INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
“Autarquia associada à Universidade de São Paulo”

**Estudos de marcação do etidronato com ^{188}Re
proveniente de diferentes geradores de $^{188}\text{W} / ^{188}\text{Re}$**

BARBARA SZOT MARCZEWSKI

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

Orientador:

Dr. João Alberto Osso Júnior.

São Paulo
2006

Dedico às pessoas mais queridas da minha vida:

Meu marido Cleverson

Meu pai Hermann

Minha mãe Magda

Meus irmãos: Herbert, Breitner e Alexander.

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, pelo treinamento recebido para as práticas laboratoriais, assim como todo o recurso humano envolvido e disposto a esclarecer quaisquer dúvidas.

Reconheço toda disposição e a colaboração dos chefes e funcionários do instituto que permitiram realizar meus estudos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Comissão de Pós-Graduação pelo apoio financeiro.

À minha orientadora do IPEN: Dra. Letícia L. Campos, por ter me iniciado nos trabalhos do meio científico-tecnológico durante a graduação.

Ao meu marido sempre disposto a oferecer apoio, compreensão e todo o tempo necessário para a conclusão deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial à minha “oma” e aos meus pais por todo o carinho recebido até hoje.

Às bolsistas da “salinha”: Carla, Vanessa, Kátia, Renata e Giovana, pela ajuda recebida nos momentos mais apertados.

Em especial, por ter conquistado novos amigos que foram capazes de transformar o tempo de trabalho duro mais apazível, as dúvidas menos conflitantes e as alternativas menos rigorosas. Meus sinceros agradecimentos ao caro orientador desse projeto Dr. João Alberto Osso Júnior e às amigas da pós-graduação Carla R. B. R. Dias e Vanessa Moraes.

Estudos de marcação do etidronato com ^{188}Re proveniente de diferentes geradores de $^{188}\text{W} / ^{188}\text{Re}$.

Barbara Marczewski

RESUMO

O interesse pelo ^{188}Re para aplicações terapêuticas na medicina nuclear é devido à meia-vida de 16,9 horas, emissão de partículas β^- com energia máxima de 2,12 MeV e raios- γ de 155 keV adequados para a aquisição de imagens. O estudo apresenta a radiomarkação do HEDP (etidronato) com o ^{188}Re eluído de geradores de $^{188}\text{W} / ^{188}\text{Re}$ a base de Al_2O_3 e tipo-gel ^{188}WZr . A dependência do rendimento do ^{188}Re -HEDP na concentração do agente redutor, pH, tempo de reação, temperatura e adição de carregador Re_2O_7 foram avaliados. A partir das condições ótimas de marcação os rendimentos do ^{188}Re -HEDP foram $\geq 98\%$ tanto para os kits líquidos como liofilizados. A formulação padrão que representou esses resultados contém: 30 mg de HEDP, 7 mg de SnCl_2 , 3 mg de ácido ascórbico e adição de 20 μg de Re_2O_7 . As reações foram conduzidas sob aquecimento de 100 °C por 30 minutos, seguidos de 60 minutos de incubação. Outro aspecto importante do trabalho foi o controle de qualidade radioquímico, comparando os resultados de CP, CCD e cromatografia iônica, além dos experimentos com a CLAE. A distribuição biológica realizada comprovou a captação pelo esqueleto e a estabilidade *in vivo* dos complexos de ^{188}Re -HEDP.

Studies of HEDP labelled with ^{188}Re from different generators of $^{188}\text{W} / ^{188}\text{Re}$.

Barbara Marczewski

ABSTRACT

The widespread interest in ^{188}Re for therapeutic applications, is due to its attractive 16,9 hours half-life, emission of a β^- particle with maximum energy of 2.12 MeV and gamma-ray of 155 keV suitable for imaging. This work presents the radiolabeling of HEDP (etidronate) with ^{188}Re eluted from alumina-based $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators and tungstate-based $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ gel generators. Dependence of the yield of the ^{188}Re -HEDP on the concentration of the reduction agent, pH, reaction time, temperature and addition of carrier Re_2O_7 were evaluated. The radiolabeling of ^{188}Re -HEDP procedure using the optimum conditions resulted a yield $\geq 98\%$ for liquid and lyophilized kits. This basic formulation contains: 30 mg de HEDP, 7 mg de SnCl_2 , 3 mg de ascorbic acid and addition of 20 μg of Re_2O_7 . The reactions were carried out with heating in boiling water for 30 minutes followed by 60 minutes of incubation. Another important aspect of this work was the radiochemical quality control comparing the results of PC, TLC and ion chromatography, along with the experiments with HPLC. The biological distribution proved the adequate bone uptake and in vivo stability of ^{188}Re -HEDP complexes.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico dos Elementos W e Re.....	2
1.2 Radioisótopos na Medicina.....	5
1.3 Produção dos Geradores ^{188}W / ^{188}Re	6
1.3.1 Princípios de um Gerador.....	6
1.3.2 Materiais Adsorventes e Métodos de Separação.....	7
1.3.3 Produção do ^{188}W	11
1.3.4 Propriedades Físicas do ^{188}Re	14
1.3.5 Sistema “Tandem” de Concentração – STC.....	14
1.4 Radiofármacos Preparados com ^{188}Re	17
1.4.1 Fosfonatos na Medicina Nuclear.....	20
1.4.2 Tecido Ósseo: um sítio metastático.....	25
1.4.2.1 Dor Óssea.....	28
1.5 Radiomarcagem do ^{188}Re -HEDP.....	31
1.5.1 Analogia no Preparo de Agentes Terapêuticos.....	31
1.5.2 Propriedades Químicas do ^{188}Re	31
1.5.3 HEDP (Etidronato).....	32
1.5.4 Agente Redutor.....	33
1.5.5 Estudos Clínicos do ^{188}Re -HEDP.....	34
1.6 IPEN: Justificativa.....	35
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Infra-Estrutura e Equipamentos.....	37
3.2 Lista de Materiais e Reagentes.....	37
3.3 Preparo das Soluções.....	39
3.3.1 Preparo da Solução do Ligante.....	39
3.3.2 Preparo da Solução de Carregador.....	40
3.3.3 Preparo da Solução Tampão.....	40

3.4	Preparação dos Kits Liofilizados.....	40
3.4.1	Liofilização.....	40
3.5	Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$	41
3.5.1	Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Importado – ORNL.....	41
3.5.1.1	Eluição do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ – ORNL.....	42
3.5.2	Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Importado – POLATON.....	43
3.5.2.1	Eluição do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Importado – POLATON.....	43
3.5.3	Preparo dos Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Nacionais.....	44
3.5.3.1	Preparo do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ – Al_2O_3	44
3.5.3.2	Preparo do Gerador Tipo Gel ^{188}WZr	45
3.5.3.3	Eluições dos Geradores Nacionais.....	47
3.5.4	STC – Sistema <i>Tandem</i> de Concentração do ^{188}Re	47
3.6	Marcação do ^{188}Re -HEDP.....	48
3.6.1	Marcação dos Kits: Líquidos e Liofilizados.....	48
3.6.2	Variáveis Estudadas.....	49
3.6.2.1	Efeito da Massa do Agente Redutor.....	49
3.6.2.2	Efeito da Massa do HEDP.....	49
3.6.2.3	Temperatura e Tempo de Reação.....	50
3.6.2.4	Uso do Carregador.....	50
3.6.2.5	Influência do pH.....	50
3.6.2.6	Estabilidade dos Kits Líquidos e Liofilizados.....	51
3.6.2.7	Estabilidade da Radiomarcção.....	51
3.7	Controle de Qualidade.....	51
3.7.1	Pureza Radionuclídica.....	52
3.7.2	Pureza Radioquímica.....	52
3.7.3	Cromatografia.....	53
3.7.3.1	CP e ITLC-SG.....	54
3.7.3.1.1	Suportes e Fase Móvel.....	55
3.7.4	Cromatografia de Troca Iônica – CI.....	55
3.7.4.1	Matrizes dos Suportes Seleccionados.....	57
3.7.4.1.1	Trocadores com Matriz de Dextrano.....	57
3.7.4.1.2	Trocadores Orgânicos Sintéticos.....	58
3.7.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	60

