-fluoro-17 β -estradiol (FES-¹⁸F)** é uma molécula lipofílica com características *in vivo* semelhantes ao estradiol e tem alta afinidade de ligação aos receptores de estrogênio (ER), que se encontram super expresso em 75% dos casos de câncer de mama. Esta afinidade faz com que seja um radiofármaco promissor para utilização, por método não-invasivo de tomografia de emissão de pósitrons (PET), para diagnóstico de câncer de mama ER+, avaliando o tamanho do tumor e sítios da doença, auxiliando no prognóstico do tratamento individualizado do paciente, bem como para verificar o câncer de mama recidivo e monitoramento da doença com o tratamento hormonal.

O processo de síntese do radiofármaco FES-¹⁸F iniciou-se com a obtenção do radionuclídeo flúor-18, na forma ionizada (¹⁸F⁻), em acelerador ciclotron e a síntese automatizada ocorreu em módulo GE TRACERLab MX® por reação de substituição nucleofílica, envolvendo a fluoração [¹⁸F] do precursor, hidrólise dos grupos de proteção e pôr fim a purificação em cartuchos compactados. O rendimento radioquímico foi reprodutivo, independente da atividade de flúor-18 na entrada no módulo e está de acordo a literatura encontrada.

No caso particular de radiofármacos e, em específico, do FES-¹⁸F, não existem metodologias descritas para validação dos processos produtivos e das metodologias analíticas. A ferramenta FMEA foi empregada para análise de risco do processo produtivo e guias da Anvisa e do IMNETRO foram considerados para validação de metodologia analítica.

Os estudos de controle de qualidade compreenderam as análises de determinação da Pureza Radionuclídica e Pureza Radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia a líquido de alta

eficiência (CLAE), identidade radionuclídica, detecção do TBA-HCO₃ como impureza, determinação de solvente residual (acetonitrila e etanol), pH, determinação de endotoxinas bacterianas (pirogênios) e teste de esterilidade.

Com rendimento radioquímico reprodutivo, os lotes de FES-¹⁸F produzidos apresentaram alta Pureza Radionuclídica e radioquímica, bem como atenderam a todos os critérios de aceitação dos ensaios realizados para liberação de lotes. O produto mostrou-se estável por até 6 horas após a síntese. As metodologias analíticas testadas mostraram-se adequadas para o uso e a metodologia analítica para análise da porcentagem de Pureza Radioquímica foi validada.

Nos estudos *in vivo*, avaliou-se a biodistribuição em animais saudáveis e em animais com modelo tumoral desenvolvido com células MCF-7 e os estudos apresentaram resultados compatíveis com a literatura consultada, observando-se captação do FES-¹⁸F nos órgãos com receptores de estrogênio, tumor e significativa captação no fígado e intestinos, possivelmente relacionada à excreção preferencial pela via intestinal, com perfil metabólico semelhante ao estradiol.

Os resultados deste trabalho serão utilizados para implantação da produção e controle de qualidade rotineiros do radiofármaco FES-¹⁸F no Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN, bem como no processo de registro deste radiofármaco junto à ANVISA.

ABSTRACT

Balieiro, Luiza M. **Study for implementation of the production process of the radiopharmaceutical FES-¹⁸F in an automated system: approach to process validation and analytical methods.** 2020. 120p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

The radiopharmaceutical 16 α -[18F]-fluoro-17 β -estradiol (FES-¹⁸F) is a lipophilic molecule with *in vivo* characteristics similar to estradiol and has a high affinity of binding to estrogen receptors (ER), which are over expressed in 75 % of breast cancer cases. This affinity makes it a promising radiopharmaceutical for use, by a non-invasive method of positron emission tomography (PET), for the diagnosis of ER+ breast cancer, evaluating the size of the tumor, sites of the disease, aiding in the prognosis of individualized treatment of the patient, which can also be used to check for recurrent breast cancer and to monitor the disease with hormonal treatment.

The synthesis process of the radiopharmaceutical FES-¹⁸F started with the obtaining of the fluorine-18 radionuclide, in ionized form (¹⁸F⁻), in a cyclotron accelerator and the automated synthesis occurred in the GE TRACERLab MX® module by nucleophilic substitution reaction, of the precursor, hydrolysis of the protection groups and finally the purification in compacted cartridges. The radiochemical performance was reproducible, regardless of the fluorine-18 activity at the entrance to the module and is in accordance with the literature.

In the case of radiopharmaceuticals and, in particular, the FES-¹⁸F, there are no methodologies described for validating production processes and analytical methodologies. The FMEA tool was used for risk analysis of the production process and guides from Anvisa and IMNETRO were applied to validate the analytical methodology.

The quality control studies included the analysis of radionuclide purity, radiochemical purity by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), radionuclide identity, detection of TBA-HCO₃ as impurity, solvent determination residual (acetonitrile and ethanol), pH,

determination of bacterial endotoxins (pyrogens) and sterility test. With reproductive radiochemical yield, the batches of FES- ^{18}F produced showed high radionuclide and radiochemical purity, as well as meeting all acceptance criteria of the tests performed for batch release. The product was stable for up to 6 hours after synthesis. The analytical methodologies tested proved to be suitable for use and the analytical methodology for radiochemical purity was validated.

In *in vivo* studies, biodistribution was evaluated in healthy animals and in animals with a tumor model developed with MCF-7 cells and the studies showed results compatible with the literature consulted, observing FES- ^{18}F uptake in the organs with estrogen receptors, tumor and significant uptake in the liver and intestines, possibly related to preferential excretion via the intestinal tract, with a similar metabolic profile to estradiol.

The results of this work will be useful to implement the routine production and quality control of the radiopharmaceutical FES- ^{18}F at Radiopharmacy Center of IPEN-CNEN, as well as in the registration process of this radiopharmaceutical with ANVISA.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
1.....	19
INTRODUÇÃO	19
2.....	23
OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos Gerais	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Medicina Nuclear e PET/CT	24
3.2 Câncer de Mama	28
3.3 Obtenção do Flúor e marcação do FES-¹⁸F	34
3.4 Validação do processo de síntese e metodologia analítica	35
4	38
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5	39
MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Infraestrutura	39
5.2 Materiais	39
5.2.1 Reagentes, acessórios e soluções	39
5.2.2 Equipamentos	40
5.2.3 Outros.....	40
5.3 Métodos	41
5.3.1 Análise de Risco – FMEA.....	41
5.3.2 Obtenção do flúor-18	43
5.3.3 Síntese do FES- ¹⁸ F	43
5.3.4 Controle de Qualidade.....	47
5.3.4.1 Determinação de identidade radionuclídica	47
5.3.4.2 Determinação de Pureza Radionuclídica	47
5.3.4.3 Descrição do produto	48

5.3.4.4	Determinação de Pureza Radioquímica por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	48
5.3.4.5	Determinação de Pureza Radioquímica por Cromatografia em Camada Delgada.....	48
5.3.4.6	Determinação de impureza química – TBAHCO ₃	49
5.3.4.7	Determinação de Solventes residuais (acetonitrila e etanol)	49
5.3.4.8	Determinação de Endotoxinas Bacterianas	50
5.3.4.9	Determinação do pH do produto final.....	51
5.3.4.10	Ensaio de Esterilidade do produto final.....	51
5.3.5	Estudo de Estabilidade	51
5.3.6	Validação do método analítico de determinação de Pureza Radioquímica do FES- ¹⁸ F	52
5.3.7	Estudos Pré-Clínicos.....	56
6		61
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		61
6.1	Análise do Processo de Produção utilizando o FMEA.....	61
6.2	Obtenção do Flúor	64
6.3	Síntese Automatizada de FES-¹⁸F	64
6.4	Controle de Qualidade	69
6.4.1	Avaliação da metodologia empregada no ensaio de controle de Pureza Radioquímica CCD-SG e CLAE.....	69
6.4.2	Ensaio de identificação radionuclídica	76
6.4.3	Ensaio de Pureza Radionuclídica	78
6.4.4	Avaliação da metodologia empregada no ensaio de análise química do TBA-HCO ₃	80
6.4.5	Estudo de estabilidade do radiofármaco FES- ¹⁸ F	85
6.5	Validação do Método Analítico de Determinação de Pureza Radioquímica do FES-¹⁸F	86
6.5.1	Precisão – Repetibilidade.....	86
6.5.2	Precisão – Precisão Intermediária.....	87
6.5.3	Seletividade	89
6.5.4	Linearidade.....	92
6.5.5	Intervalo/Faixa de trabalho.....	96
6.5.6	Robustez	97
6.6	Estudo de Biodistribuição em Animais Sadios.....	99
6.7	Estudo de Biodistribuição em Animais com Desenvolvimento Tumoral	

6.8	Desenvolvimento das Células de Adenocarcinoma Mamário Humano MCF-7	106
6.9	Histopatologia dos Tumores	107
6.10	Estudo da Imagem micro PET/CT	110
7		112
	Conclusão	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	BIPM, Table of Radionuclides, Monographie BIPM-5, ISBN: 92-822-2207-7	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de fabricação

BRCA – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CIS - carcinoma *in situ*

CDIS - carcinoma ductal *in situ*

EP – Receptor de progesterona

ER – Receptor de estrógeno

FB – Farmacopeia Brasileira

FE – Farmacopeia Europeia

FDG-¹⁸F – Radiofármaco fludesoxiglicose-¹⁸F

FES-¹⁸F - Radiofármaco fluorestradiol-¹⁸F

HER - *Human Epidermal growth factor Receptor-type*

IHC – imunohistoquímica

IN - Instrução Normativa

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LCIS - carcinoma lobular *in situ*

MCF 7 - *Michigan Cancer Foundation-7*

NaF – Fluoreto de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

P53 – proteína 53

PET - Tomografia por Emissão de Pósitrons

PET/CT - Tomografia por Emissão de Pósitrons associada tomografia computadorizada

PIC/s - *Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme*

PR – Receptor de Progesterona

PSMA - Antígeno de membrana específico da próstata

RDC – Resolução da diretoria colegiada

SNC – Sistema Nervoso Central

SPECT - Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único

SUV - *Standard Uptake Value* (valor de captação padrão)

TNM – Tumor, linfonodo, metástase

USP – *United States Pharmacopeia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo do exame de PET ou PET/CT	26
Figura 2- Esquema do decaimento do Flúor 18	27
Figura 3 - Estrutura dos Receptores de estrógeno.....	31
Figura 4 - Esquema químico de produção do FES- ¹⁸ F.	35
Figura 5 - Esquema do delineamento experimental adotado.....	38
Figura 6 - Esquema de montagem do Kit para síntese do FES- ¹⁸ F no módulo GE TRACERlab™ MXFDG.....	44
Figura 7 - Esquema do processo de produção do FES- ¹⁸ F no módulo GE TRACERlab™ MXFDG.	46
Figura 8 - Cassete de FES- ¹⁸ F para montagem no módulo de síntese TracerLab MX®FDG - GE.	66
Figura 9 - Conteúdo do Kit para montagem do módulo de síntese TracerLab MX®FDG GE FES- ¹⁸ F	66
Figura 10 - Kit e cassete de FES- ¹⁸ F montados no módulo TracerLab MX®FDG GE.	67
Figura 11 - Cromatograma da CCD-SG do ¹⁸ F-, representativo para todas as fases móveis utilizadas. Rf=0,1	70
Figura 12 - Cromatograma TLS-Scan utilizando CCD-SG do ¹⁸ F-, representativo para todas as fases móveis utilizadas. Rf=0,1	70
Figura 13 -Perfil cromatográfico do FES- ¹⁸ F em CCD-SG com a fase móvel acetonitrila 95%; Rf= 0,9 – 1,0.....	71
Figura 14 - Perfil cromatográfico do FES- ¹⁸ F em CCD-SG com a fase móvel etanol/metanol 1:1 v/v; Rf= 0,9 – 1,0.....	72
Figura 15 - Perfil cromatográfico do FES- ¹⁸ F em CCD-SG com a fase móvel metanol:amônia 95:5; Rf= 0,6 – 1,0	72
Figura 16 - Cromatograma TLS-Scan do FES- ¹⁸ F, utilizando acetonitrila:água 95% como fase móvel. Rf=0,9 – 1,0.....	73
Figura 17 - Perfil cromatográfico do FES- ¹⁸ F em CLAE, utilizando-se coluna de fase reversa C ₁₈ e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1mL/min por 30 minutos.....	74
Figura 18- Perfil cromatográfico do [¹⁸ F] em CLAE utilizando-se coluna de fase reversa C ₁₈ e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1 mL /min por 30 minutos.....	74
Figura 19 - Perfil da identidade radionuclídica do fluor-18	77
Figura 20 - Perfil da análise do FES- ¹⁸ F em HPGe ~ 9horas após a síntese.....	78
Figura 21- Perfil da análise da água irradiada ([¹⁸ F] H ₂ F+) apresentado em preto e do radiofármaco FES- ¹⁸ F, apresentado em verde em HPGe.	79
Figura 22– (A) Perfil cromatográfico do TBA-HCO ₃ e (B) Teste da mancha do TBA- HCO ₃ , ambos com 2,6 mg/V para diferentes volumes aplicados (2, 5 e 10 µL)	82
Figura 23 - (A) - Perfil cromatográfico do TBA-HCO ₃ e (B) – Teste da mancha do TBA- HCO ₃ , ambos com volume de 5 µL e concentrações de 0,454 mg/mL (PN), 0,0998 mg/mL (PP) e 2,6 mg/mL (PF)	83
Figura 24 - (A) - Perfil cromatográfico do TBA-HCO ₃ e (B) – Teste da mancha do TBA- HCO ₃ , ambos com volume de 5 µL para o padrão, amostra e controle negativo e concentração de 2,6 mg/ mL para o padrão.	84
Figura 25 -Resultado do estudo de estabilidade do radiofármaco FES- ¹⁸ F.....	86

Figura 26– Representação do efeito das análises de precisão intermediária no produto.	88
Figura 27– Testes 1, 4 e 6 de seletividade do radiofármaco FES- ¹⁸ F	90
Figura 28 – Teste 3 de seletividade com o radiofármaco FES- ¹⁸ F e a impureza radioativa Fluoreto ([¹⁸ F] H ₂ F+)	91
Figura 29 – Testes 2, 5 e 7 de seletividade com o Fluoreto ([¹⁸ F] H ₂ F+)	91
Figura 30 – Representação visual da linearidade do método.	93
Figura 31 – Representação visual do parâmetro de linearidade.	96
Figura 32 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ¹⁸ F por grama (%AI/g) de cada órgão/tecido e mL de sangue, em camundongos BALB-c saudáveis, nos diferentes tempos após a administração.	101
Figura 33 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ¹⁸ F por tecido/órgão (%AI) em camundongos BALB-c saudáveis, nos diferentes tempos após a administração.	101
Figura 34 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ¹⁸ F por grama (%AI/g) de cada órgão em camundongos SCID com tumor nos diferentes tempos após a administração.	104
Figura 35 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ¹⁸ F por tecido/órgão (%AI) em camundongos SCID com tumor nos diferentes tempos após a administração.	104
Figura 36 - Células MCF-7 no aumento de 20x Microscópio Invertido Nikon Eclipse TS100. As setas mostram as estruturas de cúpula e os círculos apresentam os grupos de ligação celular.	107
Figura 37 – Tumores de Células MCF-7 no aumento de 2x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan) obtidos nos tempos 30 (A), 60 (B), 60 com bloqueio (C) e 120 (D) minutos.	108
Figura 38 – Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), as setas indicam locais de fibra muscular intermediando o nódulo.	109
Figura 39 – Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), os asteriscos indicam locais de necrose tecidual, observa-se intensa área acidófila, disforme e sem estrutura celular.	109
Figura 40 - Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), os sinais de “mais” indicam locais de vascularização, indicando a nutrição celular.	110
Figura 41 - Imagem decúbito ventral, longitudinal de micro-PET / CT de camundongo SCID fêmea com adenocarcinoma de mama (MCF-7), após administração do radiofármaco FES - ¹⁸ F. (A) representa a fusão das técnicas PET e CT delimitando em vermelho a área do VOI. (B) representa a imagem PET, acumulativa de 60 minutos a seta indica a localização do tumor.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição do Índice de Severidade do Processo.....	41
Tabela 2- Índice da Probabilidade de Ocorrência da Falha no Processo	42
Tabela 3 - Índice da Probabilidade de Detecção da Falha no Processo.....	42
Tabela 4- Classificação e ação conforme o Número de Prioridade de Risco	43
Tabela 5 - Fator de retenção para as espécies radioquímicas.....	52
Tabela 6- Soluções Teste para os estudos de Seletividade	53
Tabela 7- Critérios de aceitação para os ensaios de seletividade.	54
Tabela 8- Concentrações radioativas do FES- ¹⁸ F para o estudo de linearidade.....	54
Tabela 9 - Combinação de variáveis para o ensaio de Robustez.	55
Tabela 10- Parte resumida no desenvolvimento de uma planilha FMEA.....	63
Tabela 11- Dados das irradiações realizadas no ciclotron de 18 MeV – IPEN.....	64
Tabela 12- Rendimento das sínteses de FES- ¹⁸ F no módulo TracerLab MX®FDG GE sem e com correção de decaimento	68
Tabela 13- Resultado da Pureza Radioquímica dos lotes produzidos de FES- ¹⁸ F	76
Tabela 14- Característica das impurezas radionuclídicas encontradas na água irradiada ([¹⁸ F] H ₂ F+) e a %.	80
Tabela 15- Média dos Parâmetros analisados no controle de qualidade do radiofármaco FES- ¹⁸ F (n=8) e o critério de aceitação.	85
Tabela 16- Resultado dos parâmetros de Rf e %Pureza Radioquímica para o analista 1 no estudo de Precisão – Repetibilidade do FES- ¹⁸ F	87
Tabela 17- Repetibilidade Analista 1.....	87
Tabela 18- Resultado dos parâmetros de % Pureza Radioquímica no estudo de Precisão – Precisão Intermediária do FES- ¹⁸ F.....	88
Tabela 19- Estudo da precisão Intermediária	89
Tabela 20- Resultado dos parâmetros de Rf no estudo de Seletividade do radiofármaco FES- ¹⁸ F.....	90
Tabela 21- CPM relativa a cada ponto do parâmetro de linearidade.	93
Tabela 22- Avaliação da Homocedasticidade: Teste de Cochran.....	94
Tabela 23- Método dos Mínimos Quadrados Ordinários: Estimação	94
Tabela 24- Análise dos resíduos.....	95
Tabela 25– Cálculos de Normalidade	95
Tabela 26- Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste	95
Tabela 27- Combinação fatorial para o plano de ensaio pelo teste de Youden.....	97
Tabela 28 - Resultado das porcentagens de Pureza Radioquímica obtidas a partir da combinação de ensaio pelo teste de Youden.....	98
Tabela 29- Resultados do teste de Youden.....	98
Tabela 30- Média e desvio padrão dos resultados % Atividade injetada por grama de órgão/tecido ou mL de sangue (%AI/g ou mL) obtidos na biodistribuição em animais saudáveis utilizando o radiofármaco FES- ¹⁸ F	100
Tabela 31- Média e desvio padrão dos resultados % Atividade injetada por grama de órgão/tecido ou mL de sangue (%AI/g ou mL) obtidos na biodistribuição em animais com tumor utilizando o radiofármaco FES- ¹⁸ F	103
Tabela 32- Relação tumor/músculo e tumor/sangue do radiofármaco FES- ¹⁸ F.....	106
Tabela 33 - Média da % de captação total nos músculos por tempo no ensaio de biodistribuição de animal com tumor.....	106

1

INTRODUÇÃO

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que emprega materiais radioativos (radiofármacos) com finalidades diagnóstica e terapêutica (JUNIOR et al., 2018).

Os principais métodos de imagem utilizados em Medicina Nuclear são a cintilografia planar e Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT), que utilizam radiofármacos produzidos com radioisótopos emissores gama e a Tomografia por Emissão de Pósitrons, associada ou não à tomografia computadorizada (PET ou PET/CT) que utilizam radiofármacos preparados com radionuclídeos emissores de pósitron. (ROBILOTTA, 2006)

A imagem PET (*“Positron Emission Tomography”*) é obtida pela reação de aniquilação de um pósitron e um elétron, e posterior emissão de dois fótons de 511 KeV à $180 \pm 0,5^\circ$ (RAMOS et al., 2011)

O desenvolvimento de radiofármacos para aplicação em PET representa uma importante linha de investigação. O radiofármaco FDG- ^{18}F (fludesoxiglicose- ^{18}F) é atualmente o mais utilizado em PET-CT, (LIAO et al., 2016) sendo um marcador tumoral não específico, já que o metabolismo de glicose encontra-se aumentado nas células tumorais em comparação com as células não tumorais. (JUNIOR et al., 2018)

Radiofármacos receptor-específicos vêm sendo utilizados em estudos clínicos para diagnóstico e terapia de diferentes tipos de câncer e são normalmente representados por peptídeos ou anticorpos monoclonais e seus fragmentos radiomarcados com radionuclídeos gama ou pósitron emissores (para diagnóstico) ou emissores de radiação beta menos ou alfa (para aplicação em terapia). Exemplo atual deste tipo de abordagem é a utilização de peptídeos receptor-específicos, dirigidos aos receptores PSMA, localizados nas células de tumor de próstata (LÜTJE et al., 2015). Da mesma forma, o

radiofármaco FES-¹⁸F, [¹⁸F] estradiol, se liga a receptores de estrogênio, sendo utilizado no diagnóstico do câncer de mama (PETERSON et al., 2008)

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 2020 demonstram que aproximadamente 75% (setenta e cinco por cento) dos casos de câncer de mama apresentam receptor de estrógeno (ER+) e esse tipo de câncer apresenta uma incidência de crescimento de 25% (vinte e cinco por cento) ao ano, além de ser a segunda causa da morte por câncer entre mulheres no mundo (BENSCH et al., 2013; NIENHUIS et al., 2018). Atualmente, a técnica de rastreamento do câncer de mama considerada padrão ouro é a mamografia, porém, apresenta limitações, tendo em vista, não ser recomendada para mulheres com mamas densas, mulheres que passaram por tratamento de radioterapia e mulheres com próteses de silicone. Contribuem para o fechamento do diagnóstico a realização de exames complementares PET ou PET/CT, ultrassonografia ou ressonância magnética (NASCIMENTO et al., 2015; DIRETRIZ, 2001).