3.7.6	Distribuição Biológica do ^{188}Re -HEDP.....	61
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1	Eluição dos Geradores.....	62
4.1.1	Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) – Importados	62
4.1.2	Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) – Nacional.....	64
4.1.3	Gerador Tipo-Gel de ^{188}WZr	67
4.1.4	Sistema Tandem de Concentração: STC.....	68
4.2	Variáveis Estudadas na Marcação do ^{188}Re -HEDP.....	71
4.2.1	Efeito da Massa do Agente Redutor.....	71
4.2.2	Efeito da Massa do HEDP.....	74
4.2.3	Tempo de Marcação.....	76
4.2.4	Temperatura.....	78
4.2.5	Carregador.....	84
4.2.6	Influência do Volume de Kit Líquido.....	88
4.2.7	Efeito da Adição de Solução Tampão.....	89
4.2.8	Estabilidade dos Kits Líquidos.....	91
4.3	Kits Liofilizados.....	92
4.3.1	Radiomarcção.....	93
4.3.2	Estabilidade dos Kits Liofilizados.....	95
4.3.3	Estabilidade dos Complexos ^{188}Re -HEDP.....	97
4.3.3.1	Estabilidade x Atividade.....	97
4.3.3.2	Estabilidade x Tempo de Incubação.....	98
4.4	Gerador Tipo– Gel ^{188}WZr : Estudos de Radiomarcção.....	100
4.5	Cromatografia de Troca Iônica – CI.....	102
4.5.1	Trocadores com Matriz de Dextrano.....	102
4.5.2	Trocador Orgânico Sintético – QMA.....	105
4.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	111
4.7	Distribuição Biológica do ^{188}Re -HEDP.....	117
4.7.1	Aquisição de Imagens Cintilográficas.....	117
5.	CONCLUSÃO.....	120
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Exemplos de isótopos naturais e sintéticos do tungstênio	3
TABELA 2. Principais isótopos do elemento rênio	4
TABELA 3. Exemplos de sistemas de geradores de radionuclídeos utilizados em diagnósticos	8
TABELA 4. Sistemas de geradores de radionuclídeos com aplicações terapêuticas	9
TABELA 5. Incidência de metástases ósseas	27
TABELA 6. Radiofármacos para terapia de metástases ósseas	30
TABELA 7. Suportes e FM utilizados nas cromatografias CP e CCD	55
TABELA 8. Rendimentos da primeira e segunda eluição (gerador ORNL)	62
TABELA 9. Eluições do gerador POLATON	64
TABELA 10. Exemplo do desempenho da eluição do segundo gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) nacional.....	66
TABELA 11. Desempenho do gerador tipo-gel de ^{188}WZr	67
TABELA 12. Percentual relativo a cada unidade do STC observado nos experimentos	69
TABELA 13. Atividades concentradas pelo STC	69
TABELA 14. Resultados dos experimentos de marcação em temperatura ambiente sem adição de carregador	79
TABELA 15. Resultados dos experimentos de marcação em temperatura ambiente e uso de carregador	80
TABELA 16. Resultados das reações de marcação com aquecimento sem adição de carregador	81
TABELA 17. Resultados das reações de marcação com aquecimento e uso de carregador	82
TABELA 18. Rendimentos de marcação para a FP sem adição de carregador e solução tampão	85
TABELA 19. Separação percentual das impurezas e Re livre, (de acordo com os resultados da TAB. 14)	86
TABELA 20. Rendimentos de marcação da FP com carregador e com aquecimento	87

TABELA 21. Resultados das marcações dos kits liofilizados (com ácido ascórbico) em temperatura ambiente	93
TABELA 22. Resultados das marcações dos kits liofilizados (com ácido ascórbico) com aquecimento	94
TABELA 23. Resultados das marcações com os eluatos do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) – Nacional.....	95
TABELA 24. Rendimentos de marcação de kits liofilizados da FP com ácido gentísico após 8 meses de produção	96
TABELA 25. Resultados dos cromatogramas com Whatman 01 e ITLC-SG até 30 horas de armazenamento	99
TABELA 26. Diferentes kits liofilizados marcados com o eluato do gerador tipo-gel ^{188}WZr	100
TABELA 27. Kit liofilizado (com ácido ascórbico) marcado com o eluato do gerador tipo-gel ^{188}WZr	101
TABELA 28. Rendimentos de marcação obtidos com cromatogramas de Whatman 01, ITLC-SG e Sephadex G-25	103
TABELA 29. Resultados dos rendimentos de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP (kit líquido) antes e depois do QMA	106
TABELA 30. Resultados dos rendimentos de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP (kit liofilizado) antes e depois do QMA	107
TABELA 31. Resultados dos rendimentos de marcação do ^{188}Re -HEDP (kit líquido) antes e depois do QMA	108
TABELA 32. Relação das variáveis de marcação dos principais autores estudados	115

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Coluna pequena com 6 gramas de alumina para alta atividade específica de ^{188}W e volume de eluição entre 10 e 12 mL – produzida pela Oak Ridge National Laboratory	10
FIGURA 2. Produção e esquema de processamento do ^{188}W	12
FIGURA 3. Produção e decaimento do ^{188}W e ^{188}Re	13
FIGURA 4. Curva de crescimento do ^{188}Re até a condição de equilíbrio	13
FIGURA 5. Representação funcional do STC	15
FIGURA 6. Esquema do sistema de concentração <i>tandem</i> do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ completo	16
FIGURA 7. Estrutura química do pirofosfato e dos <i>BFs</i>	20
FIGURA 8. Estruturas químicas dos <i>BFs</i> investigados para uso humano	21
FIGURA 9. Imagem histológica do osso normal e um grupo de osteoclastos ativos (Lâmina corada com Tricrômico de Goldner e aumento de 500x)	26
FIGURA 10. Mecanismo geral de células tumorais metastáticas no osso	28
FIGURA 11. Esquema para eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ sem STC	42
FIGURA 12. Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ importado da Polônia	43
FIGURA 13. Ampola de polipropileno com o $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ e as blindagens de alumínio e chumbo	44
FIGURA 14. Coluna de vidro do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ e esquema de eluição	45
FIGURA 15. Esquema da montagem do gerador tipo-gel de ^{188}WZr	46
FIGURA 16. Esquema para eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional	47
FIGURA 17. Imagem do STC montado com os cartuchos de troca iônica	48
FIGURA 18. Esquema dos suportes cromatográficos CP e CCD	54
FIGURA 19. Perfil da primeira eluição do gerador importado	63
FIGURA 20. Desempenho da eluição do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional	65
FIGURA 21. Perfil da eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional	66

FIGURA 22. Desempenhos das eluições do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ e dos cartuchos QMA	70
FIGURA 23. Curva de eficiência de marcação em função da massa de agente redutor	72
FIGURA 24. Eficiência de marcação em função da massa de agente redutor em reações conduzidas sob aquecimento	72
FIGURA 25. Efeito da concentração de HEDP na formação dos complexos	74
FIGURA 26. Efeito da massa de HEDP em reações submetidas ao aquecimento	75
FIGURA 27. Variação do tempo de marcação para a formulação FP	77
FIGURA 28. Variação do volume de agentes e condições experimentais	88
FIGURA 29. Efeito do volume de solução tampão no ^{188}Re -HEDP	89
FIGURA 30. Efeito da adição de solução tampão nos complexos formados com aquecimento	90
FIGURA 31. Perda da eficiência de marcação em função do período de estocagem do kit líquido	91
FIGURA 32. Kits liofilizados, frascos da esquerda: solução do ligante com ácido gentísico e frascos da direita: solução do ligante com ácido ascórbico	92
FIGURA 33. Perfil do rendimento de marcação para diferentes variáveis e atividade de 3,33 GBq	97
FIGURA 34. Perfil do rendimento de marcação para diferentes variáveis e atividade de 1,85 GBq	98
FIGURA 35. Curva de eluição do ^{188}Re -HEDP (pH 1,5) e do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$	102
FIGURA 36. Perfil de eluição pela coluna Sephadex G-25 do ^{188}Re -HEDP com pH 5	104
FIGURA 37. Resultados da separação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP de kits líquidos da FP	105
FIGURA 38. Resultados da separação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP de kits liofilizados da FP	106
FIGURA 39. Resultados da separação com o QMA do ^{188}Re -HEDP (kit líquido)	108
FIGURA 40. Comparação dos perfis de eluição dos complexos de $^{188/186}\text{Re}$ -HEDP com um gradiente de eluição e aumento da força iônica da solução	109
FIGURA 41. Comparação dos perfis de eluição dos complexos de $^{188/186}\text{Re}$ -HEDP com o ^{188}Re -HEDP (IPEN) sem diluição prévia	110
FIGURA 42. Eluição do ^{188}Re -HEDP pela coluna de CLAE C-18	111
FIGURA 43. Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH final 1,5	112
FIGURA 44. Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH 5 – logo após a marcação ...	113

FIGURA 45. Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH 5 – após 30 horas do início da marcação	114
FIGURA 46. Animal 1 e 2 com o produto injetado – ^{188}Re -HEDP, preparado com kit liofilizado com ácido ascórbico	118
FIGURA 47. Animal 3 com o produto injetado – ^{188}Re -HEDP, preparado com kit liofilizado com ácido gentísico	119

1. INTRODUÇÃO

Uma das linhas mais recentes da Medicina Nuclear é o uso de radioterápicos, que são radioisótopos injetáveis com características físicas de decaimento adequadas para uso terapêutico. Para tal aplicação se destacam o ^{188}Re , o ^{90}Y , o ^{153}Sm e o ^{177}Lu . Dentre estes, os produtos ^{153}Sm -EDTMP (Ácido-etileno-diaminotetrametileno-fosfônico) e ^{153}Sm -HA (Hidroxiapatita) são produtos de distribuição rotineira do IPEN.

A participação do Brasil, nos estudos sobre o preparo de geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, vinculada ao projeto de coordenação internacional da *IAEA (International Atomic Energy Agency)*, além de contribuir com resultados, pode ser o primeiro passo para a distribuição dos geradores para a classe médica.

O interesse no ^{188}Re é grande e mesmo que o reator do IPEN não forneça o fluxo necessário para a produção do pai radioativo do ^{188}Re (o ^{188}W), em escala que atenda a demanda, existe a possibilidade da importação do ^{188}W , estratégia usada no início dos anos 80 com os geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

O presente estudo contribui com informações iniciais sobre o comportamento radioquímico do ^{188}Re , a metodologia de radiomarcagem e a montagem dos geradores, importantes para o conhecimento e o desenvolvimento dessa tecnologia.

1.1 Histórico dos Elementos W e Re

Em 1783, o tungstênio foi descoberto na Espanha pelos irmãos Fausto e Juan Jose de Elhuyar que encontraram um ácido na wolframita que era idêntico ao ácido túngstico e conseguiram isolar o tungstênio a partir da redução do ácido com carvão vegetal. (SITE 1)

A origem do nome parte do idioma sueco “*tung sten*” o mesmo que “*pedra pesada*” e o símbolo do elemento químico (W), provém do nome em alemão dado ao mineral *wolframita*. Possui número atômico 74 e massa atômica relativa no valor de 183,85 u. Situado no grupo 6 da tabela periódica, é um metal de transição. O tungstênio tem brilho metálico cinza-prateado, é um metal muito denso e de altíssimos pontos de fusão e ebulição (o mais alto entre os metais). Apresenta configuração eletrônica $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^4 6s^2$.

O tungstênio não é abundante na natureza, as concentrações de tungstênio que existem nos minerais wolframita – tungstato de ferro e manganês: $(\text{Fe,Mn})\text{WO}_4$ e scheelita – tungstato de cálcio: CaWO_4 , ficam na faixa de 0,5 a 2 %, sob a forma de óxido túngstico.

O estado de oxidação mais comum do tungstênio é +6, porém exhibe todos os estados de oxidação desde -2 até +6. A combinação típica do tungstênio é com o oxigênio, produzindo óxido de tungstênio (WO_3), de coloração amarela que se dissolve em soluções aquosas alcalinas originando íons tungstato (WO_4^{2-}). A TAB. 1 mostra alguns isótopos naturais e sintéticos do tungstênio.

TABELA 1. Exemplos de isótopos naturais e sintéticos do tungstênio. (SITE 2)

Nuclídeos	Massa Atômica Relativa	Nº de Nêutrons	Abund %	Spin	Meia-vida	MD	PD	Energia máxima (MeV)
^{180}W	179,947	106	0,13	0+	Estável			
^{181}W	180,948	107	S	9/2+	121,2 dias	ϵ	^{181}Ta	0,188
^{182}W	181,948	108	26,3	0+	Estável			
^{183}W	182,950	109	14,3	$\frac{1}{2}-$	$>1,1 \times 10^{17}$ anos	-	-	-
^{184}W	183,951	110	30,7	0+	$>3 \times 10^{17}$ anos	α	^{180}Hf	-
^{185}W	184,953	111	S	3/2-	75,1 dias	β^-	^{185}Re	0,433
^{186}W	185,954	112	28,6	0+	Estável			
^{187}W	186,957	113	S	3/2-	23,72 horas	β^-	^{187}Re	1,311
^{188}W	187,958	114	S	0+	69,4 dias	β^-	^{188}Re	0,349

Observações:

- a) Abund % = Abundância Natural;
- b) S = Nuclídeo Sintético;
- c) MD = Modo de Decaimento:
 α = Emissão alfa;
 β^- = Emissão beta menos;
 ϵ = Captura eletrônica;
- d) PD = Produto do Decaimento;
- e) Não foram incluídas as energias dos nuclídeos metaestáveis;
- f) O traço indica valores não encontrados e/ou não existentes.

O rênio foi descoberto na Alemanha em 1925, por Walter Noddack, Ida Tacke e Otto Berg, que observaram a presença do elemento em minerais de platina, na columbita (tântalo-niobato de ferro e manganês), na gadolinita (silicato de berílio, ferro e ítrio) e na molibdenita (sulfeto de molibdênio). Em 1928, conseguiram extrair 1 g de rênio a partir do processamento de aproximadamente 660 kg de molibdenita. O rênio (do latim *Rhenus* - o rio Reno), foi o último elemento natural a ser descoberto. (SITE 3)

O símbolo do elemento químico é Re, com número atômico 75 e massa atômica relativa no valor de 186,2 u. Está classificado no grupo 7 e período 6 da tabela

periódica dos elementos, juntamente com os outros metais de transição manganês, tecnécio e bório. Apresenta a configuração eletrônica [Xe] 4f¹⁴ 5d⁵ 6s².