Quando se considera a realização de exames PET, o radiofármaco FES-¹⁸F é uma molécula lipofílica com características *in vivo* semelhantes ao estradiol e liga-se aos receptores de estrogênio (ER), que são super expressos em câncer de mama, fazendo com que o estradiol-¹⁸F (FES-¹⁸F) seja um radiofármaco de escolha para investigação, por ser um método não-invasivo.

Peterson e colaboradores (2008), ao estudar a captação de FES-¹⁸F em células de câncer de mama, demonstrou uma correlação positiva tanto qualitativamente como semi-quantitativamente entre FES-¹⁸F e o ensaio imunohistoquímico (IHC), utilizado para mensurar a expressão de ER. Esse resultado demonstra que o FES-¹⁸F pode ser usado para mensurar a distribuição *in vivo*, quantificar a carga tumoral e detectar metástases ER+, difíceis de visualizar em uma biópsia (SUN et al., 2015; OH et al., 2007 e PETERSON et al., 2008).

Quando comparados, a sensibilidade do valor de captação padrão (SUV - *Standard Uptake Value*) do FES-¹⁸F em PET e a expressão de imunohistoquímica ER foi de 0,85 e a especificidade foi de 0,75. O valor preditivo positivo foi de 0,94 e o valor preditivo negativo foi de 0,50 (MARY et al., 2013). Portanto, o FES-¹⁸F pode ser usado como substituto para biópsia quando as lesões são de difícil acesso, auxiliando na escolha da terapia para

melhorar a tomada de decisão terapêutica (SUN et al., 2015; MARY et al., 2013 e BENSCH et al., 2013).

Uma vantagem da utilização de radiofármacos emissores de pósitrons como o FES-¹⁸F nos equipamentos de PET e PET/CT está nos resultados obtidos que correspondem à imagem molecular *in vivo* (ROBILOTTA, 2006), indicando que o desenvolvimento e comercialização deste radiofármaco β^+ emissor é de fundamental importância para a medicina nuclear brasileira.

Para a síntese do FES-¹⁸F utiliza-se um conjunto de reativos comerciais (Kit) adaptado a um módulo de síntese automatizado, visando a obtenção do produto de forma relativamente rápida e com grau de pureza adequado, atendendo às exigências das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos e de radiofármacos da ANVISA (BRASIL, RDC 301, 21 de agosto 2019; BRASIL, IN 35, 21 de agosto 2019).

Os estudos de validação de processos constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação de medicamentos e devem ser conduzidos de acordo com protocolos predefinidos. Devem-se seguir recomendações de guias internacionais, como os documentos do PICs (*Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme*) e do órgão sanitário regulador nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, IN 47, 21 de agosto 2019).

Desta forma, uma análise de risco do processo produtivo deve ser realizada para considerar todos os pontos críticos que serão desafiados durante a validação do processo produtivo, utilizando-se de protocolos elaborados para esse fim.

Além da validação do processo de produção de um novo radiofármaco, a validação dos métodos analíticos empregados para avaliar a qualidade dos lotes produzidos, constitui-se requisito primordial para a obtenção do registro do produto junto à ANVISA, e deve ser realizada de acordo com resolução específica (BRASIL, RDC 166, 24 de julho de 2017).

De acordo com as Resoluções da diretoria colegiada (RDCs) nº 64 e 263, que dispõe sobre os registros dos radiofármacos no Brasil (BRASIL, RDC 64, de 18 de dezembro de 2009 e 263 de 04 de fevereiro de 2019), para que um radiofármaco Novo Inovador (nunca antes comercializado no país) possa ser registrado, devem ser apresentados resultados de estudos pré-clínicos e clínicos que descrevam a segurança e eficácia do produto.

A condução de estudos pré-clínicos envolve a utilização de animais de experimentação para avaliar a biodistribuição e a especificidade do novo radiofármaco, empregando-se métodos invasivos ou não invasivos (ZANETTE, 2013; ALMEIDA et al., 2011).

Estes testes são essenciais na fase de desenvolvimento do novo radiofármaco (BRASIL, RDC 263 de 04 de fevereiro de 2019).

A empresa Zionexa US Corporation obteve recentemente a licença para produzir e comercializar o radiofármaco Fluorestradiol (FES-¹⁸F) na França como Estroptep® e nos Estados Unidos como Cerianna®. O Centro de Radiofarmácia do IPEN possui interesse no desenvolvimento e registro deste radiofármaco para oferecer à classe médica nuclear brasileira como um novo radiofármaco para utilização em PET e PET-CT, auxiliando no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com câncer de mama.

Este trabalho contribuiu para a inserção do processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F na rotina de produção do Centro de Radiofarmácia do IPEN, antecipando pré-requisitos de validação de processo, de metodologia analítica e de estudos pré-clínicos, necessários para o registro do radiofármaco junto à ANVISA.

OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem por objetivo estudar a síntese do radiofármaco FES-¹⁸F em módulo automatizado, bem como contribuir para a validação do processo produtivo, estudar a estabilidade do radiofármaco frente às condições de armazenamento e avaliar e validar métodos analíticos que serão utilizados no controle de qualidade do produto e realização de estudos pré-clínicos a fim de demonstrar sua eficácia.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o processo de síntese automatizada do FES-¹⁸F e determinar os pontos críticos do processo;
- Desenvolver o protocolo e a documentação relacionada à validação de processo produtivo;
- Determinar e analisar o rendimento radioquímico do processo de síntese do FES-¹⁸F;
- Estudar a estabilidade do FES-¹⁸F e determinar o prazo de validade do produto;
- Definir os ensaios de controle de qualidade para avaliação do radiofármaco e os critérios de aceitação envolvidos.
- Estudar e definir métodos cromatográficos para o controle da Pureza Radioquímica e validar a metodologia escolhida;
- Realizar estudo de biodistribuição do FES-¹⁸F em animais sadios e com modelo tumoral;
- Realizar imagem do FES-¹⁸F em PET de animais com tumor;

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Medicina Nuclear e PET/CT

A história da medicina nuclear começa em 1895 quando Wilhelm Conrad Roentgen descobre o raio-X e a radioatividade nos elementos naturais. Henri Becquerel descobre que os sais de Urânio de seus estudos, tinham as mesmas características dos Rx de Roentgen. Dois anos mais tarde, em meados de 1898, o casal Marie e Pierre Curie demonstraram a radioatividade nos elementos Polônio e Rádio (ROBILLOTA, 2006). Entretanto, somente em 1913 o químico húngaro George de Hevesy propôs o "princípio do traçador", através de experiências com nitrato de chumbo marcado com o nuclídeo radioativo ^{210}Pb (Chumbo), mostrando a absorção e seu movimento em plantas, o que realmente forneceu o fundamento biológico para a especialidade e o prêmio Nobel de Química em 1943 (OKUNO et al., 1986).

Herrmann L. Blumgart e Soma Weiss, em 1927, injetaram uma solução de radônio em um braço e a verificação de sua chegada no outro braço com uma câmara de Wilson, realizando assim a primeira medida da velocidade sanguínea (ROBILLOTA, 2006; BLUMGART, 1927).

Em 1932, a invenção e a construção do ciclotron, por Ernest O. Lawrence e M. Stanley Livingstone, possibilitou a produção de radionuclídeos artificiais, através do bombardeamento de núcleos-alvos por partículas positivas aceleradas (ROBILLOTA, 2006).

Em 1951, Benedict Cassen desenvolveu o scanner retilíneo o que deu início à era de diagnóstico por imagens radionuclídicas. Logo após, em 1958, Hal Anger desenvolveu a primeira gama-câmara, e, em 1960 com o desenvolvimento dos computadores, foi possível adquirir, processar e armazenar as imagens obtidas com as câmaras de cintilação podendo estudar parâmetros fisiológicos, melhorar o processo de formação de imagens,

evidenciando estruturas de interesse. Em 1964, pode-se dizer que houve o grande marco na medicina nuclear: a utilização do ^{99m}Tc (tecnécio-99 metaestável), permitindo a expansão das aplicações em medicina nuclear por ser um elemento radioativo com baixa energia de emissão, promovendo imagens de boa qualidade, meia-vida de emissão radioativa curta resultando em baixa dose de radiação para o paciente e facilidade em marcar moléculas permitindo o estudo de diversos órgãos usando o mesmo elemento radioativo (ROBILLOTA, 2006).

Na década de 1970, ocorreram novos avanços na reconstrução de imagem, quando David E. Kuhl e sua equipe na Universidade da Pensilvânia realizaram as primeiras tomografias por emissão de fótons únicos (*single photon emission computed tomography*, SPECT). Na mesma época, Gordon L. Brownell e colaboradores no Hospital Geral de Massachusetts e Michael E. Phelps e colaboradores na Universidade da Califórnia em Los Angeles realizaram tomografia por emissão de pósitron (PET – *positron emission tomography*) podendo estar associado com a tomografia computadorizada (CT) (IAEA, Guide to clinical PET in Oncology, 2008 e IAEA, Cyclotron Produced Radionuclides, 2008).

Desde então, são os principais métodos de imagem utilizados em Medicina Nuclear nos quais os exames de SPECT utilizam radiofármacos produzidos com radioisótopos emissores gama e o PET ou PET/CT utilizam radiofármacos preparados com radionuclídeos emissores de pósitron. Contudo, devido à meia-vida física curta dos radioisótopos emissores de pósitron mais empregados e ao alto custo, só nos anos 1990 os exames com PET passaram a ser rotina nas clínicas dos Estados Unidos e Europa. No Brasil, a tecnologia PET foi introduzida em 1998, com a instalação de uma câmara PET/ SPECT no Serviço de Radioisótopos do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (ROBILLOTA, 2006).

O pósitron é uma partícula idêntica ao elétron, com carga positiva. Sua interação com o meio que atravessa é elétrica, ou seja, ele perde energia interagindo sucessivamente com átomos e moléculas, produzindo ionizações ou excitações, até quase parar. A base da formação da imagem com emissores de pósitrons é a detecção, em coincidência, do par de fótons de aniquilação

pósitron-elétron, por detectores do equipamento, os dados de diferentes ângulos são recolhidos e tratados por computação gráfica (RAMOS et al., 2011 e CERVINO et al., 2013), conforme ilustra a figura 1.

Figura 1 - Esquema do processo do exame de PET ou PET/CT

Fonte: Ivepesp, 2015

O PET/CT por possuir uma tecnologia híbrida agregando tomografia computadorizada permite, em um único exame, visualizar as informações anatômicas e metabólicas *in vivo*, além de permitir quantificar os radiofármacos conforme captação no tumor e/ou receptor específico. Tais características justificam a ampla e crescente utilização da tecnologia PET no diagnóstico e estadiamento de pacientes com câncer (JUNIOR et al., 2018).

Desta forma, o desenvolvimento de radiofármacos para aplicação em PET representa uma importante linha de investigação.

O flúor-18 (^{18}F) é um radionuclídeo emissor β^+ que apresenta as propriedades físicas e nucleares mais favoráveis para a imagem PET, pois aproximadamente 97% decai para oxigênio-18 emitindo β^+ , com energia máxima do pósitron emitido em 0,633 MeV (figura 2) e meia-vida relativamente curta de 109,7 min (JACOBSON et al., 2010). A baixa energia dos pósitrons

resulta em uma penetração reduzida destes no tecido, o que favorece a resolução da imagem PET com menor dose de radiação para o paciente (WAHL et al., 2011).

Figura 2- Esquema do decaimento do Flúor 18

Fonte: BIPM,2004 (modificado)

Radiofármacos emissores de pósitron vêm sendo desenvolvidos, visando assegurar um diagnóstico mais específico, explorando mecanismos diferentes de ligação às células tumorais. Um mecanismo utilizado no desenvolvimento de radiofármacos específicos baseia-se na interação destes com receptores específicos localizados nas células tumorais.

Radiofármacos receptor-específicos vêm sendo utilizados em estudos clínicos para diagnóstico e terapia de diferentes tipos de câncer e são normalmente representados por hormônios, peptídeos ou anticorpos monoclonais e seus fragmentos marcados com radionuclídeos gama ou pósitron emissores (para diagnóstico) ou emissores de radiação beta menos ou alfa (para aplicação em terapia) (LÜTJE et al., 2015).

O radiofármaco **16 α -[^{18}F]-fluoro-17 β -estradiol (FES- ^{18}F)** se liga a receptores de estrogênio e vem sendo estudado e utilizado no diagnóstico e acompanhamento de casos de adenocarcinoma mamário (câncer de mama) classificados como estrógeno dependente (PETERSON et al., 2008).

3.2 Câncer de Mama

No cenário mundial, o câncer mamário corresponde à uma das principais causas de morte entre as mulheres. O Brasil tem uma estimativa de 66280 novos casos em 2020 (INCA, 2020), além de ser a primeira causa da morte por câncer entre mulheres no Brasil e a segunda no mundo, (BENSCH et al. 2013 e ACS, 2020), o que caracteriza um dos principais problemas de saúde pública (SILVA et al., 2019).

O câncer de mama é uma das principais neoplasias que acometem as mulheres, sendo uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica, observa-se uma elevada vascularização, aumento do metabolismo de glicose, síntese proteica e aproximadamente 75% dos casos de câncer de mama apresentam receptor de estrógeno (ER+) (SILVA et al., 2019; WAHL, 2001 e LIAO et al., 2016).

Assim como os cânceres em geral, é o resultado de mutações somáticas, neste caso, nas células epiteliais dos ductos ou dos lóbulos da mama. Uma vez que as alterações genéticas estejam presentes, a célula pode proliferar e migrar, não fazendo mais os controles do processo de morte celular programada (apoptose) (DICKSON et al., 1995).

Fatores ambientais como uso de anticoncepcional para reposição hormonal, tabagismo, menarca em idade jovem, menopausa ou gravidez em tardia, ingestão de bebida alcoólica, excesso de peso além de fatores genéticos podem causar alterações genéticas e são importantes fatores de riscos no desenvolvimento da neoplasia maligna (câncer) da mama (SILVA et al., 2019; GRAY et al., 2015).

Dentre os fatores genéticos, o desenvolvimento do câncer está relacionado a mutações e polimorfismos dos genes supressores do tumor BRCA 1 e BRCA 2 (BOHR, 1995; JIRICNY, et al. 2000 e PHAROAH et al., 2008). SHIOVITZ, 2015 e TUNG e colaboradores 2015, descrevem outros genes também correlacionados ao câncer de mama.

As mutações podem ocorrer tanto em células de linhagem germinativas (câncer hereditário), quanto em células somáticas (câncer esporádico). Cerca de 90% dos cânceres de mama são esporádicos, sem nenhum caráter familiar (PHAROAH, et al. 2008).

Os carcinomas mamários são classificados como carcinoma *in situ* (CIS) micro-invasivo ou invasivos (GOBBI, 2012).

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS), também conhecido como carcinoma intraductal, é um câncer de mama não invasivo ou pré-invasivo (COTRAN et al., 2005 e ACS, 2020), sendo o tumor não invasivo mais frequente e com origem nas unidades terminais ducto-lobulares que pode progredir no sentido do ducto ou do lóbulo (LOPES, 2009).

Atualmente, o receptor de estrógeno é o biomarcador validado na prática clínica que deve ser pesquisado por técnica imunohistoquímica. A distribuição da expressão de ER em carcinomas *in situ* é similar ao observado nos cânceres invasivos, ou seja, 75 a 80% são positivos (GRAY et al., 2017).

A classificação morfológica dos CDIS com base na morfologia nuclear divide-os em 3 graus: baixo, médio ou alto grau. CDIS de baixo grau são normalmente positivos para receptores hormonais (ER++), não tem necrose, são diploides, são HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-type 2) negativos e o p53 (proteína 53) é negativo. Os de grau intermédio têm frequentemente receptores hormonais positivos (ER), p53 é variável e normalmente não tem receptores HER2. Já os de alto grau são negativos para receptores hormonais (ER-) e podem ter HER2 e p53 positivo (LOPES, 2009).

O carcinoma lobular *in situ* (LCIS) também pode ser chamado de neoplasia lobular. Esta mudança da mama é caracterizada pela hiperplasia lobular atípica. As mulheres com LCIS têm um risco 7 a 12 vezes maior de desenvolver câncer invasivo. (COTRAN et al., 2007 e ACS, 2020).

Os tipos clássicos de neoplasia lobular têm um perfil imunohistoquímico semelhante ao tipo invasivo, com mais de 90% fortemente positivo para receptor de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e rara expressão de HER2, porém, pode ter uma variante pleomórfica, negativa para ER e positiva para HER2, além de mais alto índice proliferativo (SNEIGE et al., 2015 e GOBBI, 2012).

Carcinomas micro-invasivos são caracterizados pela extensão das células neoplásicas além da membrana basal da unidade ducto-lobular para o estroma adjacente e são frequentemente associados com carcinomas ductais *in situ*. Devido ao pequeno tamanho, não é possível a avaliação

complementar por técnicas imunohistoquímicas para identificar os ER, PR e HER2 (MCLAREN et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os **Carcinomas de mama invasivo (infiltrativo)** são classificados genericamente como os de tipo especial e não-especial e são os cânceres de mama que se espalham para o tecido mamário circundante (GOBBI, 2012).

A última classificação refere-se aos **sarcomas**, que são raros, com incidência de 1%, porém são severos quando acometem. São grandes tumores, de crescimento progressivo e gradual, que chegam a ocupar toda a mama e normalmente apresentam ER, PR e HER2 negativos (AUGUSTO et al., 2018).

Os médicos muitas vezes avaliam o prognóstico e tratamento do câncer de mama invasivo ou *in situ* com base na presença dos receptores hormonais (ER e PR) e HER2 (GOBBI, 2012).

Os hormônios esteroides sexuais são os principais reguladores da cinética dos ductos e lóbulos mamário, principalmente o estrogênio. São lipofílicos, atravessam livremente a membrana da célula, penetram passivamente no citoplasma e se unem ao receptor de estrógeno (ER) que está no núcleo, controlando a expressão de vários genes. São os estrógenos que influenciam no crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos-alvo, incluindo mama, útero e ovários. (MADAK et al., 2008).

Os receptores estrogênicos (ER) são membros da superfamília de receptores nucleares que controlam a transcrição gênica. As duas principais isoformas do ER são α e β , e apresentam distribuição e padrões de expressão genética distintos em diferentes tecidos. O ER α é predominantemente expresso na mama, útero e ovários, fígado e sistema nervoso central (SNC) e o ER β é expresso em tecidos do sistema cardiovascular, imunológico, gastrointestinal, urogenital, pulmões, ossos e SNC (DIEZ-PEREZ, 2006).

O ER α é também de especial interesse, pois sua proteína está elevada em aproximadamente 70% das mulheres com câncer de mama após a menopausa e 30% das mulheres com câncer na pré-menopausa. A presença do ER é descrita como tumor sensível ao tratamento hormonal e com prognóstico favorável (ALLRED et al., 2004 e GOBBI, 2012).

Os ERs apresentam uma estrutura com vários domínios (A, B, C, D, E, F), figura 3. O domínio A/B, localizado na porção amino-terminal da molécula, está envolvido nas interações com cofatores e proteínas relacionadas com o processo de transcrição. Há cerca de 18% de homologia entre ER α e ER β no domínio A/B. O domínio C, responsável pela ligação do receptor ao DNA, é a região com maior homologia entre os dois subtipos (97%). O domínio D contém o sinal da localização nuclear e é onde a molécula se dobra, sendo responsável pela flexibilidade tridimensional da molécula, importante para suas interações. O domínio E é o sítio que se une aos ligantes, com 59% de homologia entre ER α e ER β . E o domínio F, na terminação carboxila da molécula, é extremamente variável (18% de homologia) e parece contribuir para a modulação da atividade transcricional (MORANI, 2008).

Figura 3 - Estrutura dos Receptores de estrógeno.

Fonte: Morani, 2008 (editado).

O protocolo da Diretriz da Sociedade Brasileira de Mastologia (2001) e fundamentado na *American Cancer Society* caracteriza o exame imunohistoquímico (IHC) como padrão ouro utilizado em rotinas clínicas para mensurar a expressão dos receptores de estrogênio nos carcinomas mamários. Porém, o método além de ser invasivo é influenciado por vários fatores, desde a fase pré-analítica (fixação e processamento dos tecidos), passando pela fase analítica (escolha de anticorpos primários e sistema de visualização), até a fase pós-analítica (interpretação dos resultados); possui cerca de 10 a 15% de exames falso-negativo ou inconclusivo, além de apresentar desvantagens quanto ao diagnóstico de metástases, visto que não é possível detectar as metástase (SALLES et al., 2009),

SILVA e colaboradores (2019) relata que aproximadamente 40% das pacientes que chegam ao serviço de diagnóstico do Sistema Único de Saúde (SUS) já estão em estágio III ou IV, no qual, alguns casos, já possuem metástase, descrevendo o diagnóstico tardio como uma das principais causas de morte no carcinoma mamário.

Conhecer o estágio do tumor ajuda na definição do tipo de tratamento e a prever o prognóstico da paciente. O sistema TNM (abreviatura de tumor (T), linfonodo (N) e metástase (M)) de classificação de tumores malignos, utiliza três critérios para avaliar o estágio do câncer: o próprio tumor, os linfonodos regionais ao redor do tumor, e se o tumor se disseminou para outras partes do corpo (TNM, *Classification of Malignant Tumours*, 2002).

Para o rastreamento e definição do melhor tratamento do câncer de mama, os métodos de diagnósticos por imagem como mamografia, ultrassonografia e a ressonância magnética representam papel fundamental (MORANI et al., 2008 e DIRETRIZ, 2001) mas, de alguns anos pra cá, a medicina nuclear vem ganhando espaço com o exame de PET/CT, que ao contrário dos métodos de imagem convencionais capazes de detectar apenas alterações anatômicas, é capaz de fornecer informações relacionadas ao metabolismo de glicose no caso do uso com FDG-¹⁸F ou de receptores específico no caso do FES-¹⁸F (FANGFANG et al., 2017).

BITENCOURT et al., 2010 correlacionou os achados de imunohistoquímica com os exames de PET/CT realizados com FDG-¹⁸F em São Paulo e conclui boa sensibilidade no diagnóstico dos carcinomas mamários, principalmente os mais agressivos.

PETERSON et al., 2008 e MARY et al., 2013 ao estudar a captação de FES-¹⁸F em células de câncer de mama demonstraram uma correlação positiva tanto qualitativamente como semi-quantitativamente entre FES-¹⁸F e o IHC.

Trabalhos publicados avaliando a captação do FDG-¹⁸F nos tumores, descrevem a baixa especificidade, uma vez que esse radiofármaco atua através do mecanismo metabólico das células cancerígenas e como nessas células observa-se um maior consumo de glicose (WAHL, 2001). O aumento da captação de FDG-¹⁸F pode estar associado com a progressão da doença, porém, nem sempre a não captação, o que é frequente, está associada a estabilidade ou cura da doença (YAMAGISHI et al., 2020), mas pode estar

associada à resposta morfológica do tumor, sendo melhor que a mamografia e ultrassonografia em acompanhamento de tratamento (FANGFANG et al., 2017).

Como já mencionado, os receptores estrogênio, principalmente o ER α e o receptor de progesterona (PR) são importantes biomarcadores usados para determinar o prognóstico e prever benefícios das terapias endócrinas em pacientes com câncer de mama (FOWLER et al., 2016). Nesta visão, o uso do radiofármaco **16 α -[¹⁸F]-fluoro-17 β -estradiol (FES-¹⁸F)** está sendo cada vez mais estudado.

MINTUN et al., 1988; PETERSON et al., 2008; MORTIMER et al., 1996 e KATZENELLENBOGE, 2020 relatam a utilização do FES-¹⁸F no diagnóstico e estadiamento do câncer de mama, assim como outros estudos clínicos estão em andamento (UMCG, 2013; NCI, 2016 E UMC, 2018). Mais recentemente o CERIANNA™ (*fluoroestradiol F 18*) Injection, nome comercial do radiofármaco **16 α -[¹⁸F]-fluoro-17 β -estradiol**, produzido pela empresa Zionexa, Nova York, foi liberado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para comercialização nos Estados Unidos e Europa.

Uma comparação realizada por SUN et al., 2015, entre FDG-¹⁸F, FES-¹⁸F e FMISO-¹⁸F (18F - Fluoromidazol) mostrou uma correlação positiva significativa entre a captação de FES-¹⁸F e os níveis de ER nos tecidos tumorais correspondendo bem à resposta da terapia endócrina, mas não mostrou o mesmo para FDG-¹⁸F e FMISO-¹⁸F (HE et al, 2016).

Corroborando, FOWLER et al., 2016 realizou estudos com o FES-¹⁸F como um biomarcador da terapia endócrina para câncer de mama metastático ER+ em vários pequenos estudos, mostrando ser benéfica a utilização do FES-¹⁸F em comparação com o FDG-¹⁸F.

SALLER, 2018 publicou a ligação específica entre o FES-¹⁸F e os receptores de estrogênio alfa em diferentes células tumorais, apoiando a utilização do FES-¹⁸F para avaliar a heterogeneidade do tumor e localizando metástases que são ER+.

Em todos os estudos, o FES-¹⁸F mostrou ser um radiofármaco promissor, pois além de informar a localização e tamanho, também distingue qual o tipo de tumor de câncer de mama, auxiliando na antecipação e no melhor planejamento terapêutico do paciente.

3.3 Obtenção do Flúor e marcação do FES- ^{18}F

O ^{18}F é um radionuclídeo obtido de forma ionizada ($^{18}\text{F}^-$), como resultado do bombardeio do ^{18}O (água enriquecida) por prótons acelerados, através da reação nuclear $^{18}\text{O} (p, n) ^{18}\text{F}$ em aceleradores de partículas (ciclotron). Possui um tempo de meia-vida físico de apenas 109,7 minutos (BOECHAT et al., 2015)

O ^{18}F decai por emissão de pósitrons (β^+ ou e^+), segundo a reação nuclear abaixo:

EQ.1

Uma vantagem da utilização de radiofármacos emissores de pósitrons como o FES- ^{18}F nos equipamentos de PET e PET/CT, está nos resultados obtidos que são adequados para imagem molecular *in vivo* e o uso destes equipamentos já se tornou uma rotina da prática clínica (ROBILOTTA, 2006).

O flúor pode ser incorporado a uma molécula de duas formas: substituição eletrolítica ou nucleofílica, dependendo da forma química com que o flúor radioativo é obtido. A substituição nucleofílica é a mais largamente utilizada nas sínteses de radiofármacos (BOECHAT et al., 2015), pois a forma ionizada ($^{18}\text{F}^-$) produzida no ciclotron possui uma elevada atividade específica (JACOBSON et al., 2010).

A reação que ocorre na síntese do FES- ^{18}F é uma reação de fluoração nucleofílica alifática SN_2 , que ocorre devido à molécula precursora possuir um bom grupo abandonador (JACOBSON et al., 2010).

A reação ocorre quando o nucleófilo (doador de elétrons), neste caso o fluoreto ($^{18}\text{F}^-$), se liga ao carbono (na posição 16) substituindo os ésteres de sulfonato (grupo abandonador) (JACOBSON et al., 2010). O esquema de marcação esta apresentado na figura 4.

Figura 4 - Esquema químico de produção do FES-¹⁸F.

(1) Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol,16-fluoro-, (16 α ,17 β) – MMSE **(2)** Incorporação nucleofílica de [¹⁸F] flúor no precursor MMSE; produto intermediário pré-hidrólise fluorado. **(3)** após hidrólise ácida do intermediário e a formação do FES-¹⁸F

Fonte: KNOTT, 2011

3.4 Validação do processo de síntese e metodologia analítica

Os estudos de validação de processos constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos. Devem-se seguir normas de agências internacionais e órgão nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Atualmente, as Boas Práticas de Fabricação estão contidas na Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 301 de 2019 (BRASIL, RDC 301, 21 de agosto de 2019).

A validação dos processos produtivos e dos métodos analíticos empregados na análise para liberação dos radiofármacos é condição essencial para a certificação dos processos produtivos pela ANVISA.

Como ocorre com a maioria dos radiofármacos, e será o caso do FES-¹⁸F, o produto necessita ser liberado antes da conclusão dos ensaios de controle de qualidade. Deste modo, deve ser dada especial atenção à validação de processos produtivos e validação dos métodos de esterilização, controle de processo e monitoramento dos parâmetros estabelecidos. (WHO, 2004; WHO, 2006).

Os processos e procedimentos produtivos devem ser estabelecidos, de acordo com os resultados do estudo de validação e devem sofrer revalidações sempre que necessário, para assegurar que os mesmos permaneçam capazes

de atingir os resultados planejados. A análise de risco deve ser realizada antes da implantação do processo produtivo, de modo a estabelecer os pontos críticos do processo (BRASIL, RDC 166, 21 de agosto de 2019).

O uso da avaliação de risco é mandatório na indústria farmacêutica e a demanda começa com a RDC 301 de 21 de agosto de 2019, onde no Art. 7 § parágrafo 1º, assim descreve “O projeto do sistema da garantia da qualidade deve incorporar princípios apropriados do gerenciamento de risco, incluindo o uso de ferramentas apropriadas”.

A norma ISO 9001:2015, logo no início, item 0.3.3, Mentalidade de Risco, aborda que as pessoas e a organização como um todo devem adotar o pensamento baseado em riscos, analisando sempre quais as possibilidades de algo dar errado.

Corroborando, a portaria da CNEN-PR Nº 013, de março 2018, em seu Artigo 6º diz que “A Gestão de Riscos deverá atender as diretrizes apresentadas na mesma.

A definição de risco, segundo a ISO 9001:2015, refere-se ao efeito sobre a incerteza, ou seja, o desvio positivo ou negativo relacionado ao resultado esperado em um processo, projeto, ou qualquer outro objetivo.

Uma das ferramentas para a avaliação de riscos é o FMEA (*Failure Mode Effective Analysis*), método que avalia o modo de falha e análise de efeitos, descrita pela primeira vez em 1949, utilizada pelos militares. Esta ferramenta da qualidade foi desenvolvida com o objetivo de determinar o efeito da ocorrência da falha em sistemas e equipamentos. Alguns anos depois, na década de 1960, a ferramenta foi aplicada no projeto Apolo da agência norte-americana NASA (CAETANO et al., 2015) e gradativamente conquista as diversas indústrias, pois é uma ferramenta completa que examina possíveis falhas em produtos ou processos, sendo utilizado para avaliar as prioridades de gerenciamento de riscos visando mitigar vulnerabilidades de ameaças conhecidas (MACHADO et al., 2007 e VIJAYAKUMAR et al., 2015).

No caso particular de radiofármacos, não existem metodologias descritas para validação dos processos produtivos e qualificação das instalações que processam os materiais radioativos (células e glove box de processamento). Tudo deve ser realizado visando, além das Boas Práticas de

Fabricação de medicamentos, as resoluções específicas sobre Boas Práticas de Fabricação de radiofármacos (SANDLE, 2003).

No caso dos métodos analíticos empregados no controle de qualidade de radiofármacos, propõe-se trabalhar com métodos farmacopeicos quando existirem monografias descritas em compêndios oficiais para o radiofármaco em questão. Quando se utiliza métodos farmacopeicos, supostamente validados, a adequação das metodologias analíticas deve ser demonstrada. Caso não existam monografias oficiais para o radiofármaco em questão, os métodos analíticos devem ser validados de acordo com RDC 301 de 21 de agosto de 2019 e Instrução Normativa IN nº 37 de 21 de agosto de 2019 (BRASIL, RDC 301, 21 de agosto de 2019; BRASIL, IN 37, 21 de agosto de 2019).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste tópico, apresenta-se, na figura 5, o esquema do planejamento experimental adotado neste trabalho.

Figura 5 - Esquema do delineamento experimental adotado.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Infraestrutura

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de pesquisa e controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia, na Instalação de Aceleradores Cíclotrons, no laboratório de Cultivo Celular e no Biotério do Centro de Biotecnologia, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN), que forneceram toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais.

5.2 Materiais

5.2.1 Reagentes, acessórios e soluções

O conjunto de reagentes (Kit) para síntese automatizada de FES-¹⁸F, fornecido pela ABX, Alemanha é composto por:

- Um frasco com acetonitrila anidra para secagem, um frasco com o precursor 3-metoximetil-16 β ,17 β -epiestriol-O-cíclico sulfona (MMSE) a ser diluído com acetonitrila, um frasco com solução de etanol 40%, um frasco com solução de etanol 95%, um frasco com o eluente TBA-HCO₃, uma seringa com água para lavagem e uma seringa com solução de etanol com ácido sulfúrico.

Demais reagentes utilizados:

- Acetonitrila; (Merck, Alemanha);
- Água enriquecida em ¹⁸O (Rotem, Israel);
- Água para injeção (API) (Europharma, Brasil);
- Caldo de enriquecimento Tioglicolato; (PlastLabor, Rio de Janeiro);
- Cloreto de sódio (NaCl 0,9%); (Merck, Alemanha);
- Etanol (C₂H₅OH); (Merck, Alemanha);
- Hidróxido de Amônia (NH₄OH); (Merck, Alemanha);

- Iodo metálico granulado (Sigma, Alemanha);
- Kit de reagente LAL para determinação de endotoxinas bacterianas (The Charles River Endosafe, EUA);
- Meio de Cultura de Caseína Sólida TSB; (PlastLabor, Rio de Janeiro);
- Metanol (CH_3OH); (Merck, Alemanha);
- Padrão de TBA HCO_3 (98%); (Sigma, Alemanha);
- Estradiol 5mg capsula (produto manipulado);
- E.C.P.[®] (Cipionato de estradiol) 2 mg/mL (Zoetis).

5.2.2 Equipamentos

- Balança analítica M220 (Denver Instrument, EUA);
- Bloco aquecedor (IKA C-MAG HS7, China);
- Calibrador de Dose, modelo CRMTM-35R (Capintec, Inc, EUA);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A5, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10A e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);
- Cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão);
- Contador Gama, Cobra (Packard, EUA);
- Activímetro CRC 25, (Capintec, EUA);
- Detector de Germânio modelo GX1518 hiperpuro (HPGe), com sistema analisador multicanal (Canberra Inc., EUA);
- Módulo de Síntese TracerLab MX (GE, EUA);
- TLC-Scan (LabLogic, EUA).

5.2.3 Outros

- Blindagem de Tungstênio;
- Coluna de fase reversa para CLAE C18 (monomérica, 5 mm, 250 x 4,6 mm). (Phenomenex, EUA);
- Cubas cromatográficas de vidro (Perlab, Brasil);

- Fita de alumínio impregnada com sílica gel 60 para cromatografia em camada delgada – TLC-SG (Merck, Alemanha);
- Fita indicadora de pH 0 – 14 (Merck, Alemanha).

5.3 Métodos

5.3.1 Análise de Risco – FMEA

A análise de risco foi elaborada como parte do protocolo de validação do processo de produção do FES-¹⁸F, empregando-se a ferramenta FMEA (*Failure Mode and Effect Analysis*), conhecida como Análise de Modos de Falha e seus Efeitos. Para utilização da FMEA foi composta uma equipe de trabalho constituída por operadores do processo de produção de radiofármacos do Centro de Radiofarmácia do IPEN. Realizou-se o desenvolvimento de uma planilha (*Excel*) de FMEA, onde foram identificadas as etapas do processo e posteriormente os modos de falhas. Foi realizada a pontuação quanto à severidade (Tabela 1), ocorrência (Tabela 2) e detecção (Tabela 3), utilizando-se uma escala de 1 a 5 (IPEN, 2018).

Tabela 1 - Descrição do Índice de Severidade do Processo

Índice		Descrição
1	Muito baixo	Sem danos ou interferência no processo Não traz riscos diretos ou indiretos para a qualidade final dos produtos, segurança do paciente e integridade dos dados
2	Baixo	Pouca interferência no processo, sem perdas ao processo
3	Moderado	Perdas e risco ao processo
4	Crítico	Grandes perdas e risco ao processo
5	Muito Crítico	Risco e perdas críticos ao processo. Afeta a qualidade do produto, a segurança do paciente e a integridade dos dados, perda de rastreabilidade, afeta a saúde pública, não atende a legislação

Fonte: IPEN 2018

Tabela 2- Índice da Probabilidade de Ocorrência da Falha no Processo

Índice		Descrição
1	Muito baixo	Não ocorre ou muito raramente. Possibilidade remota de ocorrência
2	Baixo	Baixa probabilidade de ocorrer
3	Moderado	Pode ocorrer, acontece em situações específicas
4	Alta	A ocorrência é prevista
5	Muito Alta	Frequentemente, a qualquer momento e a mesma não é impedida. Quase inevitável

Fonte: IPEN 2018

Tabela 3 - Índice da Probabilidade de Detecção da Falha no Processo

Índice		Descrição
1	Muito Alta	Sempre detecta
2	Alta	A falha provavelmente será detectada rapidamente. Dificilmente não irá detectar.
3	Moderado	A falha é detectada algumas vezes quando ela ocorre. Detecta mais da metade das ocorrências, falha não é detectada imediatamente
4	Baixa	A falha é dificilmente detectada quando ela ocorre. Dificilmente é detectado
5	Muito baixa	A falha demora a ser detectada. Nunca é detectada

Fonte: IPEN 2018

Ao final da análise FMEA foram obtidos valores para cada modo de falha por meio da fórmula de NPR (Número de Prioridade de Risco):

$$\text{NPR} = \text{Índice de Severidade} \times \text{Índice de Probabilidade de ocorrência} \times \text{Índice de detecção}$$

EQ.2

Recomenda-se que os modos de falha de maior NPR, conforme tabela 4, tenham tratamento priorizado (IPEN, 2018; SANDLE, 2003).

Tabela 4- Classificação e ação conforme o Número de Prioridade de Risco

Valor de NPR	Risco	Ação
Valor de NPR menor que 6	Baixo	Nenhuma ação requerida
Valor de NPR entre 7 e 10	Moderado	Recomendado medidas de mitigação
Valor de NPR maior que 10	Alto	Obrigatória medida de mitigação

Fonte: IPEN 2018

5.3.2 Obtenção do flúor-18

O fluoreto [$^{18}\text{F}^-$] foi produzido no ciclotron 18 MeV da Instalação de Aceleradores Ciclotrons do IPEN a partir da irradiação com prótons de água enriquecida em oxigênio-18 ([^{18}O] H_2O). Foram programados diferentes tempos de irradiação, possibilitando variar a atividade produzida nas diferentes datas de produção do FES- ^{18}F , desafiando assim o rendimento de produção com baixa e alta atividade de início da síntese.

A atividade inicial de [$^{18}\text{F}^-$] durante os experimentos de síntese do FES- ^{18}F variou entre 34,7 a 160,6 GBq (0,9 e 4,3 Ci).

5.3.3 Síntese do FES- ^{18}F

Na síntese do FES- ^{18}F (16 α -[^{18}F]-fluoro-17 β -estradiol) utilizou-se o módulo de síntese automatizado GE TRACERlab™ MXFDG, instalado em célula blindada de produção de radiofármacos, sendo o conjunto de células e o laboratório de síntese, classificados para produção de medicamentos injetáveis. O módulo opera de forma automatizada através de um software específico, adquirido com o kit de síntese (ABX, 2016).

Os reagentes contidos no Kit de marcação foram encaixados nos locais indicados no módulo de síntese, conforme protocolo do fornecedor (Figura 6). (ABX, 2016).

Figura 6 - Esquema de montagem do Kit para síntese do FES- ^{18}F no módulo GE TRACERlab™ MXFDG

Fonte: ABX 2018

Antes de iniciar cada síntese, o módulo realizou testes verificando o aquecimento do reator de síntese, a conexão das seringas ao cassete, o suprimento de ar comprimido e nitrogênio. Após a conformidade dos testes, o fluoreto [^{18}F] produzido no ciclotron foi enviado para o módulo de síntese, iniciando o processo de produção. As etapas do processo de síntese automatizada de FES- ^{18}F são descritas a seguir:

- O fluoreto [^{18}F] foi retido em um cartucho de troca aniônica (Quaternary methylammonium - QMA Light).
- O [^{18}F] foi eluído do cartucho para o frasco do reator utilizando-se 500 μL de solução de bicarbonato de tetrabutilamônio 0,075M (TBA- HCO_3), do qual a água foi então evaporada três vezes por destilação azeotrópica com acetonitrila a 95 °C (MORI et al., 2005).
- O precursor (Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, 16-fluoro-, (16 α ,17 β) – MMSE) foi diluído com 1,5 mL de acetonitrila e adicionado ao complexo anidro [^{18}F]/TBA, sendo a mistura aquecida a 130 °C durante 8 minutos.
- O solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em 3 mL de solução de ácido sulfúrico / etanol 2,5 %. A mistura foi aquecida a 110 °C durante 5

minutos. Após hidrólise, a mistura da reação, ainda não processada, foi resfriada até a temperatura ambiente e, posteriormente diluída com água e purificada em três cartuchos SPE diferentes e pré-condicionados (Oasis® WAX, Sep-Pak® C18, Oasis® HLB). Esses cartuchos foram lavados com etanol a 40% para retirar produtos secundários indesejados e o restante do precursor não marcado (KNOTT, 2011).

- O FES-¹⁸F foi eluído com etanol 95%, transferido de volta para o reator (que foi limpo prévia e automaticamente com água) e aquecido a 90 °C para reduzir o teor de etanol. Posteriormente, a solução de FES-¹⁸F foi retirada do reator com o restante da água e purificada no cartucho Sep-Pak® Alumina-N para remover [¹⁸F⁻] e filtrada em filtro estéril 0,22 µm para promover esterilização.
- A concentração de etanol foi reduzida abaixo de 10 % usando 15 mL de água como diluente. O volume final da solução do radiofármaco é de 20 mL e a síntese total levou aproximadamente 75 minutos. (KNOTT, 2011).

A Figura 7 resume as etapas de produção.

Figura 7 - Esquema do processo de produção do FES- ^{18}F no módulo GE TRACERlab™ MXFDG.

A água enriquecida já irradiada é percolada no cartucho aniônico (QMA Light®)

Fonte: Balieiro, 2019

5.3.4 Controle de Qualidade

Como não existe monografia farmacopeica oficial para o produto FES- ^{18}F , os ensaios descritos a seguir foram baseados na literatura, o que reforçou a necessidade de validação dos métodos analíticos propostos, conforme determina a legislação da ANVISA (BRASIL, RDC 166 de 24 de julho de 2017).

Os ensaios realizados no produto acabado, em parceria com o grupo do controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN, incluíram: determinação da Pureza Radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD), realizando estudo prévio do sistema cromatográfico, e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), ensaio de identidade e Pureza Radionuclídica, detecção do TBA- HCO_3 como impureza química, determinação de solvente residual (acetonitrila e etanol), determinação de endotoxinas bacterianas (pirogênios) e teste de esterilidade. (FELTES et al., 2011; FB, 2019)

5.3.4.1 Determinação de identidade radionuclídica

A identidade radionuclídica foi realizada a partir da determinação do tempo de meia-vida físico do flúor-18, em amostra do radiofármaco FES- ^{18}F . Utilizando um activímetro (Carpintec, EUA), a atividade de uma amostra do radiofármaco foi medida três vezes, de 10 em 10 minutos por 30 minutos. Os resultados das medidas de atividade foram plotados em escala semi-logarítmica em função do tempo. O ^{18}F possui meia-vida física de 109,7 minutos (FELTES et al., 2011).

O critério de aceitação adotado para este ensaio foi de 105 a 115 minutos, com base em monografia do radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) descrito na Farmacopeia Brasileira (FB, 2019; USP, 2018; FE, 2019), que emprega o elemento radioativo flúor-18.

5.3.4.2 Determinação de Pureza Radionuclídica

Para o controle de qualidade da Pureza Radionuclídica, amostras do radiofármaco FES- ^{18}F foram analisadas utilizando um detector de germânio hiperpuro (HPGe). Em um frasco de vidro tipo 1, foi colocado um volume do produto contendo atividade de 0,37 MBq (10 μCi) e o volume foi completado com água para injetáveis até 1 mL. O frasco foi vedado e colocado no

equipamento, a contagem foi feita por 30 minutos e a análise do gráfico foi realizada.