O rênio natural é uma mistura de dois isótopos estáveis, o ¹⁸⁵Re com abundância de 37,4% e o ¹⁸⁷Re com abundância de 62,6%. Os estados de oxidação do rênio incluem -1, +1, +2, +3, +4, +5, +6 e +7, sendo os mais comuns +7, +6, +4, +2 e -1. Sua forma comercial geralmente é em pó, porém, pode ser obtido na forma compacta com até 90% da sua densidade teórica.

Raramente encontrado na natureza, é obtido como subproduto do processamento de minerais de molibdênio. O Re é um elemento metálico com alta força de tensão (8x10⁴ psi), ao ser acrescentado ao tungstênio ou molibdênio, forma componentes metálicos refratários supercondutores. Na TAB. 2 estão relacionados os principais isótopos do Re.

TABELA 2. Principais isótopos do elemento rênio. (SITE 2)

Nuclídeos	Massa Atômica Relativa	Nº de Nêutrons	Abund %	Spin	Meia-vida	MD	PD	Energia máxima (MeV)
¹⁸⁵ Re	184,953	110	37,4	5/2+	Estável			
¹⁸⁶ Re	185,955	111	S	1-	3,718 dias	β ⁻	¹⁸⁶ Os	1,069
					3,718 dias	ε	¹⁸⁶ W	0,582
¹⁸⁷ Re	186,956	112	62,6	5/2+	4,35x10 ¹⁰ anos	α	¹⁸³ Ta	1,653
					4,35x10 ¹⁰ anos	β ⁻	¹⁸⁷ Os	0,003
¹⁸⁸Re	187,958	113	S	1-	17,005 horas	β⁻	¹⁸⁸Os	2,120

Observações:

- a) Abund % = Abundância Natural;
- b) S = Nuclídeo Sintético;
- c) MD = Modo de Decaimento:
 - α = Emissão alfa;
 - β⁻ = Emissão beta menos;
 - ε = Captura eletrônica;
- d) PD = Produto do Decaimento;
- e) Não foram incluídas as energias dos nuclídeos metaestáveis;
- f) O traço indica valores não encontrados e/ou não existentes.

1.2 Radioisótopos na Medicina

A radioatividade natural foi descoberta em 1896 por Henri Becquerel. Em 1902, Rutherford e Soddy formularam as leis exponenciais da série de decaimento radioativo e crescimento de radionuclídeos para explicar os resultados dos estudos com tório. Em 1910, Bateman descreveu expressões matemáticas para o decaimento e crescimento dos radioisótopos naturais das séries do actínio, urânio e tório até meados dos anos 30, quando a fissão nuclear foi descoberta e com ela novas séries de decaimento radioativo. (LAMBRECHT, 1983)

Em resumo, novas descobertas científicas como o ciclotron, desenvolvido por Lawrence e Livingston em 1930, a descoberta do nêutron por Chadwick em 1932 e o bombardeamento por nêutrons por Enrico Fermi e colaboradores em 1934, permitiram o desenvolvimento dos radioisótopos artificiais.

Os cientistas começaram a aplicar materiais radioativos em animais para estudar os processos metabólicos, gerando conhecimentos para a aplicação no tratamento de câncer. Em 1925, Herman Blumgart e Otto Yens utilizaram o bismuto (^{214}Bi) para estudos da circulação sanguínea e em 1935 O. Chieivitz e Georg de Hevesy administraram o fósforo (^{32}P) no estudo da fisiologia óssea. (SITE 4)

As primeiras aplicações terapêuticas dos radioisótopos foram realizadas em 1936, por John H. Lawrence com o fósforo (^{32}P) e Joseph Gilbert Hamilton e Robert Spencer Stone com o sódio (^{24}Na) para o tratamento de leucemia. Em 1939, Joseph Gilbert Hamilton, Mayo Soley e Robley Evans publicaram o uso do iodo (^{131}I) em diagnóstico.

Embora o tecnécio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) tenha sido descoberto em 1938 por Emilio Segre e Glenn Seaborg, somente em 1957 esse radioisótopo artificial de meia-vida curta foi disponibilizado com o uso de geradores. Atualmente cerca de 75% das aplicações utilizam o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em radiofármacos como ferramentas indispensáveis na medicina nuclear para fins de diagnósticos em todo o mundo.

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é utilizado com uma certa facilidade para a preparação de diferentes radiofármacos, por meio de formulações pré-estabelecidas que são os conjuntos de reativos liofilizados ou “kits” para os procedimentos de diagnósticos de diferentes órgãos e tecidos humanos. Já para os procedimentos terapêuticos ainda não existe um radionuclídeo ideal como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é utilizado em procedimentos de diagnósticos.

O aumento global da terapia radionuclídica com fontes radioativas não-seladas (radiofármacos) revela a tendência para seu uso rotineiro, porém, os estudos ainda buscam uma variedade de radioisótopos terapêuticos a custos efetivos. Os radioisótopos terapêuticos de atual interesse para essas aplicações são ^{166}Ho , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{188}Re e ^{90}Y . As aplicações terapêuticas incluem os tratamentos de câncer, paliativo da dor óssea, artrite reumatóide e inibição da restenose coronária. Dessa maneira, a tecnologia dos geradores de radionuclídeos poderá ser um meio efetivo para também dispor os radionuclídeos terapêuticos de meia-vida curta nos departamentos de medicina nuclear. (Report - CRP, 2006)

1.3 Produção dos Geradores ^{188}W / ^{188}Re

1.3.1 Princípios de um gerador

Um gerador é construído baseado no decaimento do radioisótopo pai de meia-vida longa e no crescimento do radioisótopo filho de meia vida curta. O sistema de gerador facilita a separação físicoquímica dos radioisótopos e podem ser classificados de acordo com o modo de produção do radionuclídeo pai em acelerador ou reator, o modo de decaimento ou a meia-vida do pai e filho e as aplicações dos radioisótopos. (KNAPP et al., 1995)

O uso dos radioisótopos em medicina nuclear depende da disponibilidade de produção do radioisótopo pai. A importância da criação do gerador se dá ao fato dos radionuclídeos de meia-vida longa serem transportados para pontos distantes dos locais de produção, servindo de fontes de radionuclídeos de meia-vida curta.

Os radioisótopos produzidos em reator são formados pela interação e/ou absorção dos nêutrons pelo núcleo alvo e frequentemente decaem com emissão β^- . Devido à prevalência desse tipo de decaimento, muitos radioisótopos produzidos em reator têm uma aplicação terapêutica. Em contraste, os radioisótopos produzidos pelo bombardeamento de prótons em aceleradores são ricos em prótons ou deficientes em nêutrons, e em virtude do modo de decaimento apresentado (captura eletrônica (C.E.) ou β^+) são utilizados em diagnósticos com procedimentos de PET “tomografia por emissão de pósitron” e SPET “tomografia por emissão de fóton único”. (KNAPP & MIRZADEH, 1994)

Um gerador de radionuclídeo deve ser estéril e livre de pirogênio, dessa forma sua produção deve respeitar as boas práticas de fabricação. O uso do gerador envolve uma técnica de eluição simples e são usados outros parâmetros para definir o desempenho dos geradores. O primeiro parâmetro é o rendimento de eluição caracterizado pela atividade de radioisótopo filho no volume eluído. O segundo é a determinação da quantidade de radioisótopo pai presente no eluato como contaminante.

1.3.2 Materiais Adsorventes e Métodos de Separação

A escolha dos materiais adsorventes do radionuclídeo pai é a chave para o desenvolvimento de um sistema de gerador de radionuclídeo, pois o sistema libera o radionuclídeo filho de um modo prático e reprodutível. A determinação do melhor adsorvente é um processo empírico de avaliação do potencial de ligação do radionuclídeo pai e suas diferentes espécies químicas pelo material adsorvedor.

A avaliação deve observar:

- A natureza do adsorvente;
- O estado de oxidação e a forma química do radionuclídeo pai;
- O pH;
- A natureza química e o caráter de complexação da solução de eluição.

Outros fatores incluem o dano potencial de irradiação e o processo de radiólise da água que também pode ocorrer no material e prejudicar a performance do gerador. O processo de construção é em etapas, onde a primeira delas é o uso de um protótipo para avaliar o desempenho e a segurança antes da construção de um gerador com potencial clínico.

Estruturalmente um gerador cromatográfico é composto de uma coluna de vidro ou plástico, preenchida com materiais adsorventes para o radionuclídeo pai. Os exemplos de materiais mais comuns são: resina catiônica ou aniônica, alumina e zircônio.

No gerador, com o decaimento do radionuclídeo pai e o crescimento do radionuclídeo filho até atingirem um equilíbrio transiente ou secular, eles podem ser separados por apresentarem diferentes propriedades químicas. O radionuclídeo filho é

retirado do material adsorvente ao se percolar um solvente pelo material da coluna com ajuda do vácuo, enquanto o radionuclídeo pai continua adsorvido após esse processo que é chamado de eluição. Assim, após a eluição, a atividade do filho torna a crescer até atingir novamente o equilíbrio. O eluato deve estar livre do radioisótopo pai e do material que preenche a coluna. As TAB. 3 e TAB. 4, mostram exemplos de geradores usados em medicina nuclear para diagnóstico e terapia. (KNAPP et al., 1995)

O gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um exemplo de um processo de separação do tipo cromatográfico, sendo este o método mais simples para serem manipuladas repetidas eluições. O radionuclídeo pai é adsorvido em uma base de alumina e o filho é eluído com solução de NaCl 0,9%. Baseados nas técnicas de separação existem mais três tipos de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$: o gerador de sublimação, o gerador de extração por solvente e o gerador cromatográfico tipo gel.

TABELA 3. Exemplos de sistemas de geradores de radionuclídeos utilizados em diagnósticos.

<i>Pai</i>	<i>Modo de produção</i>	<i>Meia-vida</i>	<i>MD</i>	<i>MS</i>	<i>Filho</i>	<i>Meia-vida</i>	<i>MD</i>	<i>Emissão principal E, keV(%)</i>	<i>PD</i>
^{99}Mo	Fissão (Reator)	66,02 horas	β^-	Al_2O_3 / Solvente: NaCl 0,9%	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02 horas	TI	140 (89)	^{99}Tc
^{81}Rb	^{82}Kr (p,2n) Cíclotron	4,58 horas	ε β^+	Bio-Rad AG 50 / Solvente: H_2O	$^{81\text{m}}\text{Kr}$	13 segundos	TI	190 (67)	^{81}Kr
$^{87}\text{Y}^{(*)}$	^{88}Sr (p,2n) Cíclotron	80,3 horas	ε	Resina Dowex 1 X 8 / Solvente: NaHCO_3 0,15 M	$^{87\text{m}}\text{Sr}$	2,8 horas	TI	388 (82)	^{87}Sr

Observações: (*) gerador indisponível no mercado;
MD = Modo de decaimento:
 β^- = Emissão beta menos; ε = Captura eletrônica;
MS = método de separação:
(material adsorvente / exemplo de solvente);
PD= Produto do decaimento.

TABELA 4. Sistemas de geradores de radionuclídeos com aplicações terapêuticas.

<i>Pai</i>	<i>Modo de produção</i>	<i>Meia-vida</i>	<i>MD</i>	<i>AD</i>	<i>Filho</i>	<i>Meia-vida</i>	<i>MD</i>	<i>Emissão principal E, MeV(%)</i>	<i>PD</i>
^{90}Sr	Fissão (Reator)	28,8 anos	β^-	Extração por solvente	^{90}Y	64,06 horas	β^-	2,288 (100)	^{90}Zr
^{188}W	Reator	69,4 dias	β^-	Al_2O_3 ou ZrO	^{188}Re	16,9 horas	β^-	2,116 (79)	^{188}Os
^{194}Os	Reator	6,0 anos	β^-	Carbono	^{194}Ir	19,15 horas	β^-	2,236 (89)	^{194}Pt

Observações:

MD = Modo de decaimento;

AD = Exemplo de adsorvente;

PD= Produto do decaimento.

Os principais estudos do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ estão focalizados no sistema cromatográfico com base de alumina. Assim, o tungstênio na forma química de $\text{WO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ou WO_4^{2-} , é adsorvido na alumina por ser o material com melhores características de adsorção e estabilidade numa larga faixa de pH. O ^{188}Re é eluído com solução de NaCl 0,9% por apresentar rendimentos de eluições superiores a outros sistemas de solventes (KAMIOKI et al., 1994). Os íons de tungstato permanecem adsorvidos após a eluição, retirando o radioisótopo ^{188}Re na forma de perrenato de sódio ($\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$).

O ^{188}W utilizado nos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ com base de alumina deve apresentar alta atividade específica para possibilitar a montagem do gerador com colunas pequenas e obter a máxima concentração da atividade do ^{188}Re com baixo volume de eluição. A FIG. 1 mostra um exemplo de coluna de vidro preenchida pelo material adsorvente do gerador de radioisótopo $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.

FIGURA 1. Coluna pequena com 6 gramas de alumina para alta atividade específica de ^{188}W e volume de eluição entre 10 e 12 mL – produzida pela *Oak Ridge National Laboratory*.

Nos países em desenvolvimento, cujos reatores de pesquisa não possuem um fluxo de nêutrons adequado para a produção de ^{188}W com alta atividade específica, e a importação se torna economicamente inviável por aumentar os custos, uma alternativa para disponibilização é o desenvolvimento de sistemas de geradores tipo-gel. Estes utilizam zircônio ou outro metal (ex. titânio) para formar o ^{188}W W-gel de tungstato que combinados às técnicas de concentração da atividade podem viabilizar a utilização do ^{188}W com baixa atividade específica. (DADACHOV et al., 2002; PONSARD et al., 2003)

Os geradores tipo gel permitem trabalhar com uma atividade específica baixa de ^{188}W , para alvos irradiados nos reatores de médio ou baixo fluxo, tanto os enriquecidos em W (50-60% enriquecidos com ^{186}W), como teoricamente, o isótopo natural de W com abundância de 28,6% do ^{186}W .

O principal problema para a produção dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ é a disponibilidade de ^{188}W com atividade específica suficiente. Outras dificuldades são a dissolução dos alvos de W e a sua transferência para uma matriz insolúvel que seleciona as espécies de W para adsorção. (BRODSKAYA & GAPUROVA, 1993)

Atualmente existe o interesse no desenvolvimento e avaliação de outros materiais adsorvedores, como os géis compostos de Zr ou Ti previamente estudados e que mostraram ter alta capacidade de ligação com o radionuclídeo pai e podem ser úteis nas preparações das colunas dos geradores tanto de ^{188}Re como de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. (Report - CRP, 2006)

DADACHOV et al. (2002), estudaram um gerador com gel de titânio, a partir de alvos naturais de óxido de tungstênio irradiados com um reator de fluxo moderado. O desempenho da eluição de ^{188}Re no gerador de gel pós-formado nesses estudos apresentaram-se similares ao gerador convencional de alumina, porém, as impurezas radionuclídicas formadas durante o processamento foram separadas do eluato com colunas Sep Pak de alumina.