O critério de aceitação adotado, com base em monografia do radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) da Farmacopeia Brasileira (FB, 2019), foi que mais de 99,5 % das emissões do espectro de raios gama observadas devem corresponder ao pico principal de 0,511 MeV, 1,022 MeV e/ou a picos de espalhamento Compton do flúor-18.

5.3.4.3 Descrição do produto

A descrição do produto foi realizada a partir de observação visual, adotando-se como critério de aceitação solução límpida e incolor (BISPO et al., 2019).

5.3.4.4 Determinação de Pureza Radioquímica por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Para determinação da Pureza Radioquímica pelo método de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), utilizou-se o sistema de eluição isocrático, com fase móvel formada pela mistura acetonitrila:água (40:60), fluxo de 1mL/minuto, com detector UV (280 nm) e detector de radioatividade, coluna de fase reversa C18, Waters, com partícula de 5 μm , 4,6 x 250 mm, conforme previamente descrito (BISPO, 2017).

5.3.4.5 Determinação de Pureza Radioquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para determinação da Pureza Radioquímica pelo método de cromatografia em camada delgada, foram utilizadas tiras de alumínio (1,5 x 10 cm) recobertas com sílica gel 60 (TLC-SG) como fase estacionária e foram testadas três fases móveis diferentes para o sistema:

- a) Acetonitrila/água 95% (USP, 2018).
- b) Etanol/metanol 1:1 v/v (DIXIT, 2013).
- c) Metanol:amônia 95:5 (NANDY, 2013).

As fitas foram cortadas em 10 segmentos após a corrida e a atividade foi medida no contador gama tipo poço (FB, 2019).

O cálculo da Pureza Radioquímica foi realizado da seguinte forma:

$$\% \text{Pureza Radioquímica} = \frac{\sum (\text{segmentos 8, 9 e 10 cm})}{\sum \text{total de segmentos}} \times 100 = > 95\% \quad \text{EQ. 3}$$

5.3.4.6 Determinação de impureza química – TBAHCO₃

Para determinar a presença da impureza química TBAHCO₃, que pode resultar do processo de produção, utilizou-se cromatografia em camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (TLC-SG) e um sistema solvente composto por metanol/hidróxido de amônia (30% em água) numa relação 9:1, v/v (FB, 2019; KUNTZSCH et al., 2014). Aplicou-se em uma tira de alumínio (3 x 1,5 x 10 cm) recoberta com sílica gel 60 (TLC-SG) o padrão de TBAHCO₃ (2,6 mg/V, sendo V o volume de 20 mL), a amostra do produto a ser avaliada e o controle negativo.

Desenvolveu-se a cromatografia ascendente. As fitas foram secas em temperatura ambiente e coradas em vapor de iodo (cuba contendo iodo metálico granulado) para revelar a impureza (TBAHCO₃). Como critério de aceitação, a amostra analisada não deveria apresentar uma mancha mais intensa que a do padrão (KUNTZSCH et al., 2014). O critério de aceitação está descrito na farmacopeia europeia e é o mesmo utilizado para os radiofármacos que utilizam TBAHCO₃ como agente eluente, como por exemplo, Fluoromisonidazol (FMISO-¹⁸F) e Fludesoxitimidina (FLT-¹⁸F). A Farmacopeia Brasileira (FB, 2019) descreve o mesmo método para a detecção do agente eluente (Kryptofix) do radiofármaco fludesoxiglicose (¹⁸F).

5.3.4.7 Determinação de Solventes residuais (acetonitrila e etanol)

A determinação dos solventes residuais acetonitrila e etanol foi realizada utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu (Shimadzu, Japão). A amostra foi colocada no sistema injetor do cromatógrafo gasoso e então diluída em uma proporção 10:1 e a chama a 250°C. Foi utilizada uma coluna de 30 m x 0,250 mm de sílica fundida do tipo G16 revestida com partículas 0,50µm e fluxo do

gás hélio de 2mL/minuto. O cromatógrafo foi inicialmente programado à temperatura de 40 °C por 2 minutos, e a temperatura foi aumentada a uma taxa de 20 °C por minuto até 130 °C e mantida a 130 °C por 3 minutos. A porta de injeção e as temperaturas do detector foram mantidas a 250 °C e 300 °C, respectivamente (USP, 2018; FB, 2019).

Como critério de aceitação para conteúdo de acetonitrila, utilizou-se o mesmo da monografia do radiofármaco fludesoxiglicose (18 F) da Farmacopeia Brasileira, sendo que a amostra analisada não deveria apresentar resultados de acetonitrila superior a 410 µg/mL⁻¹ (410 ppm) ou 0,04 % (USP, 2018; FB, 2019; DRAFT, 2017).

Quanto ao critério de aceitação para o etanol, utilizou-se o mesmo da monografia do radiofármaco Fluoromisonidazol (FMISO-¹⁸F) e Fludesoxitimidina (FLT-¹⁸F) descrito na Farmacopeia Europeia, pois no processo de síntese destes radiofármacos o produto final também é eluído do cartucho em álcool. A amostra analisada não deveria apresentar resultados de etanol superior a 10% (FE, 2019; DRAFT, 2017).

5.3.4.8 Determinação de Endotoxinas Bacterianas

Foi realizado o teste LAL (GEL CLOT), que se trata de um ensaio semi-quantitativo. Foram adicionados volumes iguais de reagente LAL (extrato aquoso de células sanguíneas do caranguejo *Limulus polyphemus*) e do radiofármaco FES-¹⁸F (0,1 mL) em três tubos de ensaio. A mistura foi homogeneizada e incubada em banho de água a 37 °C por uma hora. Removeu-se os tubos do banho e procedeu-se à inversão dos mesmos a 180 graus. (USP, 2018; FB, 2019; FUKUMORI, 2008).

O resultado foi interpretado como negativo ou positivo na sensibilidade de $\lambda = 0,125$ UE mL⁻¹, sendo negativo quando caracterizado pela ausência do gel ou não formação de massa viscosa no fundo do tubo e positivo quando ocorresse a formação do gel firme, capaz de se manter formado quando o tubo era invertido.

A Farmacopeia Brasileira (FB, 2019), Americana (USP, 2018) e Europeia (FE, 2019) descrevem o limite aceitável para os radiofármacos de 175 UE/dose sendo que o cálculo da dose é realizado por mL do produto.

O teste requer uma série de diluições prévias, em diferentes concentrações, para validar a quantidade de LAL adicionada ao frasco de reação (FUKUMORI, 2008).

5.3.4.9 Determinação do pH do produto final

O pH do produto foi determinado utilizando-se fitas indicadoras. O critério de aceitação para o produto considerou a faixa estabelecida na monografia do radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) da Farmacopeia Brasileira é de 4,5 – 7,5 e no Draft do FES- ^{18}F é entre 6,0 – 8,0 (DRAFT, 2017).

5.3.4.10 Ensaio de Esterilidade do produto final

Para o ensaio foram utilizados como meio de cultura o caldo de tioglicolato fluído, para crescimento de bactérias anaeróbicas e aeróbicas, e o meio de caseína soja (TSB), adequado para cultura de fungos e bactérias aeróbicas. O método de inoculação direta empregado está descrito na Farmacopeia Brasileira. Para o produto ser considerado estéril, não pode haver turvação do meio de cultura, representativa de crescimento microbiano, após 14 dias de incubação (FB, 2019).

5.3.5 Estudo de Estabilidade

A estabilidade do FES- ^{18}F foi avaliada armazenando-se o “frasco mãe” do produto à temperatura ambiente e avaliando-se a qualidade do produto por um período de 6 horas após a síntese. A cada hora (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a hora) alíquota do produto foi retirada e os ensaios de Pureza Radioquímica foram repetidos e na 6^a hora foram realizados todos os ensaios de qualidade previstos para o produto final. O estudo de estabilidade visou determinar o prazo de validade do produto. Para esse estudo foram verificados o Rf e a Pureza Radioquímica do produto por CCD-SG (USP, 2018).

5.3.6 Validação do método analítico de determinação de Pureza Radioquímica do FES-¹⁸F

Realizou-se a validação do método de análise da Pureza Radioquímica do FES-¹⁸F por cromatografia em camada delgada, utilizando-se tiras de alumínio (1,5 x 10 cm) recobertas com sílica gel 60 (TLC-SG) como fase estacionária e acetonitrila/água 95% como fase móvel. O R_f do produto e da Impureza Radioquímica estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 - Fator de retenção para as espécies radioquímicas.

Espécie Radioquímica	RF
FES- ¹⁸ F	0,9 - 1,0
¹⁸ F ⁻	0,1

Fonte: Autor

Os seguintes parâmetros foram analisados em amostra de um único lote do produto (BRASIL, RDC 166 de 24 de julho de 2017):

5.3.6.1 Precisão – Repetibilidade e Precisão Intermediária

A repetibilidade do método foi verificada em seis determinações (preparos) provenientes de uma mesma amostra do produto, por dois analistas diferentes. Foi realizado o cálculo do desvio padrão dos ensaios e para o estudo de precisão intermediária foi realizado o cálculo de variância. No critério de aceitação estabelecido, a Pureza Radioquímica do produto deveria estar acima de 95,0%, sendo considerado um desvio padrão relativo $\leq 5\%$ para os ensaios de Repetibilidade e Precisão Intermediária (INMETRO, 2007; RELACRE, 2000). Os fatores de retenção (R_f) do produto e da impureza não deveriam sofrer alteração. Os cálculos foram realizados utilizando o programa *Action Stat Pharma (Excel)* realizando a análise de Precisão.

5.3.6.2 Seletividade

Para avaliação do parâmetro seletividade, realizou-se diluição das amostras de FES- ^{18}F e de fluoreto ($[\text{}^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$) para obter concentração de cerca de 37 MBq /mL (1,0 mCi/mL);

Matéria Prima 1 (MP1) – Acetonitrila - Preparou-se uma solução com 410 ppm de acetonitrila em 20 μL .

Matéria Prima 2 (MP2) - Tetrabutylamonio (TBA-HCO_3) - Preparou-se uma solução com 2,6 mg de TBA-HCO_3 em 20 μL .

As soluções de análise (soluções teste) foram preparadas a partir das combinações descritas na Tabela 6 a seguir. Amostras das soluções teste foram aplicadas nas fitas para o desenvolvimento cromatográfico.

Tabela 6- Soluções Teste para os estudos de Seletividade

Preparo das soluções de análise				
Solução	Produto FES- ^{18}F	Amostra da MP radioativa (MP _r) Fluoreto ($[\text{}^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)	MP1 Acetonitrila	MP2 TBA-HCO_3
Solução teste 1	0,1 mL	Não	Não	Não
Solução teste 2	Não	0,1 mL	Não	Não
Solução teste 3	0,1 mL	0,1 mL	Não	Não
Solução teste 4	0,1 mL	Não	20 μL	Não
Solução teste 5	Não	0,1 mL	20 μL	Não
Solução teste 6	0,1 mL	Não	Não	20 μL
Solução teste 7	Não	0,1 mL	Não	20 μL

Fonte: Autor

Os critérios de aceitação encontram-se descritos na tabela 7 e os resultados gráficos foram realizados utilizando o programa Excel.

Tabela 7- Critérios de aceitação para os ensaios de seletividade.

Solução	Critérios de aceitação
Solução teste 1	% PR $\geq$ 95%
Solução teste 2	Rf Fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$) = 0,1
Solução teste 3	Sem interferência da MPr no Rf do FES- ^{18}F
Solução teste 4	Sem interferência da MP1 no Rf do FES- ^{18}F
Solução teste 5	Sem interferência da MP1 no Rf do Fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)
Solução teste 6	Sem interferência da MP2 no Rf do FES- ^{18}F
Solução teste 7	Sem interferência da MP2 no Rf do Fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)

Fonte: Autor

5.3.6.3 Linearidade

Na avaliação da linearidade, foram realizadas cinco diferentes preparações do FES- ^{18}F contemplando a faixa de trabalho de 5% a 120%, em relação à atividade requerida, conforme tabela 8. As leituras das amostras foram realizadas em triplicata (INMETRO, 2007; RELACRE, 2000).

Tabela 8- Concentrações radioativas do FES- ^{18}F para o estudo de linearidade.

Diluições				
1	2	3	4	5
5%	10%	50%	100%	120%
1,85	3,7	18,5	37	44,4
MBq /mL	MBq /mL	MBq /mL	MBq /mL	MBq /mL
(50$\mu\text{Ci/mL}$)	(100$\mu\text{Ci/mL}$)	(500$\mu\text{Ci/mL}$)	(1,0 mCi/mL)	(1,2 mCi/mL)

Fonte: Autor

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa *Action Stat Pharma* (Excel) realizando a análise da linearidade, avaliando o coeficiente linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

Como critério de aceitação, os resultados das contagens de cada amostra preparada devem ser diretamente proporcionais à concentração de FES-¹⁸F e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (INMETRO, 2007; RELACRE, 2000). O fator de retenção (R_f) do produto nas diferentes diluições não deve sofrer alteração.

5.3.6.4 Intervalo/ Faixa de trabalho

Para a determinação da faixa de trabalho avaliaram-se os resultados obtidos nos ensaios linearidade. Como critério de aceitação, o fator de retenção (R_f) do produto nas diferentes diluições não deve sofrer alteração e a média da triplicata não pode ser inferior a 95 %, corroborando com o ensaio de precisão que também compreende o limite mínimo de 95 % (INMETRO, 2007; RELACRE, 2000).

5.3.6.5 Robustez

Para avaliar a robustez do ensaio, foram realizados dois experimentos em triplicata, correlacionando as possíveis variáveis de concentração radioativa 37 MBq /mL e 18,5 MBq /mL (1,0 mCi/mL e 0,5 mCi/mL) e de volume de amostra aplicado na fita cromatográfica (5 µL e 2 µL). A combinação pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9 - Combinação de variáveis para o ensaio de Robustez.

Condições das variáveis				
Variável	Experimentos			
	1	2	3	4
A a	A	a	A	a
B b	B	B	b	b
Resultados	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄

Fonte: Autor

O cálculo do efeito de cada variável foi realizado utilizando-se o programa *Action Stat Pharma* (Excel) realizando a análise de Robustez com o teste de Youden, para avaliação multivariada.

Como critério de aceitação, o fator de retenção (Rf) do produto nas diferentes diluições não deve sofrer alteração e a média da triplicata não pode ser inferior a 95 %, independente das variáveis, o p-valor deve ser >0,05 mantendo a hipótese nula, sendo que, quanto mais próximo de zero, mais robusto é o método (BRASIL, RDC 166 de 24 de julho de 2017; INMETRO, 2007; RELACRE, 2000).

5.3.7 Estudos Pré-Clínicos

Todos os experimentos descritos neste trabalho envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) do IPEN em maio de 2017, projeto número 192/17.

5.3.7.1 Biodistribuição em animais sadios

Os estudos em animais sadios foram realizados em camundongos *BALB-c*. Foram separados grupos contendo 05 (cinco) animais para serem eutanasiados e dissecados nos tempos de 30, 60 minutos e 2 horas, após a administração do radiofármaco, totalizando 15 animais (DRAFT, 2017; ZANETTE, 2013).

Os animais foram pesados e identificados conforme o grupo e o radiofármaco FES-¹⁸F foi administrado com atividade de 6,5 MBq/100 µL (150 µCi/100 µL) por via endovenosa caudal. Conforme os tempos a serem estudados, os animais foram anestesiados com isoflurano por via respiratória. A eutanásia ocorreu por deslocamento cervical. No procedimento de dissecação, para o estudo, foram retiradas amostras de sangue e os seguintes órgãos/tecidos: coração, pulmão, pâncreas, baço, estômago, fígado, rins, intestinos, músculo, osso, cérebro, ovário e útero, que posteriormente foram lavados, pesados e levados ao contador gama tipo poço (Cobra, Packard Instrument) para determinar a radioatividade em cada órgão ou tecido (ZANETTE, 2013; BISPO et al., 2017b).

A captação nos tecidos ou órgãos foi calculada utilizando a porcentagem da atividade injetada por grama do órgão/tecido ou mL de sangue, e por órgão/tecido (%AI/g e %AI/órgão), conforme as seguintes fórmulas:

$$\%AI/\text{órgão} = \frac{\text{cpm órgão}}{(\text{cpm padrão} - \text{cpm na cauda})} \times 100 \quad \text{EQ. 4}$$

$$\%AI/g = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times (\text{cpm padrão} - \text{cpm na cauda})} \times 100 \quad \text{EQ. 5}$$

Para cálculo da porcentagem de atividade injetada presente nos músculos (%AI/músculo) dos animais, retirou-se segmento do músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a porcentagem de atividade por grama e assumiu-se o peso dos músculos como 40 % (EQ. 4) do peso corpóreo do camundongo (ZANETTE, 2013)

$$\%AI (\text{Músculo total}) = \frac{\text{cpm musculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso músculo(g)} \times (\text{cpm padrão} - \text{cpm na cauda})} \times 100$$

EQ. 6

Para corrigir o decaimento radioativo do radionuclídeo, foi analisado, simultaneamente aos órgãos ou tecidos, uma solução padrão correspondente à atividade administrada do produto (DRAFT, 2017; ZANETTE, 2013; BISPO et al., 2017b). A atividade da cauda também foi contada, para corrigir possíveis depósitos do radiofármaco FES-¹⁸F.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism 5.0 R* (GraphPad Software, Inc) e expressos como média e desvio padrão e o programa *Action Stat Pharma* (Excel) para o cálculo do teste T de amostras independentes.

5.3.7.2 Cultivo das células tumorais

As células de adenocarcinoma de mama humano ER+ (MCF-7) foram cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN, conforme o seguinte protocolo:

As células ATCC® HTB-22™ foram cultivadas a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio de cultura DMEM-High Glucose (Life Technologies, NY,EUA) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, NY,EUA), 100 mg/mL de mistura de antibióticos penicilina/ estreptomicina (Gibco Life Technologies, NY,EUA) e 44 nM de bicarbonato de sódio (Synth, SP,Brasil)

5.3.7.3 Desenvolvimento do modelo tumoral

Estudos preliminares de desenvolvimento tumoral em camundongos imunodeficientes (*Scid*) foram realizados em quatro grupos de quatro animais, sendo dois grupos de desenvolvimento tumoral ortotópico (A e B) e dois grupos de desenvolvimento tumoral heterotópico (C e D).

Antes da inoculação de células tumorais, fez-se necessária a administração de hormônio estradiol nos animais (DALL, 2015; GORDON, 1986) que se seguiu da seguinte forma:

- Grupo de camundongos A: Modelo ortotópico na quarta mama esquerda, recebeu administração prévia de 5 mg de hormônio injetável via intramuscular e repetido semanalmente (HEIDARI, 2015).
- Grupo de camundongos B: Modelo ortotópico na quarta mama esquerda, recebeu administração prévia de 5 mg de hormônio via oral; o pó foi diluído em 500 µL de álcool e posteriormente a 1000 mL de água para injetáveis; com preparo e troca semanal (GORDON, 1986).
- Grupo de camundongos C: Modelo ectotópico no dorso lateral esquerdo recebeu administração prévia de 5 mg de hormônio via oral; o pó foi diluído em 500 µL de álcool e posteriormente a 1000 mL de água para injetáveis; com preparo e troca semanal (GORDON, 1986).
- Grupo de camundongos D: Modelo ectotópico no flanco superior esquerdo recebeu administração prévia de 5 mg de hormônio via oral; o pó foi diluído em 500 µL de álcool e posteriormente a 1000 mL de água para injetáveis; com preparo e troca semanal (GORDON, 1986).

Após a primeira semana de suplementação hormonal foram inoculados com 5x10⁶ células tumorais de adenocarcinoma mamário MCF-7 (HEIDARI, 2015).

Quando o tumor atingiu o tamanho desejado, palpável não mensurável, aproximadamente 17 dias após a inoculação, os animais foram preparados para o ensaio de biodistribuição.

5.3.7.4 Biodistribuição em animais com modelo tumoral

A partir do modelo tumoral proposto dos camundongos do grupo D, foi realizado o estudo de biodistribuição seguindo as mesmas condições propostas para o estudo de biodistribuição em animais sadios.

O grupo bloqueio recebeu 5 mg de hormônio injetável via intramuscular 24 horas antes do estudo de biodistribuição.

Para o estudo de biodistribuição, os animais receberam uma dose do radiofármaco FES-¹⁸F de 6,5 MBq/100 μ L (150 μ Ci /100 μ L) por via endovenosa caudal e foram eutanasiados nos tempos determinados (30, 60 minutos, 60 minutos com bloqueio e 2 horas), sendo quatro animais por tempo. A contagem da radioatividade em todos os órgãos e tecidos foi realizada utilizando o contador gama tipo poço (Cobra, Packard Instrument) (ZANETTE, 2013).

Os cálculos de captação foram realizados da mesma forma que na biodistribuição em animais sadios, analisando os resultados da captação nos tecidos ou órgãos e também no tumor, calculando a porcentagem da atividade injetada por grama do tecido/órgão ou mL de sangue e por órgão/tecido/tumor (%AI/g e %AI/órgão). Para corrigir o decaimento radioativo do radionuclídeo, foi analisado simultaneamente aos órgãos ou tecidos uma solução padrão, representando a atividade administrada do produto (DRAFT, 2017; ZANETTE, 2013; BISPO, 2017b).

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism 5.0 R* (GraphPad Software, Inc) e expressos como média e desvio padrão.

Um estudo de imagem PET/CT com o radiofármaco FES-¹⁸F foi realizado em dois camundongos *Scid* fêmeas, com tumor de células MCF-7. Quando o tumor atingiu o tamanho desejado, palpável não mensurável, os animais receberam uma dose de 6,5 MBq/100 μ L (150 μ Ci) do radiofármaco FES-¹⁸F. Imediatamente após a administração da dose, imagens sequenciais

foram adquiridas no equipamento micro-PET/CT Albira do Centro de Radiofarmácia, por período de 90 minutos. As imagens foram reconstruídas e analisadas observando, principalmente, a captação no tumor e a eliminação do composto (ZANETTE, 2013; HEIDARI, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Análise do Processo de Produção utilizando o FMEA

O presente estudo teve como enfoque a FMEA aplicada ao processo de produção do radiofármaco FES-¹⁸F. Pretendeu-se com o trabalho reconhecer as falhas potenciais que poderiam advir neste processo, bem como identificar ações que poderiam eliminar ou reduzir a chance de ocorrência dessas falhas.