OLIVEIRA (2004), iniciou estudos de produção de geradores $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ com baixa atividade específica a base de gel de WZr no Brasil, com ativação de alvos de W e WO_3 irradiados no reator IEA R1m do IPEN-CNEN/SP, que opera com um fluxo de nêutrons na ordem de $5 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, considerado insuficiente para a obtenção do ^{188}W com alta atividade específica. Foram obtidos bons resultados nos controles de qualidade, demonstrando que a montagem desse tipo de gerador é uma opção viável.

1.3.3 Produção do ^{188}W

As reações nucleares do bombardeamento com nêutrons térmicos mais comuns são as reações (n, γ) . Um nêutron absorvido pelo núcleo faz com que ocorra um aumento da massa nuclear em 1 unidade, sem o aumento do número de prótons.

Essa reação de absorção torna o núcleo instável, e para se transformar em um núcleo mais estável há a emissão de energia em forma de fóton ou radiação particulada. Os radionuclídeos produzidos em reatores decaem preferencialmente emitindo partículas β^- . (SAHA, 2004)

O radioisótopo ^{188}Re tem como radionuclídeo pai o ^{188}W , produto da ativação do alvo de ^{186}W irradiado em reator nuclear, após reações da dupla captura de nêutrons. Os valores que foram reportados das seções de choque para captura de nêutrons pelo ^{186}W com transformações significantes (MUSTAQA, 1996), constam no esquema a seguir:

A produção de ^{188}W com alta atividade específica necessita de irradiação dos alvos enriquecidos em ^{186}W . O enriquecimento de aproximadamente 96% contribui com uma redução Expressiva do contaminante ^{185}W no produto final. (KNAPP et al., 1994)

Os alvos são irradiados de 2 – 3 meses no reator de alto fluxo com nêutrons de pelo menos $5 \times 10^{14} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Esse longo período de irradiação resulta no maior rendimento das reações de dupla captura de nêutrons, pois são proporcionais ao quadrado do fluxo de nêutrons para a produção de ^{188}W com alta atividade específica.

De acordo com KNAPP et al. (1994), o processamento do ^{186}W enriquecido e irradiado com fluxo de nêutrons térmicos é feito pela dissolução dos alvos em solução de NaOH 1 N, na presença de peróxido de hidrogênio, para a formação dos íons tungstato de sódio ($\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$), e o ajuste de pH para 2 – 3 com solução HCl 1 N, o transforma no produto final usado no carregamento da coluna e preparo dos geradores cromatográficos com base de alumina ou do tipo-gel.

A FIG. 2 mostra o esquema de processamento dos alvos de tungstênio metálico e óxido de tungstênio enriquecido, irradiados no reator HFZR – *High Flux Isotope Reactor*, da ORNL (*Oak Ridge National Laboratory*) dos EUA, até o produto final para o carregamento da coluna. (KNAPP et al., 1997)

FIGURA 2. Produção e esquema de processamento do ^{188}W .

No caso do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, esse equilíbrio é secular, devido à longa meia-vida física do pai em relação com a meia-vida física do filho, podendo-se observar uma curva de crescimento do filho até chegar na mesma razão da atividade por tempo, ou seja, a

partir desse ponto, o pai e o filho passam a decair na mesma taxa. Dessa forma, o ^{188}W está sempre decaindo para o ^{188}Re , que é removido do gerador pela eluição com solução NaCl 0,9% e com um novo crescimento, em uma curva exponencial, atingindo novamente o equilíbrio. A FIG. 3 mostra o esquema de produção e decaimento do ^{188}W e ^{188}Re .

FIGURA 3. Produção e decaimento do ^{188}W e ^{188}Re .

Segundo o trabalho de KNAPP (1998), um gerador com base de alumina produzido para o uso clínico carregado com atividade de 18,5 GBq pode ser sequencialmente eluído mantendo bons rendimentos de eluição em até 60 dias. A FIG. 4 mostra a curva de crescimento do ^{188}Re .

FIGURA 4. Curva de crescimento do ^{188}Re até a condição de equilíbrio.

1.3.4 Propriedades físicas do ^{188}Re

O ^{188}Re decai por emissão β^- com energia média alta ($E_{\text{média}} = 764 \text{ keV}$). Possui uma meia-vida de 17 horas e decai 79% das vezes para o estado fundamental do ^{188}Os , um elemento estável, por β^- , $E_{\text{máx}(1)} = 2,11 \text{ MeV}$ e 20% para o primeiro estado excitado por β^- , $E_{\text{máx}(2)} = 1,97 \text{ MeV}$. A desexcitação do ^{188}Os fornece fótons de 155 keV com intensidade de 15%. Essa energia do raio γ é adequada à aquisição de imagens com finalidade dosimétrica e para o acompanhamento terapêutico. Cerca de 5% da energia é convertida na camada eletrônica do ósmio em uma faixa secundária de elétrons e raios-X. A constante de equilíbrio da taxa de dose média para o ^{188}Re é de $8,01 \times 10^{-12} (\text{kg.Gy})/(\text{Bq.s})$. (KAMIOKI et al., 1994)

Uma série de compostos está sendo investigada para a marcação com ^{188}Re , cujo objetivo principal é identificar os compostos que apresentem características farmacocinéticas adequadas para o uso terapêutico. As características físicas do ^{188}Re são consideradas ideais para a aplicação na medicina nuclear.

1.3.5 Sistema “Tandem” de Concentração – STC

KNAPP et al. (1997, 1998), descreveram um sistema de concentração da atividade do ^{188}Re , o qual foi denominado “*tandem*” – o Sistema Tandem de Concentração (STC). Esse sistema funciona com o acoplamento de cartuchos de troca catiônica e aniônica.

O objetivo desse sistema é aumentar a vida útil do gerador, a partir do momento que as eluições apresentarem atividades em grandes volumes, impossibilitando as marcações dos agentes terapêuticos. Com o método, o uso do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ pode ser estendido por até um ano e o efeito desse aproveitamento total da atividade seja refletido em custos razoáveis para seu estabelecimento na rotina clínica de medicina nuclear.

No relatório da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) em abril de 2006, sobre o projeto de coordenação internacional para o desenvolvimento da tecnologia de geradores de radionuclídeos terapêuticos, foi demonstrado o interesse pela comparação e otimização da tecnologia de concentração da atividade pós-eluição, tanto do ^{188}Re como

do ^{99m}Tc . Tal interesse está relacionado com o objetivo de desenvolver e avaliar outros materiais adsorventes para os geradores cromatográficos carregados com ^{188}W de baixa atividade específica, em especial, nos compostos de Zr ou Ti, que apresentam maiores volumes de eluição. (Report - CRP, 2006)

A concentração da atividade em um volume menor é feita com dois cartuchos, um de troca catiônica à base de prata (IC-Ag, produto comercial da Alltech) que retira todos os íons cloreto do eluato proveniente do gerador e o outro de troca aniônica (QMA, produto comercial da Waters), que retém todo o perrenato de sódio ($\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$).

As reações químicas de troca iônica são as responsáveis pela concentração da atividade em um pequeno volume de solvente. Na coluna de troca catiônica, a capacidade de retenção dos íons cloreto é de 2-4 mEq. A eluição do gerador é feita, mais comumente, com solução NaCl 0,9% e a passagem desse solvente pelo cartucho de troca catiônica a base de prata forma um complexo insolúvel, o AgCl. O $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ é retido pela segunda coluna (QMA). Praticamente toda a atividade de ^{188}Re pode ser recuperada ao eluir o QMA com NaCl 0,9% com volumes de 1-3 mL.