Com base nesta análise de risco, foi elaborado um documento interno do Centro de Radiofarmácia do IPEN, intitulado de **Protocolo de Validação de Processo do Flúor Estradiol FES-¹⁸F – Módulo de Síntese GE**. O Protocolo de Validação de Processo foi elaborado tendo como objetivo demonstrar, por testes e evidências, que o processo utilizado na produção no módulo de síntese GE e envase asséptico do produto FES-¹⁸F pode ser considerado reproduzível e consistente, de acordo com os requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF) em conformidade com a legislação vigente (RDC 301 de 21 de agosto de 2019 e Instrução Normativa IN nº 37 de 21 de agosto de 2019, ANVISA).

O protocolo contempla os requisitos para a validação do processo produtivo e será futuramente executado pelos operadores do processo de produção de moléculas marcadas do Centro de Radiofarmácia do IPEN, incluindo o acompanhamento das seguintes fases:

- Preparação do módulo de síntese GE;
- Síntese do FES-¹⁸F;
- Filtração do FES-¹⁸F;
- Transferência do FES-¹⁸F entre prédios;
- Expedição do produto final.

A partir dessas etapas, foram identificados 27 (vinte e sete) modos de falhas (riscos), sendo 10 (dez) ALTOS, 4 (quatro) MEDIOS e 13 (treze) BAIXOS. Foram analisados os NPR's (Número de Prioridade de Risco) de cada modo de falha, sendo identificados e priorizados os que apresentavam maiores riscos à qualidade do processo conforme tabela 4 da parte de materiais e métodos. A partir desse levantamento, foram propostas e implantadas as seguintes ações para mitigar esses riscos:

- Análises dos registros dos equipamentos e instrumentos;
- Calibração do Instrumento;
- Verificação do Certificado do Fornecedor;
- Cumprimento de procedimento / Treinamento;
- Dupla checagem;
- Utilização de Filtro na linha;
- Formulário *Check List*;
- Formulário de verificação de cela;
- Verificação Diária das linhas e instrumentos;
- Manutenção da linha de gases;
- Monitoramento Ambiental;
- Monitoramento da Depressão;
- Periodicidade de troca de mangueiras;
- Plano de Qualificação e Calibração;
- Qualificação do Equipamento;
- Qualificação do Fornecedor.

Com a aplicação das ações de mitigação, observou-se a diminuição dos NPRs. Descrevemos dois exemplos que demonstram a redução dos NPRs. Na tabela 10, apresentamos o item 10, risco postulado de “Não limpeza da cela antes de iniciar o processo”, no preparo da cela de produção, as ações de mitigação reduziram o nível de ocorrência e aumentaram o nível de detecção, reduzindo o NPR. Tal redução ocorreu devido à implantação de uma lista de checagem que contemplou a limpeza da cela e módulo de produção antes da produção. Com isso o NPR passou de 32 (Alto) para 4 (Baixo).

No caso do item 11, apresentado na tabela 1, risco postulado, “Falha na conexão da mangueira de envio da cela”, no preparo da cela de produção, a lavagem da linha antes do processo de produção, possibilitou aumentar o nível de detecção. Com essa ação, foi possível detectar eventual falha na transferência do material antes da produção, evitando uma possível perda do produto FES- ^{18}F , fazendo com que o NPR passasse de 24 (Alto) para 5 (Baixo). Para facilitar o entendimento, a Tabela 10 demonstra, de forma resumida, como foi aplicada a ferramenta FMEA de Processo. Nesta tabela são apresentados os dois itens descritos acima. As informações destacadas na primeira coluna de NPR (32 e 24) correspondem aos resultados antes das ações (NPR alto) e os destacados na segunda coluna de NPR (4 e 5) correspondem aos resultados após as ações (NPR baixo).

Tabela 10- Parte resumida no desenvolvimento de uma planilha FMEA

Análise de Riscos											
Item	Etapa/ Processo	Descrição do Risco (Modo e/ou efeito)	Índices			(NPR)	Ações Implantadas Ocorrência	Índices			(NPR)
			Severidade	Ocorrência	Deteção			Severidade	Ocorrência	Deteção	
10	Preparo de Celas	<u>Não limpeza da cela antes de iniciar o processo</u> Contaminação do produto	2	4	4	32	Implantação do check-list diário contemplando limpeza da cela	2	1	2	4
11		<u>Falha na conexão da mangueira de envio da cela</u> Vazamento do produto e perda da produção	5	1	5	24	Lavagem da linha de transferência antes da produção	5	1	1	5

Fonte: Autor

A partir desta tabela foi possível verificar que a utilização de ações adequadas e o envolvimento de profissionais treinados no procedimento produtivo, possibilitou a obtenção de resultados de processo reprodutíveis.

6.2 Obtenção do Flúor

Os dados das irradiações realizadas neste trabalho para a síntese do radiofármaco FES- ^{18}F podem ser observados na tabela 11. O tempo de irradiação e a atividade de produção do [^{18}F] durante os experimentos variou entre 60 e 140 minutos e 34,7 e 160,6 GBq (0,9 e 4,3 Ci) e todas as irradiações foram realizadas no porta-alvo de baixo volume (2,6 mL).

Tabela 11- Dados das irradiações realizadas no ciclotron de 18 MeV – IPEN

Nº	Data	Tempo de irradiação (min)	Corrente média (μA)	Dose (μAh)	Atividade de ^{18}F - (GBq)	Atividade de ^{18}F - (mCi)
1	17/04/2019	120	50	50	160,6	4340
2	14/05/2019	140	32	75	116,6	3150
3	13/06/2019	130	50	110	154,8	4184
4	10/10/2019	70	45	53	67,8	1832
5	31/10/2019	60	50	50	34,7	936
6	23/01/2020	60	50	50	85,7	2317
7	29/01/2020	60	50	50	83,6	2260
8	27/02/2020	60	50	50	86,4	2335

Fonte: Autor

6.3 Síntese Automatizada de FES- ^{18}F

Primeiramente, foi instalada a programação no módulo conforme indicação do fabricante dos Kits (ABX, 2016).

Posteriormente, foram realizados testes “a frio” (sem uso de material radioativo), visando o entendimento e implantação do Kit comercial e para realizar a qualificação do módulo para a síntese de FES- ^{18}F .

Os resultados dos testes de qualificação de operação demonstraram que o módulo de síntese automatizado Tracerlab da G.E. operou de forma inadequada, precisando de ajuste no software da síntese automatizada do FES- ^{18}F .

A primeira produção mostrou que a válvula 3 do cassete nas etapas intituladas de *Transferring acetonitrile to the reactor* abriu, contudo, o volume de

acetonitrila do frasco não saiu, mesmo com todos os testes do módulo em conformidade. Analisando a planilha (Excel) de programação, verificou-se que ao mesmo tempo em que a válvula 3 abria, a válvula 4 também abria, impossibilitando a saída do volume de acetonitrila. Foi então realizada uma modificação na planilha, retirando a abertura da válvula 4 nessas etapas.

Outro ajuste realizado foi a inclusão de passos adicionais na etapa de '*Transfer product*', devido à distância entre a cela de produção e a cela envase na infraestrutura de produção do IPEN. Foi necessário esse ajuste para garantir o envio do volume total produzido. Após os ajustes, a planilha de programação mostrou-se adequada do ponto de vista operacional. Bispo e colaboradores (Bispo et al., 2019) também relataram a necessidade de melhorias na planilha de programação, porém não descreveram as modificações realizadas. Deste modo, observa-se a importância da verificação prévia da planilha de síntese, de modo a demonstrar sua adequabilidade ao módulo e instalação de produção disponíveis.

Realizou-se uma análise minuciosa de todos os componentes e materiais que são fornecidos pela ABX. Os cassetes são estéreis para uso único, como mostra a figura 8. A cada síntese, um novo cassete foi utilizado, evitando o risco de contaminações cruzadas entre os diferentes radiofármacos e diferentes produções produzidas no mesmo módulo automatizado.

Cada parte do Kit vem separada conforme as etapas de montagem no módulo e estão separadas conforme mostrado na figura 9.

- 1- Eluente, QMA[®], Funil;
- 2- Acetonitrila;
- 3- Seringa de 30 mL;
- 4- Acetonitrila, precursor MMSE, seringa 3 mL, agulha;
- 5- Etanol 40%, 110 mL;
- 6- Água para injetáveis 20 mL;
- 7- Etanol 95%;
- 8- Etanol / Ácido Sulfúrico 3 mL;
- 9- Cartucho purificação Sep-Pak[®] Alumina-N;
- 10- Cartucho purificação Oasis[®] WAX, Oasis[®] HLB, Sep-Pak[®] C18;
- 11- Frasco Final, filtro Cathivex[®], filtro Milex[®];

Todo material foi fornecido conforme regulamentam as BPF (Boas Práticas de Fabricação), em dupla embalagem, para promover a transferência para a área limpa controlada de produção.

A figura 10 mostra o cassete e Kit de FES- ^{18}F já montado no módulo TracerLab MX[®]FDG GE.

Figura 8 - Cassete de FES- ^{18}F para montagem no módulo de síntese TracerLab MX[®]FDG - GE.

Fonte: Autor

Figura 9 - Conteúdo do Kit para montagem do módulo de síntese TracerLab MX[®]FDG GE FES- ^{18}F

Fonte: Autor

Figura 10 - Kit e cassete de FES- ^{18}F montados no módulo TracerLab MX $^{\text{®}}$ FDG GE.

Fonte: Autor

Foram realizadas oito sínteses, sendo três com alta atividade, com atividade de água enriquecida irradiada ($[^{18}\text{F}]\text{H}_2\text{F}^+$) medida na entrada no módulo de 116,6 a 160,6 GBq (3150 a 4340 mCi). O rendimento de marcação variou de 11,1 a 13,3% (sem considerar o decaimento). Outras cinco produções, consideradas de baixa atividade, produziram atividade medida de água enriquecida irradiada ($[^{18}\text{F}]\text{H}_2\text{F}^+$) na entrada do módulo entre 34,7 e 86,4 GBq (936 e 2335 mCi). O rendimento de marcação foi entre 8 e 14,1% (sem considerar o decaimento). O tempo de processo foi de 75 minutos. A tabela 12 apresenta os rendimentos das produções sem e com a correção pelo decaimento.

Tabela 12- Rendimento das sínteses de FES-18F no módulo TracerLab MX®FDG GE sem e com correção de decaimento

Síntese	Atividade Inicial		Atividade Final		Rendimento (%)	Rendimento Corrigido (%)*
	mCi	GBq	mCi	GBq		
1	4340	160,6	579	21,4	13,3	21,8
2	3150	116,6	352	13,0	11,1	18,2
3	4184	154,8	500,3	18,5	12,0	17,3
4	1832	67,8	237	8,75	12,9	21,1
5	936	34,7	132,2	4,9	14,1	23,1
6	2317	85,7	187,8	7,0	8,1	13,3
7	2260	83,6	307,6	11,4	13,6	22,3
8	2335	86,4	259	9,6	11,1	18,2

* O fator de correção utilizado foi de 78 minutos (0,6111).

Fonte: Autor

A média dos rendimentos das irradiações de alta atividade (sínteses 1, 2 e 3) foi de 12,1 %, praticamente igual à média dos rendimentos de baixa atividade (sínteses 4, 5, 6, 7 e 8), que resultou em 11,9%, ou seja, a atividade de entrada de flúor-18 no módulo, dentro dos limites estudados, não influenciou no rendimento da síntese.

A ABX (ABX, 2016) produtora dos kits utilizados, referência um rendimento de síntese de 15% (não corrigido). Diversos autores (KNOTT et al., 2011; DIXIT et al., 2013; OH et al., 2007; ZHOU et al., 2014; MORI et al., 2015) descreveram rendimentos de 20% sem correção do decaimento, mas Bispo e colaboradores (Bispo et al., 2019), descreveram rendimentos semelhantes ao encontrado neste trabalho e relataram que para atingir rendimentos da ordem de 20% com o protocolo de síntese descrito por Knott e colaboradores (KNOTT et al., 2011) e utilizando software da ABX (ABX, 2016), foram necessárias alterações na temperatura da reação de marcação e no volume transferido da solução do reator.

Outros estudos mostraram que a utilização do Kryptofix (K_{222}) e alterações na quantidade de TBA- HCO_3 como agente de transferência não demonstraram variações significativas no rendimento (BISPO et al., 2019; OH et al., 2007; MORI et al., 2005).

Um fator que pode explicar a diferença de rendimento observada neste trabalho quando comparada aos resultados publicados na literatura (KNOTT et al., 2011; DIXIT et al., 2013; OH et al., 2007; ZHOU et al., 2014; MORI et al., 2015) refere-se ao fato de que a medida da atividade de flúor-18 na entrada do módulo é realizada de forma estimada, apenas pelo detector de radioatividade do módulo de síntese, enquanto que a atividade do produto acabado é efetivamente medida em um activímetro.

Apesar do rendimento relativamente baixo da síntese do FES-¹⁸F, um lote produzido a partir de uma atividade de entrada de flúor-18 de 148GBq (4 Ci) produziu cerca de 17,8 GBq (480 mCi) do radiofármaco. Considerando-se que a atividade de FES-¹⁸F normalmente empregada em procedimentos clínicos para um paciente de 70 Kg está entre 140 e 280 MBq (3,78 e 7,57 mCi), um lote de produção produziria cerca de 63 doses (ESTROTEP, 2020), sem considerar o fator de decaimento para transporte, que depende da distância entre o centro produtor e a instituição clínica.

6.4 Controle de Qualidade

6.4.1 Avaliação da metodologia empregada no ensaio de controle de Pureza Radioquímica CCD-SG e CLAE

Os ensaios de controle de qualidade selecionados para avaliação da Pureza Radioquímica das marcações foram a cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (FELTES, 2011). O método de CCD-SG foi testado com diferentes fases móveis.

Foi realizada a análise do fluoreto [¹⁸F], de modo a estabelecer o perfil cromatográfico desta espécie radioquímica, considerada Impureza Radioquímica no processo de síntese do FES-¹⁸F. A Figura 11 mostra o perfil de CCD-SG do fluoreto em todas as fases móveis testadas.

A figura 12 ilustra o perfil de CCD-SG realizado no TLC-Scan (LabLogic, EUA) do fluoreto (¹⁸F⁻), representativo para todas as fases móveis utilizadas.

Figura 11 - Cromatograma da CCD-SG do ^{18}F -, representativo para todas as fases móveis utilizadas. $R_f=0,1$

Fonte: Autor

Figura 12 - Cromatograma TLS-Scan utilizando CCD-SG do ^{18}F -, representativo para todas as fases móveis utilizadas. $R_f=0,1$

Fonte: Autor

Observou-se para o sistema com fase móvel acetonitrila 95% (figura 13), uma melhor capacidade de separação do produto final e sua impureza, quando

comparado ao sistema metanol:amônia 95:5 (figura 14). O sistema etanol:metanol 1:1 (figura 13) também demonstrou boa separação das espécies, porém, escolheu-se o sistema com acetonitrila 95% por ser a mesma fase móvel do sistema CLAE e por ser a mesma referenciada na farmacopeia brasileira para o radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) (FB, 2019). As corridas em CCD, realizadas com esse solvente, decorreram no intervalo de aproximadamente 25 minutos.

O fator de retenção do produto $\text{FES-}^{18}\text{F}$ nas diferentes fases móveis podem ser observados nas figuras 13, 14 e 15. A figura 16 ilustra o cromatograma realizado no TLC-Scan (LabLogic, EUA) do $\text{FES-}^{18}\text{F}$, utilizando a fase móvel acetonitrila:água 95%.

Figura 13 -Perfil cromatográfico do $\text{FES-}^{18}\text{F}$ em CCD-SG com a fase móvel acetonitrila 95%; $R_f = 0,9 - 1,0$

Fonte: Autor

Figura 14 - Perfil cromatográfico do FES-¹⁸F em CCD-SG com a fase móvel etanol/metanol 1:1 v/v; Rf= 0,9 – 1,0

Fonte: Autor

Figura 15 - Perfil cromatográfico do FES-¹⁸F em CCD-SG com a fase móvel metanol:amônia 95:5; Rf= 0,6 – 1,0

Fonte: Autor

Figura 16 - Cromatograma TLS-Scan do FES- ^{18}F , utilizando acetonitrila:água 95% como fase móvel. $R_f=0,9 - 1,0$

Fonte: Autor

O perfil cromatográfico para o FES- ^{18}F , apresentado na figura 17, foi obtido a partir do sistema cromatográfico de CLAE selecionado (BISPO et al., 2017a), apresentando boa resolução do pico desta espécie radioquímica. O tempo de retenção (t_R) obtido (entre 15 e 17 minutos) está de acordo com o esperado para uma espécie hidrofílica, considerando o sistema de fase reversa empregado e compatível com a literatura (BISPO et al., 2019; BISPO et al., 2017a). A figura 18 demonstra o perfil cromatográfico do fluoreto, impureza radioativa do produto final, no mesmo sistema de CLAE (ZANETTE, 2013).

Figura 17 - Perfil cromatográfico do FES- ^{18}F em CLAE, utilizando-se coluna de fase reversa C_{18} e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1mL/min por 30 minutos

Fonte: Autor

Figura 18- Perfil cromatográfico do [^{18}F] em CLAE utilizando-se coluna de fase reversa C_{18} e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1 mL /min por 30 minutos

Fonte: Autor

As análises de CLAE foram programadas para 30 minutos, no entanto, o produto e as possíveis impurezas aparecem antes dos 20 minutos, o que pode-se concluir a possibilidade de diminuir o tempo de corrida e com isso liberar esse controle de qualidade mais rapidamente, o que é bem importante tratando-se de um radiofármaco de meia vida curta. Quanto às análises de CCD, o tempo de corrida para o sistema escolhido foi de 25 minutos e mostrou ser um bom método, pois separou o produto da sua impureza e, também, considerando que o volume de solvente utilizado para o CCD é bem menor do que para o CLAE, conclui-se que seja o método de escolha e com um baixo custo.

Como já mencionado, o FES- ^{18}F é um radiofármaco produzido em módulo automatizado, com sistema de purificação constituído de cartuchos pré-condicionados (QMA, Oasis[®] WAX, Sep-Pak[®] C18, Oasis[®] HLB, Sep-Pak[®] Alumina-N), que removem as impurezas radionuclídicas, químicas e subprodutos do processo de síntese, garantindo uma Pureza Radioquímica alta do produto final.

QMA Plus Light é um cartucho de troca iônica, aniônico forte, com o CO_3^{2-} como íon trocador e a base é de sílica hidrofílica, com tamanho de poro largo (300Å). O cartucho é utilizado para extração de íons aniônicos em soluções (aquosa), retendo os ânions e deixando passar os cátions e alguns contaminantes metálicos (WATERS, 2019; MARENGO et al., 2008).

Os Cartuchos da linha Oasis[®] WAX e HLB, são produtos de Extração de Fase Sólida (SPE) (WATERS, 2019) responsáveis pela remoção de algumas impurezas metálicas e inorgânicas (TODOROV et al., 2019); OASIS WAX[®] é uma resina de troca aniônica lipofílica fraca com um mecanismo de retenção de modo misto (troca de íons e fase reversa) (FEDOROVA et al., 2018).

Os últimos cartuchos, Sep-Pak[®] C18 e Sep-Pak[®] Alumina-N, são cartuchos de fase reversa, utilizados para remover os contaminantes iônicos (DZIEL et al., 2016).

Os resultados de Pureza Radioquímica dos oito lotes produzidos de FES- ^{18}F podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13- Resultado da Pureza Radioquímica dos lotes produzidos de FES-¹⁸F

Sínteses de FES- ¹⁸ F	% Pureza Radioquímica	Média	Desvio Padrão	CV%	Critério Farmacopeia Brasileira
1	97,4				
2	98,6				
3	97,4				
4	99,4	98,6	0,59	1%	≥ 95%
5	98,8				
6	98,9				
7	99,6				
8	98,6				

Fonte: Autor

Foi adotado o critério de aceitação estabelecido em monografia do radiofármaco fludesoxiglicose (¹⁸F) (≥ 95%) (FB, 2019; USP, 2018), considerando-se que ambos são empregados em procedimentos diagnósticos em PET e são produzidos com o mesmo radioisótopo. Bispo e colaboradores (BISPO et al., 2017a) relataram Pureza Radioquímica média de 94,3% para o FES-¹⁸F, inferior à média observada neste estudo (98,6 ± 0,59%).

Vale ressaltar que neste estudo, não houve diferença significativa para a Pureza Radioquímica do produto FES-¹⁸F nas diferentes sínteses, conforme o cálculo do coeficiente de variação de 1%.

6.4.2 Ensaio de identificação radionuclídica

Após as três medidas da atividade de uma amostra do produto FES-¹⁸F no mesmo activímetro, com intervalos de 10 minutos cada, calculou-se o ln das atividades e construiu-se um gráfico ln atividade (A) x horário de medição (t) obtendo-se a equação da reta:

$$\ln \text{atividade} = a + b \times t \quad \text{EQ. 7}$$

Onde:

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

Com isso, o tempo de meia-vida foi calculado utilizando o valor do coeficiente angular encontrado e a seguinte equação:

$$T_{1/2} = -0,693 / b \quad \text{EQ. 8}$$

O resultado apresentado na figura 19 é ilustrativo das produções e confirmou o tempo de meia-vida físico do radionuclídeo flúor-18 na amostra, que deve estar entre 105 a 115 minutos (FB, 2019; ZANETTE, 2013; USP, 2018).

O cálculo da meia vida está demonstrado conforme literatura (FB, 2019; SHAO et al. 2011):

Figura 19 - Perfil da identidade radionuclídica do fluor-18

Fonte: Autor

6.4.3 Ensaio de Pureza Radionuclídica

O resultado da análise do radiofármaco FES- ^{18}F mostrou que mais de 99,9% do produto possuiu características do pico principal de 0,511 KeV, 1,022 KeV e neste estudo observou-se um triplo soma no pico de 1533 KeV (figura 20), tendo em vista que no perfil, não se encontrou outro pico, podemos concluir que o mesmo atende aos critérios da Farmacopeia Brasileira para o produto fludesoxiglicose (18 F), que também emprega o elemento radioativo flúor-18 (MORI et al., 2005). O critério de aceitação de Pureza Radionuclídica foi atendido, inclusive, no tempo mais tardio do estudo de estabilidade, correspondente ao prazo de validade do produto, como apresentado no item 6.4.5.

A elevada Pureza Radionuclídica deve-se à purificação do produto nos diversos cartuchos do módulo de síntese, onde a maior parte dos contaminantes fica retida nos cartuchos (KÖHLER et al., 2013; BOWDOWN et al., 2009). A análise foi realizada num detector HPGe (High Purity Germanium) POPTOP tipo P por 30 min, aproximadamente 9 horas após a síntese.

Figura 20 - Perfil da análise do FES- ^{18}F em HPGe ~ 9 horas após a síntese

Fonte: Autor

Dziel e col (DZIEL et al., 2016), juntamente com Marengo e col (MARENGO et al., 2008) realizaram testes no QMA e na água de recuperação

de produções de FDG- ^{18}F e NaF- ^{18}F (fluoreto de sódio (^{18}F)) e comprovaram que grande parte das impurezas radionuclídicas geradas durante a irradiação de água enriquecida em ^{18}O é purificada.

Para identificação de outros picos menos importantes e que possivelmente poderiam estar encobertos devido à alta atividade da amostra atribuída ao flúor-18, foi realizado nova medida da amostra do FES- ^{18}F dois dias após a síntese e a leitura foi feita por 1 hora.

Adicionalmente, visando melhorar a qualidade dos picos e facilitar a identificação dos mesmos, o resultado foi comparado com a medida realizada na água irradiada ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$), sem prévia purificação, colhida no mesmo dia da produção de FES- ^{18}F . Os dois espectros estão apresentados na figura 21.

Figura 21- Perfil da análise da água irradiada ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$) apresentado em preto e do radiofármaco FES- ^{18}F , apresentado em verde em HPGe.

Fonte: Autor.

As impurezas radionuclídicas encontradas nas amostras de FES- ^{18}F após dois dias de síntese e na água irradiada ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$) são: ^{52}Mn , ^{55}Co , ^{56}Co , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{95}Tc , além do próprio ^{18}F . Köhler e col (KÖHLER et al., 2016), descreveram os mesmos achados na água irradiada comparando com FDG- ^{18}F e NaF- ^{18}F . As características de cada elemento estão apresentadas na tabela 14.

Tabela 14- Característica das impurezas radionuclídicas encontradas na água irradiada ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$) e a %.

Radionuclídeo	Meia-Vida	Energia (keV) de maior Intensidade	Área do Pico	% ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)
^{18}F	109 min	511	1,29E+10	99,9998
^{52}Mn	21,1 meses	744	1,41E+02	1,09E-06
^{55}Co	17,53 horas	931	1,62E+04	1,25E-04
^{56}Co	77,24 dias	846,77	4,32E+03	3,35E-05
^{57}Co	271,74 dias	122,06	1,04E+02	8,03E-07
^{58}Co	70,86 dias	810,76	6,66E+03	5,15E-05
^{95}Tc	20 horas	765,78	9,24E+02	7,15E-06
Total			1,3E+10	

Fonte: Autor

Os resultados encontrados são compatíveis com a literatura (MARENGO et al., 2008; KÖHLER et al., 2013; BOWDOWN et al., 2009) e a presença dos contaminantes radionuclídicos descreve-se como proveniente da janela de HAVAR que é ativada durante a irradiação e libera as impurezas que são solúveis em água.

6.4.4 Avaliação da metodologia empregada no ensaio de análise química do TBA- HCO_3

O requisito descrito na Farmacopeia Europeia para o limite de impurezas de TBA- HCO_3 em radiofármacos de ^{18}F é de 2,6 mg/V (FE, 2019). Para validação do método empregado foram realizados testes com volumes de 2, 5 e 10 μL da solução padrão de TBA- HCO_3 com concentração farmacopeica (figura 22) e também foram preparados padrões com concentrações de 0,454 mg/mL e 0,0998 mg/mL (figura 23), que são respectivamente a quantidade máxima e mínima de TBA- HCO_3 , que o paciente poderia receber por dose do radiofármaco administrado, considerando-se a faixa de concentração radioativa

final. Os ensaios foram realizados por cromatografia em camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (TLC-SG) e um sistema solvente composto por metanol/hidróxido de amônia (30% em água) numa relação 9:1, v/v (FB, 2019; KUNTZSCH et al., 2014). Após a corrida as fitas foram secas e coradas por 1 minuto com vapor de iodo e as placas mostraram uma cor amarelo-acinzentada, enquanto as manchas correspondentes ao TBA-HCO₃ apresentaram coloração marrom escura, como mostra a figura 22, para diferentes volumes e a figura 23 para diferentes concentrações.

Também foi realizado o teste da mancha (Spot teste), onde, os mesmos padrões foram colocados em único suporte de sílica gel 60/alumínio (SG) e revelados por 1 minuto com vapor de iodo. As figuras 22b a e 23b mostram que também foi possível realizar o ensaio de TBA-HCO₃ como spot teste.

A Farmacopeia brasileira (2019) orienta realizar a análise do resultado apenas pelo tamanho e intensidade da mancha. Neste intuito, como se trata de um radiofármaco de meia-vida curta, o teste da mancha foi realizado visando diminuir o tempo de liberação do resultado, tendo em vista que KUNTZSCH e colaboradores (KUNTZSCH et al., 2014) realizaram o ensaio da mancha e descreveram um comparativo referente à intensidade da mancha em diferentes concentrações

Figura 22– (A) Perfil cromatográfico do TBA- HCO_3 e (B) Teste da mancha do TBA- HCO_3 , ambos com 2,6 mg/V para diferentes volumes aplicados (2, 5 e 10 μL)

A: Aplicação de 2, 5 e 10 μL de amostra

B: Aplicação de 2, 5 e 10 μL de amostra

Fonte: Autor

Figura 23 - (A) - Perfil cromatográfico do TBA-HCO₃ e (B) – Teste da mancha do TBA-HCO₃, ambos com volume de 5 µL e concentrações de 0,454 mg/mL (PN), 0,0998 mg/mL (PP) e 2,6 mg/mL (PF)

A: Aplicação de 5 µL das concentrações de 0,454, 0,0998 e 2,6 mg/mL de Padrão TBA-HCO₃

B: Aplicação de 5 µL das concentrações de 0,454, 0,0998 e 2,6 mg/mL de Padrão TBA-HCO₃

Fonte: Autor

Para o controle de qualidade na rotina do radiofármaco FES-¹⁸F, utilizou-se o padrão farmacopeico, a amostra e o controle negativo (água para injetáveis) todos no volume de 5 µL. Os resultados estão apresentados na figura 24 (A) e (B).

Figura 24 - (A) - Perfil cromatográfico do TBA-HCO₃ e (B) – Teste da mancha do TBA-HCO₃, ambos com volume de 5 µL para o padrão, amostra e controle negativo e concentração de 2,6 mg/ mL para o padrão.

A: Padrão TBA-HCO₃, amostra de FES-¹⁸F e Controle Negativo

B: Padrão TBA-HCO₃, amostra de FES-¹⁸F e Controle Negativo

Fonte: Autor

O método apresentou sensibilidade para detectar a concentração referenciada como limite de TBA-HCO₃, estabelecido na Farmacopeia Europeia para monografia de outro produto marcado com flúor-18. O ensaio também mostrou sensibilidade para detectar concentrações mais baixas do contaminante químico.

Todos os métodos empregados nos ensaios de controle de qualidade demonstraram adequabilidade para a avaliação do produto acabado. Os resultados obtidos em todos os ensaios realizados para os lotes de FES-¹⁸F estão representados resumidamente na Tabela 15. Os valores atendem integralmente aos critérios de aceitação estabelecidos.

Tabela 15- Média dos Parâmetros analisados no controle de qualidade do radiofármaco FES-¹⁸F (n=8) e o critério de aceitação.

Teste	Resultado	Desvio médio	Critério de aceitação
Rendimento	11,9	± 1,63	10 - 20%
Identidade radionuclídica	109,5	± 0,50	105 - 115
Pureza Radionuclídica	100 %	0	> 99,5 %
Descrição	Límpido e Incolor	N.A.	Límpido e Incolor
Pureza Radioquímica**	98,6 %	± 0,47	≥ 95%
Impureza Química	< 2,6 mg/V	N.A.	< 2,6 mg/V
pH	6,5	± 0,5	6,0 – 8,0
Acetonitrila*	0	0	< 410 ppm
Etanol*	4,1 %	± 1,25	< 10%
LAL*	12,5 UE mL ⁻¹	N.A.	< 175 UE/mL
Esterilidade*	Negativo	N.A.	Negativo

Fonte: Autor

* Testes realizados em parceria com o controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia – IPEN. ** Teste Realizado por CCD-SG

N.A. Não Aplicável para o Teste

6.4.5 Estudo de estabilidade do radiofármaco FES-¹⁸F

O resultado do estudo de estabilidade do FES-¹⁸F, foi realizado com um frasco de 18,4 GBq (498 mCi) à temperatura ambiente por 6 horas, a partir da determinação da Pureza Radioquímica nos diferentes tempos avaliados, é apresentado na figura 25.

O radiofármaco FES-¹⁸F apresentou estabilidade por 6 horas após a sua síntese. Não foram observados desvios no Rf do produto durante os ensaios (BISPO et al., 2019).

Figura 25 -Resultado do estudo de estabilidade do radiofármaco FES-¹⁸F

Fonte: Autor

6.5 Validação do Método Analítico de Determinação de Pureza Radioquímica do FES-¹⁸F

6.5.1 Precisão – Repetibilidade

Neste estudo, a hipótese nula (H0) avaliou se havia concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Conforme mencionado, não foi possível estabelecer uma faixa fixa de trabalho uma vez que a concentração radioativa (atividade/mL) do radiofármaco variou de produção para produção. Sendo assim, foi preconizado trabalhar na menor concentração de 37 MBq/mL (1mCi/mL) e utilizou-se o volume de 5µL. A tabela 16 mostra os resultados de Rf e porcentagem de Pureza Radioquímica por CCD-SG e a tabela 17 os cálculos realizados pelo programa *Action Stat Pharma (Excel)*.

Tabela 16- Resultado dos parâmetros de Rf e %Pureza Radioquímica para o analista 1 no estudo de Precisão – Repetibilidade do FES-¹⁸F

Analista 1						
Atividade: 37 MBq /mL volume de 5µL						
Ensaio	1	2	3	4	5	6
Rf	0,9	0,9	1	1	0,9	0,9
%Pureza Radioquímica	98,4	98	98,3	98	98	98,5

Fonte: Autor

Tabela 17- Repetibilidade Analista 1

<i>Repetibilidade</i>			
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Coeficiente de Variação (%)</i>
%PR	98,2	0,22	0,23

Fonte: Autor

Analisando criticamente os resultados, não se observou diferença nos Rf obtidos e o valor de 0,23 % para o cálculo de coeficiente de variação encontra-se abaixo do critério de aceitação adotado que é 5% (GREEN, 1996). Portanto, a repetibilidade foi aceitável como parâmetro de validação do ensaio de precisão (VICENTE et al., 2015).

6.5.2 Precisão – Precisão Intermediária

Foi realizado o mesmo procedimento da análise da repetibilidade, porém, por outro analista. A tabela 9 mostra os resultados de porcentagem de pureza radioquímica por CCD-SG dos analistas 1 e 2 e os cálculos realizados pelo programa *Action Stat Pharma (Excel)* apresentando na tabela 18 e figura 26 a interação entre os analistas.

Tabela 18- Resultado dos parâmetros de % Pureza Radioquímica no estudo de Precisão – Precisão Intermediária do FES-¹⁸F.

% Pureza Radioquímica Atividade: 37 MBq /mL volume de 5µL							
Ensaio	1	2	3	4	5	6	Média
Analista 1	98,4	98	98,3	98	98	98,5	98,2
Analista 2	98,5	98,5	97,8	98,3	98	99,2	98,4

Fonte: Autor

Figura 26– Representação do efeito das análises de precisão intermediária no produto.

Fonte: Autor

Tabela 19- Estudo da precisão Intermediária

<i>Precisão Intermediária</i>			
<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Coefficiente de Variação (%)</i>	<i>P-Valor</i>
98,3	0,28	0,3%	0,42

Fonte: Autor

Analisando os resultados, todas as amostras apresentaram porcentagem de Pureza Radioquímica > 95%. A figura 26 mostra a média dos resultados obtidos com os limites superiores e inferiores para cada analista. Observando a tabela 19, a alteração dos analistas não foi significativa, apresentou um p-valor de 0,42, ao nível de significância de 5%, ou seja, a hipótese nula (H0) de que, independente do analista, o resultado se manteve dentro dos critérios aceitos, possibilitando concluir pela precisão da metodologia de avaliação.

6.5.3 Seletividade

Avaliou-se a concordância dos resultados conforme os critérios mencionados, sendo que após o preparo das soluções utilizou-se o volume de 5µL para o ensaio de CCD-SG. Nos testes 1, 3, 4 e 6 analisou-se o Rf do radiofármaco FES-¹⁸F, sendo que no teste 3 avaliou-se o Rf do radiofármaco com sua Impureza Radioquímica e nos testes 4 e 6 avaliou-se frente aos contaminantes químicos. Nos testes 2, 5 e 7 analisou-se o comportamento do Rf da impureza radioativa frente aos possíveis contaminantes químicos. A hipótese nula (H0) de que não houve alteração do Rf e da porcentagem de Pureza Radioquímica independente do analito contaminante, ou se houve alteração a mesma, foi testada neste parâmetro. A tabela 20 mostra os resultados de Rf de cada teste, que são ilustrados nas respectivas figuras 27, 28 e 29.

Tabela 20- Resultado dos parâmetros de Rf no estudo de Seletividade do radiofármaco FES- ^{18}F .

Rf FES- ^{18}F				Rf Impureza Radioquímica		
Teste 1	Teste 4	Teste 6	Teste 3	Teste 2	Teste 5	Teste 7
1,0	0,9	1,0	1,0	0,1	0,1	0,1

Fonte: Autor

Figura 27– Testes1, 4 e 6 de seletividade do radiofármaco FES- ^{18}F

Fonte: Autor

Figura 28 – Teste 3 de seletividade com o radiofármaco FES- ^{18}F e a impureza radioativa Fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)

Fonte: Autor

Figura 29 – Testes 2, 5 e 7 de seletividade com o Fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^+$)

Fonte: Autor

O estudo de seletividade realizado mostrou a capacidade de identificar o pico do radiofármaco FES- ^{18}F , de modo inequívoco, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como a impureza radioativa fluoreto ($[^{18}\text{F}] \text{H}_2\text{F}^-$) e componentes da síntese em maior quantidade. Para este parâmetro não se utilizaram os cálculos do programa *Action Stat Pharma (Excel)*, pois baseado no guia MAPA (MAPA, 2014), o qual descreve que a “verificação da seletividade de um procedimento cromatográfico deve garantir que o pico de interesse seja atribuído a um só componente”. Sendo assim, como os picos radiativos não colidem e o R_f não sofre influência quando da amostra fortificada, podemos concluir que o parâmetro foi validado.

6.5.4 Linearidade

Para o radiofármaco FES- ^{18}F não existe padrão de referência, e uma questão a ser considerada é que tanto o rendimento quanto a atividade específica variam entre as produções, fazendo com que a faixa de concentração não seja fixa. Para o estudo, estabeleceu-se o intervalo linear entre 5 % e 120 % da concentração média de trabalho, sendo cinco pontos de análise, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, Guia nº 10, de 30 de agosto de 2017).

A hipótese nula (H_0) de que os resultados obtidos nas contagens são diretamente proporcionais à concentração radioativa da amostra e não interferem no R_f e na porcentagem de Pureza Radioquímica do produto foram desafiados neste parâmetro.

As contagens por minuto (CPM) dos picos correspondentes a cada ponto da linearidade e suas médias encontram-se na tabela 21.

Tabela 21- CPM relativa a cada ponto do parâmetro de linearidade.

Diluição	Atividade ($\mu\text{Ci/mL}$)	CPM	Média	DP	CV
5%	55	37294	23339	35584	32072
10%	108	56419	59219	56559	57399
50%	528	216304	171134	132154	173197
100%	1005	361789	251984	329994	314589
120%	1195	436709	336739	365689	379712

Fonte: Autor

A primeira verificação realizada foi uma análise visual para observar se os pontos dispostos no gráfico têm relação linear. Conforme mostra a figura 30, o coeficiente de determinação encontrado para os pontos, $R^2=0,998$, e o coeficiente de variação ($r = 0,999$) demonstram que o método possui linearidade.

Figura 30 – Representação visual da linearidade do método.

Fonte: Autor

Uma vez definida a linearidade do método, foram realizados os cálculos pelo programa *Action Stat Pharma (Excel)*. O primeiro teste define a

homocedasticidade do método e está demonstrado na tabela 22 e na figura 31, sendo que o valor calculado foi comparado ao valor crítico ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

Tabela 22- Avaliação da Homocedasticidade: Teste de Cochran

Teste de Homocedasticidade - Cochran		
Estatística	Número.de.Réplicas	P.valor
0,57	3	0,18

Fonte: Autor

Sendo assim, temos que o valor de Cochran calculado foi de 0,57 e o valor de Cochran crítico foi de 0,18, sendo maior que 0,05, corroborando para a aceitação da hipótese nula de que a variância foi dispersa e que para todos os níveis de concentração os dados foram homocedásticos, ocorrendo homogeneidade de variáveis.

Tendo em vista que os dados foram homocedásticos, utilizou-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários MMQO (MAPA, 2017; BRASIL, Guia nº 10, de 30 de agosto de 2017), demonstrado na tabela 23 e o teste de análise dos resíduos e normalidade, demonstrado na tabela 24, 25, 26 e figura 31.

Tabela 23- Método dos Mínimos Quadrados Ordinários: Estimação

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Atividade $\mu\text{Ci/mL}$	1	2,4E+11	2,5E+11	185,75	4,4E-09
Resíduos	13	16905083869	1300391067		
Intervalo de confiança para os parâmetros ANOVA					
Preditor	Limite Inferior		Limite Superior		
Intercepto	-11444,2		53137,5		
Atividade $\mu\text{Ci/mL}$	231,9		319,3		

Fonte: Autor

Na tabela da ANOVA, para medir a variância entre as médias dos pontos, utilizou-se o quadrado médio, de modo que quanto mais distante a média do grupo está, maior esse número se torna. O p-valor na tabela ANOVA, mostra que o nível de significância menor que 5% indica a existência da diferença significativa entre os níveis de concentração. Neste estudo, o p-valor da ANOVA foi de 4.4E-09, confirmando uma diferença significativa entre as concentrações.

Tabela 24- Análise dos resíduos

Análise exploratória (resíduos)					
Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-55140	-27840	1288	7,39E-13	8606	86500

Fonte: Autor

Tabela 25– Cálculos de Normalidade

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,54	0,13

Fonte: Autor

Tabela 26- Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	Coeficiente de Correlação
36060,93	13	0,93	0,96

Fonte: Autor

O teste de normalidade de Anderson-Darling, aplicado nos resíduos, mostra que a hipótese nula de normalidade p-valor 0,13 não foi rejeitada ao nível de significância 5%. O valor de R² (Chi-quadrado) calculado foi de 0,93 sendo que quanto mais próximo de 1,0, melhor o ajuste do modelo.

O gráfico da figura 31, Resíduos X valores ajustados, mostra que os pontos estão distribuídos de forma homogênea em torno do zero, não demonstrando tendência. O segundo gráfico QQ-Plot, demonstra a normalidade dos dados, relacionada com a linearidade do gráfico, de maneira que quanto "mais linear" for o gráfico, melhor a normalidade dos dados. Os pontos apresentados estão próximos da reta, indicando a normalidade dos

dados. O gráfico de resíduos x ordem de coleta mostra que não houve tendência nos pontos. Sendo assim, não houve dependência dos resíduos.

Figura 31 – Representação visual do parâmetro de linearidade.

Fonte: Autor

6.5.5 Intervalo/Faixa de trabalho

Para a determinação da faixa de trabalho, avaliou-se a conformidade dos resultados obtidos nos ensaios de linearidade, no qual, a faixa de trabalho escolhida atendeu aos critérios, mantendo o fator de retenção (R_f) do produto nas diferentes diluições, não apresentando alteração na média das análises de porcentagem de Pureza Radioquímica (mantidas > 95%), corroborando com o ensaio de precisão.

6.5.6 Robustez

Para o parâmetro de robustez do método, foram alterados volumes (5 μL e 2 μL) e concentrações radioativas 37 MBq e 18,5 MBq (1,0 mCi/mL e 0,5 mCi/mL). As amostras foram preparadas em triplicata e os critérios de aceitação analisados, sendo que o Rf dos ensaios analíticos deveria ser mantido entre 0,9 e 1,0 e a porcentagem Pureza Radioquímica deveria ser > 95%. A hipótese nula (H_0) de que o método não sofreria interferência significativa das pequenas variações foi testado ao nível de significância 5%. Conforme referenciado em vários guias (MAPA, 2014; BRASIL, Guia nº 10, de 30 de agosto de 2017; RELACRE, 2000; INMETRO, 2007), recorreu-se ao teste de YOUNDEN para planejamento e análise do parâmetro de robustez. Representou-se o valor nominal por letras maiúsculas (A, B) e o valor alternativo por letras minúsculas (a, b) conforme tabela 27, e a elaboração do quadro Youden do plano de ensaios com o resultado da Pureza Radioquímica na tabela 28.

Tabela 27- Combinação fatorial para o plano de ensaio pelo teste de Youden

Concentração radioativa	37 MBq /mL	A	18,5 MBq /mL	a
Volume da amostra	5 μL	B	2 μL	b

Fonte: Autor

Tabela 28 - Resultado das porcentagens de Pureza Radioquímica obtidas a partir da combinação de ensaio pelo teste de Youden.