A dinâmica dos cartuchos de troca iônica do sistema *tandem* está representada na FIG. 5 e o STC completo sugerido por KNAPP (1998) está representado na FIG. 6. O sistema inclui filtros Millipore 0,22 μm para barrar partículas de alumina ou outras muito finas que podem ser eluídas do gerador, e também, garantem a esterilidade do eluato. Seguido do filtro, conectam-se os cartuchos Sep Paks, o primeiro na linha é o de alumina, cuja função é segurar a saída do radionuclídeo pai ^{188}W .

FIGURA 5. Representação funcional do STC.

FIGURA 6. Esquema do sistema de concentração *tandem* do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ completo.

Por conta dos grandes volumes de eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ MUSTAQ (2003), descreveu um sistema de eluição com acetona para concentrar o ^{188}Re pós-eluído, em que a evaporação foi o método escolhido. O desempenho da eluição com acetona apresentou rendimentos similares às eluições com NaCl 0,9% e com o padrão de pureza radionuclídica >99%. A radiomarcagem do HEDP e DMSA com ^{188}Re concentrado apresentou bons rendimentos >95%.

MUSTAQ (2004), estudou um novo meio de concentração do ^{188}Re pós-eluição, modificando o sistema de solvente NaCl 0,9% por uma mistura de ácido acético 0,7 M e cloreto de sódio 0,0225 M para a eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. Com esse sistema de solvente foi possível utilizar apenas um cartucho de troca aniônica (QMA) para a concentração da atividade, e o $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ foi retirado do QMA com 2 mL de NaCl 0,9%.

Dessa forma, a disponibilidade do STC descrito ou outras possíveis técnicas de concentração do ^{188}Re , são muito importantes, pois permitem utilizar o ^{188}W com uma atividade específica baixa em casos onde o reator de pesquisa possui baixo fluxo.

1.4 Radiofármacos Preparados com ^{188}Re

A disponibilidade de obtenção do ^{188}Re por meio do sistema de gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ com altas atividades específicas de $^{188}\text{ReO}_4^-$ e as propriedades físicas consideradas ideais para a aplicação na medicina nuclear, que permitem ainda a monitoração *in situ* da captação tumoral e o cálculo dosimétrico, faz do ^{188}Re um radionuclídeo com potencial terapêutico reconhecido por muitos autores. (VOLKERT & HOFFMAN, 1999)

As estratégias para a síntese de biomoléculas marcadas com ^{188}Re dividem-se em:

1. Marcação direta de biomoléculas;
2. Marcação indireta: ex. metalação de bioconjugados via ligação covalente a uma estrutura quelante.

Um dos problemas inerentes ao desenvolvimento de novos radiofármacos é a estabilidade das marcações de biomoléculas e bioconjugados e a capacidade de atingirem o tecido-alvo e oferecer uma dose terapêutica com grau de toxicidade sistêmica aceitável. Os radiofármacos terapêuticos devem possuir os atributos:

1. Seletividade *in vivo* entre o tecido normal e o tecido-alvo;
2. Concentração e distribuição da radiação no tecido-alvo;
3. Permanência suficiente no tecido-alvo para a máxima atividade citotóxica;
4. Rapidez na depuração dos metabólitos para minimizar os efeitos colaterais;

Uma série de compostos está sendo investigada para a marcação com ^{188}Re , cujo objetivo principal é identificar quais apresentam características farmacocinéticas adequadas para o uso terapêutico.

Alguns exemplos da radiomarcagem do ^{188}Re segundo a literatura:

ZAMORA et al. (1997) estudaram as condições para a radiomarcagem do peptídeo sintético análogo da somatostatina (^{188}Re -RC-160) em kits liofilizados.

GUHLKE et al. (1998) utilizaram a radiomarcagem do ^{188}Re -MAG₃ (mercapto-acetiltriglicina – estudos renais em medicina nuclear) como grupo prostético demonstrando a viabilidade do método para a marcação de peptídeos com diferentes rotas de conjugação química tendo como modelo o RC-160.

SEITZ et al. (1999) examinaram o potencial do antígeno - anticorpo Anti-NCA BW 250/183 (anticorpo monoclonal murínico - IgG1) na radioimunoterapia (RAIT) adjuvante no condicionamento da medula óssea antes do transplante de medula óssea em tratamentos de leucemia.

CHEN et al. (1999) avaliaram a captação *in vivo* dos análogos sintéticos do hormônio de estimulação de melanócitos (α -MSH), um hormônio primariamente responsável pela pigmentação da pele. Os análogos do α -MSH: [Nle4, D-Phe7] α -MSH (NDPMSH) e [D-Phe7] α -MSH (DPMSH), foram marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re via um agente quelante MAG₂ (tetrafluorofenil-mercapto-acetildiglicil-gama-aminobutirato) ou tetrapeptídeo Ac-Cys-Gly-Cys-Gly (CGCG).

DU et al. (2000) descreveram um método para a radiomarcagem do dextran com o ^{188}Re semelhante ao método de marcação de anticorpos pela redução de pontes S-S, por meio de resíduos de cisteína formando um conjugado modificado de policisteína-dextran para a transquelação do ^{188}Re -gluconato. O método de conjugação do dextran pode ser útil para a radiomarcagem de outras moléculas de interesse terapêutico.

WUNDERLICH et al. (2000) estudaram a biocompatibilidade, biocinética e estabilidade *in vivo* das microesferas de albumina humana sérica (HSA) B20 marcadas com ^{188}Re e observaram a excelente estabilidade dos produtos *in vivo* após a endoradioterapia tumoral ou sinovectomia.

MURPHY et al. (2001) marcaram com ^{188}Re com boa eficiência o peptídeo Lanreotide (β -naphthyl-peptídeo) que possui ação antiproliferativa em células humanas de carcinoma pulmonar com potencial terapêutico.

HÄFELI et al. (2001) estudaram a possibilidade do uso das microesferas produzidas com polímeros biodegradáveis em tratamentos de braquiterapia e terapias de

radioembolização, além da radiomarcção de partículas magnéticas com ^{188}Re para a terapia de tumores sólidos capazes de minimizar a radiação em tecidos adjacentes.

WANG et al. (2001) verificaram os efeitos histológicos do procedimento de sinovectomia com microesferas marcadas com ^{188}Re sugerindo que a dose de tratamento para a artrite reumatóide é segura e não danifica a cartilagem articular do joelho, sendo um agente terapêutico potencial de baixo custo.

LIU et al. (2003) investigaram a estabilidade *in vivo* dos análogos de DNA (morfolinos –MORF). Os MORFs são oligonucleotídeos sintetizados para complementar uma sequência alvo de tumores malignos. As marcações utilizaram o DOTA e o MAG_3 como agentes quelantes na radiomarcção com ^{111}In , ^{90}Y e ^{188}Re , para a terapia de radionuclídeos com potencial clínico.

KOTHARI et al. (2003) estudaram outro agente em potencial para a radiosinovectomia, diferente dos colóides e microesferas. A preparação do ^{188}Re -HA (Hidroxiapatita) com marcação direta atingiu alto rendimento e boa estabilidade *in vitro* e *in vivo*.

JEONG et al. (2003) desenvolveram um método simples de radiomarcção do ^{188}Re -nitrocelulose (papel) para a distribuição homogênea da dose nos tumores de pele. Os estudos em animais mostraram efeitos terapêuticos relevantes.