	Concentração		
	Radioativa	Volume	%PR
R1	A	B	98,1
R2	a	B	98,9
R3	A	b	98,5
R4	a	b	98,8

Fonte: Autor

Os resultados obtidos foram plotados no Action Stat *Pharma* (Excel) e apresentados na tabela 29.

Tabela 29- Resultados do teste de Youden.

Análise de Experimento sem Réplica						
	Efeitos	Estimativa	Limite Inferior	Limite Superior	Estatística t	P-valor
Intercepto		98,6				
Concentração	-0,55	-0,27	-5,31	4,21	1,5	0,38
Volume	-0,15	-0,07	-4,91	4,61	0,4	0,75
Concentração:Volume	-0,25	-0,12	-5,01	4,51	0,7	0,62
Análise de Experimento sem Réplica						
	alpha	PSE	ME	SME	t.crit	
	0,05	0,37	4,76	14,07	12,7	
Análise de Experimento sem Réplica						
	Efeitos em Módulo	Half-normal score				
Concentração	0,55	1,38				
Volume	0,15	0,21				
Concentração:Volume	0,25	0,67				

Fonte: Autor

Avaliando os resultados, em todas as determinações, os Rfs foram mantidos entre 0,9 e 1,0, e as porcentagens de Pureza Radionuquímica se mantiveram acima de 95 %. A análise do efeito mostra que a variação na concentração radioativa (-0,55) influenciou mais nos resultados de

porcentagem de Pureza Radioquímica do que as variações de volume (-0,15) das determinações. Analisando o p-valor, os resultados de concentração (0,38), volume (0,75) e a correlação entre os dois (0,62) não foi verificado a interferência no método ao nível de significância de 5 %, o que permitiu a conclusão da robustez do método aplicado.

Com a conformidade de todos os Parâmetros, conclui-se que o método de cromatografia em camada delgada CCD-SG com a fase móvel acetonitrila:água 95 % para a determinação da porcentagem de Pureza Radioquímica do radiofármaco FES-¹⁸F está de acordo com o preconizado pelo órgão regulatório e pode ser considerado validado.

6.6 Estudo de Biodistribuição em Animais Sadios

Os resultados do estudo de biodistribuição foram obtidos por meio de planilhas de cálculo no programa Excel. Para o cálculo da atividade administrada foi descontada a atividade residual existente na cauda de cada animal. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 5.00®* (GraphPad Software).

Na tabela 30 e figura 32 são apresentadas as médias com o desvio padrão, de acordo com os tempos estudados, dos valores da biodistribuição do produto em animais sadios, em %AI/g de órgão/tecido e mL de sangue. A figura 33 apresenta a média dos resultados por %AI/órgão ou tecido, no estudo de biodistribuição do radiofármaco FES-¹⁸F. Ambos mostram que o radiofármaco é eliminado rapidamente do sangue.

Tabela 30- Média e desvio padrão dos resultados % Atividade injetada por grama de órgão/tecido ou mL de sangue (%AI/g ou mL) obtidos na biodistribuição em animais sadios utilizando o radiofármaco FES-¹⁸F

Órgão/tecido	%AI/g ± Desvio Padrão		
	30 minutos	60 minutos	120 minutos
Sangue	0,77 ± 0,09	0,31 ± 0,06	0,23 ± 0,10
Coração	0,94 ± 0,19	0,30 ± 0,07	0,27 ± 0,15
Pulmões	1,41 ± 0,52	0,54 ± 0,11	0,48 ± 0,21
Pâncreas	3,99 ± 0,53	1,27 ± 0,58	1,40 ± 0,85
Baço	1,15 ± 0,24	0,65 ± 0,14	0,80 ± 0,62
Estômago	2,52 ± 2,04	0,56 ± 0,18	3,95 ± 0,99
Fígado	10,65 ± 2,06	5,51 ± 1,16	4,66 ± 1,85
Bexiga	7,35 ± 1,90	8,26 ± 2,88	4,02 ± 3,21
Rins	2,33 ± 0,18	2,00 ± 0,49	1,83 ± 0,67
Intestinos	15,79 ± 1,04	16,12 ± 5,54	12,81 ± 4,82
Músculo	2,21 ± 0,67	1,60 ± 0,39	1,18 ± 0,41
Osso	2,87 ± 0,51	2,84 ± 1,17	1,57 ± 0,50
Cérebro	0,64 ± 0,15	0,30 ± 0,05	0,18 ± 0,08
Ovário	12,43 ± 6,11	7,54 ± 6,47	5,28 ± 3,48
Útero	25,83 ± 9,61	6,46 ± 3,81	7,03 ± 4,78

Fonte: Autor

Figura 32 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ^{18}F por grama (%AI/g) de cada órgão/tecido e mL de sangue, em camundongos BALB-c sadios, nos diferentes tempos após a administração.

Fonte: Autor

Figura 33 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ^{18}F por tecido/órgão (%AI) em camundongos BALB-c sadios, nos diferentes tempos após a administração.

Fonte: Autor

Com exceção do cérebro, que apresentou baixa captação nos tempos analisados, observou-se no estudo de biodistribuição, a captação de FES-¹⁸F nos demais órgãos analisados, em todos os tempos, inclusive nos órgãos com receptores de estrogênio, cujo, no tempo de 30 minutos pós-injeção, percebeu-se uma maior captação no útero e ovários (DRAFT, 2017; DOWNER et al., 2001, BISPO et al., 2017b). O radiofármaco apresentou captação significativa no fígado e nos intestinos, fato, possivelmente relacionada à excreção preferencial pela via intestinal, com perfil metabólico semelhante do estradiol. No protocolo experimental, os intestinos foram retirados com conteúdo. Verificou-se outrossim captação renal do produto, compatível com eliminação pelo trato urinário.

6.7 Estudo de Biodistribuição em Animais com Desenvolvimento Tumoral

Os camundongos SCID fêmeas foram inoculados com células de adenocarcinoma de mama humano ER+ (MCF-7) e receberam a injeção do radiofármaco FES-¹⁸F 20 dias após a implantação das células.

Os dados de captação do FES-¹⁸F nos órgão e tumores apresentam-se em %AI/g de órgão/tecido ou mL de sangue na tabela 31 e na figura 34 e em %AI/órgão/tecido na figura 35.

Tabela 31- Média e desvio padrão dos resultados % Atividade injetada por grama de órgão/tecido ou mL de sangue (%AI/g ou mL) obtidos na biodistribuição em animais com tumor utilizando o radiofármaco FES-¹⁸F

Órgão/tecido	%AI/g ± Desvio Padrão			
	30 minutos	60 minutos	60 minutos Bloqueio	120 minutos
Sangue	2,36 ± 1,66	0,83 ± 0,22	2,67 ± 1,43	0,28 ± 0,12
Coração	5,62 ± 3,38	0,69 ± 0,05	2,96 ± 2,61	0,13 ± 0,10
Pulmões	4,76 ± 2,59	2,52 ± 2,2	2,67 ± 2,20	0,28 ± 0,05
Pâncreas	17,62 ± 4,10	5,83 ± 3,66	5,83 ± 2,73	0,47 ± 0,11
Baço	1,97 ± 0,78	0,73 ± 0,43	0,91 ± 0,38	0,21 ± 0,04
Estômago	5,07 ± 0,59	1,04 ± 0,59	9,39 ± 0,01	0,72 ± 0,31
Fígado	6,44 ± 0,30	5,08 ± 1,97	4,82 ± 1,98	3,09 ± 1,02
Rins	10,29 ± 1,76	2,02 ± 0,61	4,20 ± 1,72	0,95 ± 0,01
Intestinos	11,37 ± 3,62	13,93 ± 1,27	17,95 ± 1,26	14,25 ± 2,46
Músculo	3,55 ± 0,83	1,65 ± 0,53	2,04 ± 0,63	1,08 ± 0,21
Osso	3,63 ± 0,36	1,64 ± 0,41	2,31 ± 0,88	1,77 ± 0,75
Cérebro	3,92 ± 2,43	0,45 ± 0,07	0,65 ± 0,47	0,08 ± 0,01
Tumor	1,74 ± 0,91	1,32 ± 0,86	0,42 ± 0,08	0,32 ± 0,08
Ovário	11,06 ± 1,03	12,10 ± 2,61	4,32 ± 1,34	3,10 ± 0,58
Útero	11,18 ± 080	21,58 ± 2,70	5,45 ± 1,67	3,25 ± 1,33

Fonte: Autor

Figura 34 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ^{18}F por grama (%AI/g) de cada órgão em camundongos SCID com tumor nos diferentes tempos após a administração.

Fonte: Autor

Figura 35 - Média da porcentagem da atividade injetada do radiofármaco FES- ^{18}F por tecido/órgão (%AI) em camundongos SCID com tumor nos diferentes tempos após a administração.

Fonte: Autor

Os resultados do estudo de biodistribuição do FES-¹⁸F em camundongos SCID com tumor mostraram um perfil de biodistribuição semelhante ao observado nos animais sadios. Observou-se um rápido clareamento sanguíneo e excreção intestinal semelhante à excreção do estradiol.

Não houve diferença significativa na captação do FES-¹⁸F no tumor e nos ovários nos tempos de 30 e 60 minutos, na qual, foi realizado um teste T de amostras independentes, obtendo um p-valor para o tumor de 0,55, e para os ovários de 0,76 ao nível de significância de 0,05, aceitando-se a hipótese de igualdade das médias das duas variáveis.

Mas observou-se uma maior captação do FES-¹⁸F no útero, órgão este que apresenta receptores de estrogênio ER+, no tempo de 60 minutos, realizado o teste T de amostras independentes, obteve-se um p-valor de 0,03, sendo assim, ao nível de significância de 5%, rejeitou-se a hipótese nula de igualdade das médias das duas variáveis.

O grupo que recebeu o bloqueio hormonal de estradiol 24 horas antes da administração do FES-¹⁸F apresentou uma boa resposta, diminuindo a captação do radiofármaco FES-¹⁸F nos receptores, corroborando com a especificidade da ligação do radiofármaco aos receptores de estrogênio. Além disso, observaram-se aumentando do tempo de clareamento sanguíneo e maior captação pelos órgãos excretórios, compatível com a literatura (DRAFT, 2017, DOWNER et al., 2001).

A tabela 32 apresenta a razão tumor/músculo e tumor/sangue, um aumento em ambas as razões em relação aos tempos de 30 e 60 minutos mostra a especificidade de ligação do radiofármaco aos receptores de estradiol. Além disso, a razão tumor/sangue se manteve elevada para o tempo de 120 minutos.

A especificidade de ligação do FES-¹⁸F também foi observada na atuação do bloqueio que proporcionou a diminuição na razão de ligação do radiofármaco com o tumor no tempo analisado.

Tabela 32- Relação tumor/músculo e tumor/sangue do radiofármaco FES-¹⁸F

Razão Tumor / Músculo				Razão Tumor / Sangue			
30 min	60 min	60 min bloqueio	120 min	30 min	60 min	60 min bloqueio	120 min
0,49	0,79	0,21	0,29	0,74	1,59	0,16	1,12

Fonte: Autor

A tabela 33 apresenta o resultado da média da porcentagem de captação total nos músculos.

Tabela 33 - Média da % de captação total nos músculos por tempo no ensaio de biodistribuição de animal com tumor.

Média da % de captação total no Musculo		
30 minutos	60 minutos	120 minutos
27,70	11,60	8,90

Fonte: Autor

Observando os resultados da tabela 33, foi possível constatar nitidamente o clareamento muscular entre os tempos de 30 e 60 minutos e a estatística T mostra um p-valor de 0,02. Já entre os tempos de 60 minutos e 2 horas, o tempo de clareamento não foi significativo, confirmado com o resultado do p-valor de 0,3.

6.8 Desenvolvimento das Células de Adenocarcinoma Mamário Humano MCF-7

As células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram cultivadas no Centro de biotecnologia do IPEN. O procedimento foi realizado com linhagem do banco de células ATCC® HTB-22™, que foram descongeladas e incubadas conforme protocolo interno já descrito.

As MCF-7 são células que possuem uma morfologia do tipo epitelial, apresentam-se em grupos e as monocamadas formam estruturas de cúpula devido ao acúmulo de material líquido entre a placa de cultura e a monocamada celular (ECACC, 2019) como pode ser visto na figura 36, obtida com aumento de 20x no Microscópio Invertido Nikon Eclipse TS100.

Figura 36 - Células MCF-7 no aumento de 20x Microscópio Invertido Nikon Eclipse TS100. As setas mostram as estruturas de cúpula e os círculos apresentam os grupos de ligação celular.

Fonte: Autor

6.9 Histopatologia dos Tumores

Após o ensaio de biodistribuição em animais SCID, os tumores foram fixados em formalina a 10% e encaminhados para análise histopatológica.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e visualizadas com ampliação de 2x e 10x no microscópio Nikon Eclipse Ci.

As imagens na figura 37 A, B, C e D, apresentam respectivamente os cortes histológicos, amplificados 2x, dos tumores obtidos nos tempos de 30 min, 60 minutos, 60 minutos com bloqueio e 120 minutos.

Figura 37 – Tumores de Células MCF-7 no aumento de 2x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan) obtidos nos tempos 30 (A), 60 (B), 60 com bloqueio (C) e 120 (D) minutos.

Fonte: Autor

As áreas rosa-vermelho apresentam-se coradas pela eosina caracterizando as áreas de necrose tecidual, enquanto que a hematoxilina cora em azul-arroxeadado e demonstram as áreas de viabilidade celular.

Foi realizado o cálculo para avaliar a porcentagem de área de células tumorais viáveis, utilizando o programa Nikon-NIS Elements (Nikon Instruments Europe). O Cálculo esta apresentado na equação 7.

$$\% \text{ de área tumoral viável} = \% \text{ área total do tumor} - \% \sum \text{ das áreas necróticas}$$

EQ. 7

As áreas de captação apresentaram respectivamente nos tempos de 30, 60, 60 bloqueio e 120 minutos os resultados aproximados de 92%, 99%, 95% e 85%

Nas figuras 38, 39 e 40 observa-se, no aumento de 10x, um campo representativo com típica histologia tumoral, apresentando pleomorfismo celular, com células em proliferação, núcleo basófilo e citoplasma escasso.

Figura 38 – Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), as setas indicam locais de fibra muscular intermediando o nódulo.

Fonte: Autor

Figura 39 – Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), os asteriscos indicam locais de necrose tecidual, observa-se intensa área acidófila, disforme e sem estrutura celular.

Fonte: Autor

Figura 40 - Tumor de Células MCF-7 no aumento de 10x Microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon;Tokio;Japan), os sinais de “mais” indicam locais de vascularização, indicando a nutrição celular.

Fonte: Autor

Os resultados obtidos nas análises das lâminas de histopatologia permitiram concluir que os fragmentos nodulares apresentavam células e estruturas com características tumorais, conforme o esperado, validando o resultado de carcinoma mamário.

6.10 Estudo da Imagem micro PET/CT

Seguindo o protocolo da biodistribuição dos animais SCID com tumor, um camundongo foi colocado no equipamento microPET/CT ALBIRA e imagens dinâmicas foram adquiridas (HEIDARI et al., 2015) e reconstruídas utilizando o programa PMOD.

A figura 41 representa a imagem PET da biodistribuição do FES-¹⁸F. Observa-se na imagem uma intensa captação no sistema digestório, compatível com a biodistribuição invasiva. A seta indica a área de localização e captação no tumor, no flanco superior esquerdo, área também delimitada em vermelho representando o VOI (*Volume Of Interest*).

Figura 41 - Imagem decúbito ventral, longitudinal de micro-PET / CT de camundongo SCID fêmea com adenocarcinoma de mama (MCF-7), após administração do radiofármaco FES - ^{18}F . (A) representa a fusão das técnicas PET e CT delimitando em vermelho a área do VOI. (B) representa a imagem PET, acumulativa de 60 minutos a seta indica a localização do tumor.

Fonte: Autor

A imagem PET apresenta uma boa correlação com a biodistribuição invasiva, corroborando para o seu potencial como radiofármaco nos diagnósticos de tumores ER+.

Conclusão

A revisão bibliográfica mostrou que o radiofármaco **16 α -[¹⁸F]-fluoro-17 β -estradiol (FES-¹⁸F)** e a tecnologia dos exames PET-CT em Medicina Nuclear, representam um avanço para o diagnóstico precoce do carcinoma mamário, por ser um radiofármaco ligante-específico no receptor de estrógeno (ER), super expresso em 75% dos casos de câncer de mama. O método não-invasivo possibilita determinar o tamanho do tumor, sítios da doença, auxiliando no prognóstico do tratamento individualizado do paciente, podendo, ainda, ser utilizado na verificação do câncer de mama recidivo, bem como no monitoramento da doença com o tratamento hormonal.

Em maio de 2020 o produto **CERIANNA™ (fluoroestradiol F 18) Injection**, da empresa Zionexa US Corporation, foi liberado pelo FDA (EUA) para comercialização, fato que enfatizou seu potencial como agente para diagnóstico no câncer de mama.

O potencial diagnóstico deste radiofármaco estimulou este trabalho, que resultou na padronização do processo de produção do radiofármaco, avaliação da adequabilidade e validação de métodos analíticos empregados no controle de qualidade, além da avaliação pré-clínica de eficácia e especificidade em modelo animal.

Os resultados deste trabalho representam importante pré-requisito para avaliação clínica do radiofármaco FES-¹⁸F produzido pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN, visando demonstrar eficácia e segurança para registro do produto no Brasil, que possibilitará a comercialização e uso disseminado em procedimentos diagnósticos, com benefícios para a sociedade brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/dcis.html - acessado fevereiro 2020
- ADVANCED BIOCHEMICAL COMPOUNDS (ABX). Instructions for the synthesis of 16 α -[18F] Fluoroestradiol Using the GE TRACERlab® MXFDG Synthesizer. SCH SP0011/02. 2016, Acessado em 01/02/2018.
- ALLRED D. C; BROWN, P; MEDINA, D; The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Research**. 2004;
- ALMEIDA, E. V; SILVA, N. G; FREIRE, A C; MONTEIRO, E de G; BENEDETTI, S; MURAMOTO, E; FUKUMORI, N. T.O; MATSUDA, M. M.N; VASCONCELLOS, MARINA B.A. Método cintilográfico não invasivo para estudo de biodistribuição de radiofármacos. **Revista Brasileira de Física Medica**, v. 4, n. 3, p. 53-56, 2011.
- ARCARISANDLE, C. V.; The use of a risk assessment in the pharmaceutical industry – the application of FMEA to a sterility testing isolator: a case study; *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences* - 2003
- BALIEIRO, L. M.; OLIVEIRA, H. B.; ARAUJO, E.B.; Study of the automated synthesis of the radiopharmaceutical 16 α [18F] Fluoro-17 β -Estradiol, **International Nuclear Atlantic Conference- INAC** 2019.
- BENSCH, F; KRUCHTEN , M. L; LAETITIAE, L; SCHRÖDER, C. P; HOSPERS, G. A. P; BROUWERS, A. H; VANVUGT, A. T. M; VRIES, E.G.E.DE. Molecular imaging for monitoring treatment response in breast cancer patients. **Eur J Pharmacol**. doi:10.1016/jeiphar. 2013.
- BISPO, A. C. A; NASCIMENTO, L. T. C; CASTRO, A. C. F.;LIMA, L. A. R.; FERREIRA, S. M. Z. M. D.; SILVA, J. B; MAMEDE, M.; Synthesis and characterization of the radiopharmaceutical [18] fluoroestradiol **International Nuclear Atlantic Conference- INAC**. 2019.
- BISPO, A. C. A; NASCIMENTO, L. T. C; COSTA, F. M; SILVA, J. B; MAMEDE, M.; Development of HPLC method for the radiochemical purity evaluation of (¹⁸F) Fluoroestradiol. **International Nuclear Atlantic Conference- INAC** 2017(A).
- BISPO, A. C. A; SILVEIRA, M. B.; GONTIJO R. M. G.; CAMPOS, M. R. A.; MALAMUT, C.; SILVA, J. B; MAMEDE, M.; Avaliação da imagem PET e biodistribuição ex vivo do radiofármaco 18F-FLUORESTRADIOL em animais sadios. **International Nuclear Atlantic Conference- INAC** 2017 (B).
- BIPM, **Table of Radionuclides, Monographie BIPM-5**, ISBN: 92-822-2207-7
- BITENCOURT, A. G. V.; LIMA, E. N. P.; CHOJNIAK, R.; MARQUES, E. F.; SOUZA, J. A.; GRAZIANO, L.; ANDRADE, W. P.; OSÓRIO, C. A. B. T.; Correlação entre resultado do PET/CT e achados histológicos e imuno-histoquímicos em carcinomas mamários, **Radiologia Brasileira**.47,2, 2014 ISSN 1678-7099
- BLUMGART, H. L, WEISS, S; Studies on the velocity of blood flow. **J Clin Invest**. 1927 v4.
- BOECHAT, N.; PINTO, A. C.; BASTO, M. M.; Selective fluorination methods of organic molecules, **Quím. Nova** vo38 n10, 2015 ISSN 1678-7064
- BOHR, V. A.; DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. **Carcinogenesis**, DOI: 10.1093/carcin/16.12.2885, 1995.
- BOWDOWN, L.; VINTRÓ, L.L.; MITCHELL, P.I.; O'DONNELL, R.G.; SEYMOUR, A.M.; DUFFY, G.J. Radionuclide Impurities in Proton-irradiates [18^o]H₂O for the production of 18F-: Activities and Distribution in the [18F]FDG Synthesis Process. **Applied Radiation and Isotopes** 67: p248-255, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Guia no 10, de 30 de agosto de 2017. Guia para tratamento estatístico da validação analítica, 2019.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Instrução Normativa IN nº 35 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Estéreis, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Instrução Normativa IN nº 37 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos radiofármacos, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Instrução Normativa IN nº 47 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 263, de 04 de fevereiro de 2019. Dispõe sobre o Registro de Radiofármacos.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 301 de 21 de agosto de 2019. Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, anexo I, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada 166 de 24 de Julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos, 2017.
- CAETANO, L. C.; LOBOSCO, A.; ARCARI, C. V.; Implantação da ferramenta da qualidade FMEA (análise de modos e efeitos da falha) no processo de fabricação de medicamentos orais sólidos em uma indústria farmacêutica veterinária, **Anais do IV SINGEP**, 2015 ISSN 2317-8302
- Certificação ISO: <https://certificacaoiso.com.br/fmea-e-gestao-de-risco-na-iso/> acessado em 20/08/2019
- CERVINO, A.R; BUREI, M; MANSI, L; EVANGELISTA, L. Molecular pathways and molecular imaging in breast cancer: An update. *Medicine and Biology*. Vol 40. pp 581-591. 2013.
- COTRAN, M. D.; KUMAR, M. D; COLLINS, M. D.; Robbins Patologia Estrutural e funcional. 6 ed, Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan** V.1 2007
- DALL, G.; VIEUSSEUX, J.; UNSWORTH, A.; ANDERSON, R.; BRITT K.; Low Dose, Low Cost Estradiol Pellets Can Support MCF-7 Tumour Growth in Nude Mice without Bladder symptoms, **Journal of Cancer**, 6(12):p 1331-1336. doi: 10.7150/jca.10890, 2015
- DICKSON, R.B.; LIPPMAN, M.ED; Growth factors in breast cancer. **Endocr Rev**,n.16 p559, 1995.
- DIEZ-PEREZ A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**. 50(4):720-34. ISSN 1677-9487; 2006
- DIRETRIZ – Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama, **Sociedade Brasileira de Mastologia, Cancerologia, Patologia e Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2001
- DIXIT, M; SHI, J; WEI, L; AFARI, G; BHATTACHARYYA, S; Synthesis of Clinical-Grade [18F]-Fluoroestradiol as a Surrogate PET Biomarker for the Evaluation of Estrogen Receptor-Targeting Therapeutic Drug. **International Journal of Molecular Imaging**, 2013
- DOWNER, J.B., JONES, L.A., KATZENELLENBOGEN, J.A., WELCH, M.J., Effect of administration route on FES uptake into MCF-7 tumors, **Nuclear Medicine and Biology** 28, 397–399, 2001
- DRAFT; An Investigational Positron Emission Tomography (PET) Radiopharmaceutical for Injection, Intended for use as an *IN VIVO* diagnostic for imaging estrogen receptors in tumors, Draft of Investigator's Brochure for [18F]Fluoroestradiol, ed 5, 2017
- DZIEL, T.; TYMINSKI, Z.; SOBCZYK, K.; WALECKA-MAZUR, A.; KOZANECKI, P.; Radionuclidic purity tests in 18F radiopharmaceuticals production process, **Applied Radiation and Isotopes**,109, 242–246, 2016

- ECACC – European Collection of authenticated cell cultures, <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/130237/mcf7-cell-line-profile.pdf> - acessado em Novembro 2019
- ESTOTEP, Bula do radiofármaco EstroTep, Zionexa, disponível em <https://www.zionexa.com/wp-content/uploads/2019/11/rcp-estrotep-22-mai-2019.pdf>, acessado em 19/03/2020
- FANGFANG, T.; SHEN, G.; DENG, Y.; DIAO, W.; JIA, Z.; The accuracy of ^{18}F -FDG PET/CT in predicting the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis and systematic review, **European Society of Radiology**, 27:4786–4796, 2017, DOI 10.1007/s00330-017-4831-y
- FB, FARMACOPEIA BRASILEIRA. 2019; **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**, 6. ed. v. 2. Brasília, Brasil, 2019.
- FE, FARMACOPEIA EUROPÉIA; **EUROPEAN PHARMACOPEIA**, 9.7 ed. v. 1 e 2. Strasbourg, France, 2019.
- FEDOROVA, O.; NIKOLAEVAB, V.; KRASIKOVAA, R.; Automated SPE-based synthesis of 16α -[^{18}F]fluoroestradiol without HPLC purification step, **Applied Radiation and Isotopes** v.141, p57–63, 2018.
- FELTES, P. K; MILÃO, D. Controle de Qualidade do Radiofármaco Fludesoxiglicose (^{18}F): comparação prática entre os testes requeridos nas Farmacopéias Britânica, Européia e Americana. **Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Brasil ISSN 1983-1374, 2011
- FOWLER, A. M.; CLARK, A. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; LINDEN, H. M.; DEHDASHTI, F.; Imaging Diagnostic and Therapeutic Targets: Steroid Receptors in Breast Cancer, **Jornal Nuclear Medicine**; 57:75S–80S, 2016, DOI: 10.2967/jnumed.115.15793
- FUKUMORI, N.T.O; Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação. Orientadora: Dra Constança Pagano Gonçalves da Silva. **IPEN/SP**. 2008.
- GOBBI, H.; Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** - December 2012, DOI: 10.1590/S1676-24442012000600013 <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>
- GORDON, M. N.; OSTERBURG, H. H.; MAY, P. C.; FINCH C. E.; Effective Oral Administration of 17β -Estradiol to Female C57BL/6J Mice through the drinking water; **Biology of reproduction** 35, 1088-1095, 1986
- GRAY, R. J.; POCKAJ, B. A.; GARVEYE, B. S.; Intraoperative Margin Management in Breast-Conserving Surgery: A Systematic Review of the Literature. **Annals Surgical Oncology**. 2017. Doi:101245/5104314016-5756-4
- GREEN, J. M. A.; Practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, v.68, n.1, p.305-309, 1996.
- HE, S.M.; WANG, M. W.; YANG, Z. Y.; ZHANG, J. P.; ZHANG, Y. P.; LUO, J. M. ZHANG, Y. J. Comparison of ^{18}F -FES, ^{18}F -FDG, and ^{18}F -FMISO PET Imaging Probes for Early Prediction and Monitoring of Response to Endocrine Therapy in a Mouse Xenograft Model of ER-Positive Breast Cancer. **PLoS One** v.11(7); PMC4965120; 2016
- HEIDARI, P.; DENG, F.; ESFAHANI, S. A.; LEECE, A. K.; SHOUP, T. M.; NEIL VASDEV, N., MAHMOOD, U., Pharmacodynamic Imaging Guides Dosing of a Selective Estrogen Receptor Degradar, **Personalized Medicine and Imaging; Clinical Cancer Research**, January 21, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1178, 2015
- IAEA (A) - International Atomic Energy Agency: A Guide to clinical PET in Oncology: Improving Clinical Management of Cancer Patients. Vienna, Austria; p19;24;34, 2008

- IAEA (B) - International Atomic Energy Agency: Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice. Vienna, Austria; p13;18, 2008
- INCA <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> - Acessado em março 2020
- INMETRO, ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS, 2007, **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO**, ver. 2, DOQ-CGCRE-008, 2007
- IPEN, Documento Interno IPEN-CR, PO-DIRF-0903.03 Análise de Risco, 2018
- IVEPESP - Esquema do processo do exame PET. <https://ivepesp.org.br/tomografia-por-emissao-de-positrons-pet/>, acessado em fevereiro 2020
- JACOBSON, O.; CHEN, X.; PET Designated Fluoride-18 Production and Chemistry, **Curr Top Med Chem**10(11): 1048–1059. 2010 ;
- JIMÉNEZ, Y. V.; Dosimetria interna aplicada a farmacos marcados com ¹⁷⁷Lu. (Dissertação de mestrado). **Instituto Balseiro**, Cuyo. 2007
- JIRICNY, J.; NYSTROM-LAHTI, M.; Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, doi: 10.1016/S0959-437X(00)00066-6, 2000.
- JUNIOR, J. S.; FONSECA, R. P.; CERCI, J. J.; BUCHPIGUEL, C. A.; CUNHA, M. L.; MAMED, M. A.; SÉRGIO, A.; Lista de Recomendações do Exame PET/CT com 18F-FDG em Oncologia - Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular (SBBMN), Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC) e Instituto do Câncer (INCA), 2018
- KATZENELLENBOGEN, J. A.; The quest for improving the management of breast cancer by functional imaging: The discovery and development of 16 α -[18F] fluoroestradiol (FES), a PET radiotracer for the estrogen receptor, a historical review, **Nuclear Medicine and Biology**, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.02.007>
- KNOTT, K. E.; GRATZ, D.; HUBNER, S.; “Simplified and automatic one-pot synthesis of 16 α -[18F]fluoroestradiol without highperformance liquid chromatography purification,” **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, vol. 54, pp. 749–753, 2011.
- KÖHLER, M.; DEGERING, D.; ZESSIN, J.; FÜCHTNER, F.; KONHEISER, J.; Radionuclide impurities in [18f] F- and [18F] FDG for positron emission tomography, **Applied Radiation and Isotopes**, 81, 268–271, 2013
- KUNTZSCH, M.; LAMPARTER, D.; BRÜGGENER, N.; MÜLLER, M.; KIENZLE, J. G.; REISCHL, G. A.; Development and successful Validation of Simple and Fast TLC Spot Tests for Determination of Kryptofix® 2.2.2 and Tetrabutylammonium in 18F-Labeled Radiopharmaceuticals. **Journal pharmaceuticals**, 7, p. 621-633, doi: 10.3390/ph 7050621, 2014.
- LIAO, G. J.; CLARK, A. S.; SCHUBERT, E. K.; MANKOFF, D. A.; [18F]-Fluoroestradiol PET: Current Status and Potential Future Clinical Applications, **Journal of Nuclear Medicine**, doi:10.2967/jnumed.116.175596, 2016
- LOPES, C. A. S.; Carcinoma ductal in situ da mama, Oliveira, CF. **Manual de Ginecologia; Permanyer Portugal** 2009, p221-246, disponível http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_36.pdf, acessado em março 2020
- LÜTJE, S.; HESKAMP, S.; CORNELISSEN, A. S.; POEPEL, T. D. W.; BROEK, S. A. M. W.; ROSENBAUM-KRUMME, S.; BLCKISCH, A.; GOTTHARDT, M.; RIPKEMA, M.; BOERMAN. O. C.; PSMA ligands for radionuclide imaging and therapy of prostate cancer: clinical status. **Theranostic**, v.5, p.1388-1401, 2015
- MACHADO L. R.; MELO G. C.; Utilização do FMEA na melhoria de processos de fabricação da indústria farmacêutica; **XXVII Encontro Nacional de engenharia de Produção**, Foz do Iguaçu- PR; 2007
- MADAK, E. Z.; KIESER, J. K.; KIM, S. H.; KOMM, B.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, S.; Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. **Moecular and Endocrinology**. p2116-27, 2008

- MAMED, L.; SÉRGIO, M.A.; Lista de Recomendações do Exame PET/CT com 18F-FDG em Oncologia- Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular (SBBMN), Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC) e Instituto do Câncer (INCA), 2010
- MAPA LANAGRO, Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários, 2014. Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial, **Divisão de ensaios Químicos e Coordenação Geral de apoio Laboratorial**, Brasília, 2014
- MARENGO, M.; LODI, F.; MAGI, S.; CICORIA, G.; PANCALDO, D.; BOSHI, S.; Assessment of radionuclidic impurities in 2-[18f]fluoro-2-deoxy-D-glucose ([18F]FDG) routine production. **Applied Radiation and Isotopes** 66, p. 295-302, 2008
- MARY, L. G.; SUJATA, P.; VENKATRAMAN, E. S.; MICHELLE, S.; JOHN, L. H.; JASON, S. L.; EDI, B.; STEVEN, M. L.; MORROW, M.; NEETA, P; Feasibility and Predictability of Perioperative PET and Estrogen Receptor Ligand in Patients with Invasive Breast Cancer. *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE*. Vol. 54. No. 10. Pag. 1697-1702. 2013.
- MCLAREN, B. K.; GOBBI, H.; SCHUYLER, P. A.; OLSON, S. J.; PARL, F. F.; DUPONT, W. D.; PAGE, D. L.; Immunohistochemical expression. of estrogen receptor in enlarged lobular units with columnar alteration in benign breast biopsies: a nested case-control study. **the American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 1, p. 105-8, 2005.
- MINTUN, M. A.; WELCH, M. J.; SIEGEL, B. A.; Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors. **Radiology**. 1988;169:45–48. 10.
- MORANI, A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A.; Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med*. 2008; 264(2):128-42, 2008
- MORI, T.; KASAMATSU, S.; MOSDZIANOWSKI, C.; WELCH, M.J.; YONEKURA, Y.; FUJIBAYASHI, Y.; Automatic synthesis of 16 α -[¹⁸F] fluoro-17 β -estradiol using a cassette-type (¹⁸F)fluorodeoxyglucose synthesizer. **Science Direct. Applied Radiation and Isotopes**. 2005
- MORTIMER, J. E.; DEHDASHTI, F.; SIEGEL, B. A.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; FRACASSO, P.; WELCH, M. J.; Positron emission tomography with 2-18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose and 16 α -18F-fluoro-17 β -estradiol in breast cancer: correlation with estrogen receptor status and response to systemic therapy. **Clin Cancer Res.**; 2:933– 939. 1996
- NANDY, S. K.; Novel synthesis and purification process for pet radiopharmaceuticals for rapid and convenient production. **Homi Bhabha National Institute**. 2013
- NASCIMENTO, F. B.; PITTA, M. G. R.; RÉGO, M. J. B. M.; Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo, **SciELO**, ISSN 2183-2447, 2015
- NCI - [18F] Fluoroestradiol (FES) PET as a Predictive Measure for Endocrine Therapy in Patients With Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer, National Cancer Institute (NCI), (2016-2022)
- NIENHUIS, H.H.; KRUCHTEN, M. V.; ELIAS S.G.; GLAUDEMANS, A. W.J.M.; VRIES, E.F.J.; BONGAERTSY, A. H.H.; SCHRÖDER, C.P.; VRIES, E.G.E.; HOSPERS, G. A.P., 18F-Fluoroestradiol Tumor Uptake Is Heterogeneous and Influenced by Site of Metastasis in Breast Cancer Patients, **The Journal of Nuclear Medicine** doi: 10.2967, 2018
- OH, J.S.; CHI, D.Y.; MOSDZIANOWSKI, C.; KIL, H.S.; RYU, J.S.; MOON, D.H.; The automatic production of 16 α (¹⁸F)fluoroestradiol using a conventional (¹⁸F)FDG module with a disposable cassette system. *Science Direct. Applied Radiation and Isotopes*. Vol 65. pp 676–681. 2007
- OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C.; Física para ciências biológicas e biomédicas. **Copyright** p 28, 41, 1986

- PETERSON L. M. ; MANKOFF D. A. ; LAWTON T. S ; YAGLE K.; SCHUBERT E. K. ; STEKHOVA S.; GOWN A.; LINK J. M.; TEWSON, T.E. KROHN K. A; Quantitative Imaging of Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer with PET and 18F-Fluoroestradiol. **The Journal of Nuclear Medicine**. Vol. 49. Nº 3. 2008
- PETERSON, L.M.; KURLAND, B.F.; LINK, J.M.; SCHUBERT, E.K.; STEKHOVA, S.; LINDEN, H.M.; Factors influencing the uptake of 18F-fluoroestradiol in patients with estrogen receptor positive breast cancer. **Nucl Med Biol. Elsevier Inc.**; 38(7):969–78, 2011
- PHAROAH, P.D.P.; ANTONIOU, A.C.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.J.; Risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. **Nuclear Engl Jornal Medical**; 358 2796-803. 2008
- RAMOS, C. D.; JUNIO, J. S.; PET E PET / CT em Oncologia- Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular. **Atheneu**. SBB Medicina Nuclear. ISBN 978-85-388-0188-7. 2011
- RELACRE - VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA, *Guia RELACRE 13*, **Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal**, ISBN: 972-8574-02-9, 2000
- ROBILOTTA, C.C.; A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Revista Panamericana de Salud Pública**, vol. 20, no. 2-3, 2006.
- SALEM, K.; KUMAR, M.; POWERS, G. L.; JEFFERY, J. J.; YAN, Y.; APARNA, M. M.; FOWLER, A. M.; 18F-16a-17b-Fluoroestradiol Binding specificity in estrogen receptor–Positive Breast câncer, **Radiology**: V 286: n 3, 2018
- SALLES, M. A.; CÚRCIO, V. S.; PEREZ, A. A.; GOMES, D. S.; GOBBI, H.. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Minas Gerais, p. 213-222. jun. 2009.
- SANDLE T., The use of a risk assessment in the pharmaceutical industry – the application of FMEA to a sterility testing isolator: a case study. **European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences** V8(2) p43-49. January 2003
- SHAO, X.; HOAREAU, R.; HOCKLEY, B.; TLUCZEK, L.; HENDERSON, B.; PADGETT, H.; SCOTT, P. Highlighting the versatility of the tracerlab synthesis modules. Part 1: fully automated production of [18F] labelled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FXFN. **Journal of Labelled compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 54, n. 6, p. 292_307, 2011
- SHIOVITZ, S. L.; Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**; 26:1291-1299. doi: 10.1093/annonc/mdv02, 2015
- SILVA, I. S.; STAVOLA, B. L.; JUNIOR, N. L. R.; NOGUEIRA, M. C.; AQUINO, E. M. L.; TEIXEIRA, M. T. B.; SILVA, G. A.; Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001–14: a case only analysis, **Lancet Global Health**; 7: e784–97, 2019
- SNEIGE, N. E. T.; Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. **Mod Pathol**. 20 (10):1044-50 2015
- SUN, Y.; YANG, Z.; ZHANG, Y.; XUE, J.; WANG, M.; SHI, W.; The Preliminary Study of 16α-[18F]fluoroestradiol PET/CT in Assisting the Individualized Treatment Decisions of Breast Cancer Patients. **PLoS ONE** 10(1): e0116341. doi:10.1371/journal.pone.0116341. 2015
- TEWSON, T.J.; MANKOFF, D.A.; PETERSON, L.M.; WOO, I.; PETRA, P.; Interactions of 16α-[18F]-fluoroestradiol (FES) with sex steroid binding protein (SBP). **Nucl Med Biol Elsevier**; Feb 5; 26(8):905–1, 2015
- TNM Classification of Malignant Tumours - 6th ed. Edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. John Wiley & Sons, INC., Publication - 2002 ISBN 0-471-22288 acessado em março 2020 <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tnm2.pdf>

- TODOROV, B., BELOVEZHDOVA, I., ALANEN, O., AIRAKSINEN, A.J., DJINGOVA, R., Recycling of ^{18}F enriched water used in ^{18}F cyclotron production, **Applied Radiation and Isotopes** 145, 109–115, <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.12.013>, 2019
- TUNG, N.; BATTELLI, C.; ALLEN, B.; KALDATE, R.; BHATNAGAR, S.; BOWLES, K.; TIMMS, K.; GARBER, J.E.; HEROLD, C.; ELLISEN, L.; KREJDOVSKY, J.; DELEONARDIS, K.; SEDGWICK, K.; SOLTIS, K.; ROA, B.; WENSTRUP, R. J.; HARTMAN, A.R.; Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA 1 and BRCA 2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. **Cancer, American Cancer Society**, 121:25-33. <https://doi.org/10.1002/cncr.29010>, 2015
- UMC - FES ($^{16}\alpha$ - ^{18}F -Fluoro- $^{17}\beta$ -estradiol) -PET: Towards a New Standard to Stage Locally Advanced and Recurrent, Estrogen Receptor Positive (ER+) Breast Cancer? Pilot Study to Compare ^{18}F FES-PET and ^{18}F FDG-PET, VU University Medical Center, (2018-2020)
- UMCG - Towards Patient Tailored Cancer Treatment Supported by Molecular Imaging IMPACT: IMaging PATients for Cancer Drug selecTion - Metastatic Breast Cancer, University Medical Center Groningen, (2013 – 2020)
- USP, UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *USP/NF 2018 United States Pharmacopeia / National Formulary*. 21. ed. v. 1. **United States Pharmacopeia**, Rockville, USA, 2018.
- VICENTE, J.P., ROMERO J. E., BROCH S.C.; Chapter 13 Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview, **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.** V. 5, 2015
- VIJAYAKUMAR R., V., GANGADHARAPPA H. V.; SHASHIKANTH D., Risk assessment by using failure mode effective analysis (FMEA) tool : AN OVERVIEW, *World Journal of Pharmaceutical Research*, V4,n3 p 567 – 574, ISSN 2277-7105, 2015.
- WAHL, R. L.; Current Status of Pet in Breast câncer Imaging, Staging, and Therapy. **Seminars in Roentgenology**; Vol XXXVI, n3, p 250-260, 2001
- WAHL, R.L.; HERMAN, J. M.; FORD, E.; The Promise and Pitfalls of Positron Emission Tomography and Single-Photon Emission Computed Tomography Molecular Imaging–**Guided Radiation Therapy. Seminars in Radiation Oncology**, v. 21, n. 2, p. 88-100, 2011.
- WATERS, Brochura Waters Sep-Pak, disponível em <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?locale=119&partNumber=WAT0235>, acessado em Abr/2019
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Fortieth report. Technical Report Series 937. Geneva. p461. 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Radiopharmaceutical products. In: Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. *Good Manufacturing practices and inspection*. Geneva,. v.2, p. 130-153, 2004.
- YAMAGISHI, Y., YAMASAKI T., ISHIDA, J., MORIYA, T., EINAMA, T., KOIWA, T., FUKUMURA-KOGA, M., KONO, T., HAYASHI, K., UENO, H., YAMAMOTO, J., TSUDA, H., Utility of ^{18}F -Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography Fusion Imaging for Prediction of Metastasis to Sentinel and Nonsentinel Nodes in Patients with Clinically Node-Negative Breast Cancer, **Annals of surgical oncology**, doi: 10.1245/s10434-020-08269-0, 2020
- ZANETTE, C; Estudo da produção do Radiofármaco FLT-18 em sistema automatizado: contribuição para a validação do processo. Orientadora: Dra Elaine Bortoleti de Araújo. IPEN/SP. 2013.

- ZHOU, D. L. M.; YASUI, N.; AL-QAHTANI, M. H.; DENCE, C. S.; SCHWARZ, S.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; "Optimization of the preparation of fluorine-18-labeled steroid receptor ligands 16alpha-[18F]fluoroestradiol (FES), [18F]fluorofuranylnorprogesterone (FFNP), and 16beta-[18F]fluoro-5alpha-dihydrotestosterone (FDHT) as radiopharmaceuticals". ***Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals***, v. 57, p. 371-7 (2014).
- ZUPPAN, P.; HALL J. M.; PONGLIKITMONGKOL, M.; KING, M. C.; Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease. ***American Journal Human Genetic***, 48(6):1065-1068. 1991.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.