LIN et al. (2004) compararam os cálculos dosimétricos teóricos calculados (Monte Carlo) com as medidas obtidas com *phantoms*, utilizando o balão de braquiterapia com ^{188}Re para angioplastia coronária e assim, prover dados sobre o tempo de irradiação e a quantificação das doses para o uso de fontes líquidas.

GARIN et al. (2004) descreveram o desenvolvimento do ^{188}Re -SSS-Lipiodol: $^{188}\text{Re}-(\text{S}_2\text{CPh})(\text{S}_3\text{CPh})_2$, como alternativa ao agente terapêutico ^{131}I -Lipiodol mais usado no tratamento intra-arterial de carcinoma hepato celular (HCC). A administração do lipiodol radiomarcado com ^{131}I apresenta problemas relacionados com a proteção radiológica, devido a sua longa meia-vida e os raios- γ de alta energia, que tornam necessária a hospitalização mínima (8 dias) dos pacientes.

BOSCHI et al.(2004) obtiveram melhores resultados para a preparação do ^{188}Re -Lipiodol. Foram formulados kits liofilizados do complexo lipofílico (bis-dietilditiocarbamato-nitrito): $^{188}\text{ReN-DEDC}$. O produto marcado apresenta boa estabilidade

in vivo e nenhum efeito adverso foi verificado nos pacientes submetidos ao tratamento seqüencial com doses de 2,5 a 5 GBq.

LI et al. (2005) estudaram a marcação do anticorpo monoclonal humanizado ^{188}Re -Herceptin: (anti-p 185-HER2/neu). Muitos tumores expressam o proto-oncogene HER2/neu, o que se correlaciona a um prognóstico ruim. Os resultados demonstraram uma inibição ou redução no crescimento do tumor ao bloquear a atividade do HER2/neu.

1.4.1 Fosfonatos na Medicina Nuclear

Os bifosfonatos (*BFs*) possuem alta afinidade pela hidroxiapatita. Esta propriedade trópica dos *BFs* possibilitou o planejamento de formas latentes de liberação de radiofármacos nas estruturas ósseas. Os *BFs* assemelham-se estruturalmente com o grupo de compostos pirofosfatos (P–O–P), um regulador fisiológico presente no processo de formação e reabsorção óssea. A FIG. 7 mostra a semelhança das estruturas químicas entre pirofosfato e os *BFs* sem a substituição dos radicais laterais (R1 e R2).

FIGURA 7. Estrutura química do pirofosfato e dos *BFs*.

Os *BFs* são análogos não-hidrolisáveis do pirofosfato pois apresentam ligações estáveis P–C–P no lugar das ligações lábeis P–O–P. Atuam na calcificação agindo como cristais após adsorção na superfície óssea, e ainda, são capazes de inibir as células osteoclásticas.

Os *BFs* são usados clinicamente para o tratamento de osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas (com ou sem hipercalemia), mieloma múltiplo e outras patologias que causam fragilidade óssea. Na FIG. 8 estão relacionados os *BFs* desenvolvidos para uso humano (FULFARO et al., 1998).

Alendronato

Cimadronato

Clodronato

Etidronato

Ibandronato

Neridronato

Pamidronato

Risedronato

Tiludronato

Zoledronato

FIGURA 8. Estruturas químicas dos *BFs* investigados para uso humano.

Muitos autores sugerem que a ligação P–C–P confere habilidade ao *BF* de se ligar à matriz mineral do osso *in vivo* e a potência de anti-reabsorção é dependente das estruturas das cadeias laterais do carbono geminal, e o mecanismo de ação envolve interações esteroquímicas específicas. (CASTRO et al., 2004)

O etidronato e o clodronato são da primeira geração dos *BFs* e apresentam nas cadeias laterais um grupo alquila ou halogênio (Cl) enquanto a segunda geração (ex. tiludronato e pamidronato) é caracterizada por um grupo sulfidril na cadeia lateral como um grupo amino terminal. A terceira geração (ex. ibandronato e zoledronato) se caracteriza por possuir um grupo alifático na cadeia lateral substituído por um grupo imidazol e são 100 – 800 vezes mais potentes que a segunda geração. (FULFARO et al., 1998)

Os *BFs* têm sido os principais agentes para o mapeamento ósseo em medicina nuclear.

MATHIEU et al. (1979) indicaram pela primeira vez o HEDP (ácido-1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico) como possível agente terapêutico no tratamento de neoplasmas ósseos marcado com o radioisótopo ^{186}Re . A radiomarcagem do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP para exames de cintilografia óssea serviu de base para o ^{186}Re -HEDP. As propriedades físicas do radionuclídeo ^{186}Re com energia β^- de 1,07 MeV, reduziu a toxicidade medular e o transformou em uma alternativa clínica ao radionuclídeo ^{32}P (na forma de ortofosfato sódico) para o tratamento de metástases ósseas.

Durante a década de 80, estudos sobre a radiomarcagem de fosfonatos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram conduzidos para a aquisição de imagens ósseas (BRAND et al., 1982; PINKERTON et al., 1982; TANABE et al., 1983; ZODDA et al., 1986; DE GROOT et al., 1987). Na formação dos complexos, a influência das condições experimentais foi verificada, como o tipo de agente redutor (NaBH_4 : borohidreto de sódio e SnCl_2 : cloreto estanoso), a adição de carregador, além da biodistribuição *in vivo* em ratos.

EINSENHUT (1982) preparou o ^{186}Re -MDP (ácido-metileno-difosfônico) em temperatura ambiente e redução do ^{186}Re com SnCl_2 em pH 1,4. A variação do pH exerceu uma forte influência nos rendimentos de marcação, e ainda foi verificado um comportamento similar ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP no perfil de biodistribuição.

LIN et al. (1997) apresentou resultados de biodistribuição do ^{188}Re -HEDP: alta captação seletiva no esqueleto e nas lesões ósseas, baixa captação para o tecido não-alvo e

rápida depuração. A razão osso/músculo inicialmente foi (18,96) e após 24 horas (79,28). Já a concentração no tecido ósseo da espinha torácica após 4 horas da injeção a %DI (Dose injetada) /g foi de $2,02 \pm 0,25\%$ e com 24 horas $1,43 \pm 0,31\%$.

HISIEH et al. (1999) compararam os fosfonatos (MDP, HEDP e HDP: hidroximetano-difosfonato) para determinar a melhor escolha para a radiomarcagem com ^{188}Re frente às diferenças de biodistribuição. As diferenças no comportamento *in vivo* dos fosfonatos marcados com ^{188}Re (tendo como base os complexos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$), mostraram melhor desempenho do ^{188}Re -HEDP. Apesar do MDP e HDP terem bons resultados quando marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{188}Re -MDP e o ^{188}Re -HDP não se acumulam no tecido ósseo, mas tendem a se acumular nos tecidos moles e no fígado.

HASHIMOTO (1999) estudou a marcação com ^{188}Re do EDTMP e seus derivados EDBMP: (ácido-etileno-diamino-N,N'-bis-metileno-fosfônico), NTMP: (ácido-nitrilo-tris-metileno-fosfônico). Os resultados mostraram melhora na estabilidade dos produtos radiomarcados ao adicionar carregador ($0,02 \text{ mgRe/mL}$) na formulação.

QINGNUAN et al. (2000) utilizaram o análogo AEDP (ácido-1-amino-etileno-difosfônico) para a síntese do ^{188}Re -AEDP livre e com adição de carregador ($0,1 \text{ mgRe/mL}$). O ^{188}Re -AEDP foi marcado pelo método direto, com SnCl_2 e ajuste de pH entre 0,5-1,4 com rendimentos de radiomarcagem livre de carregador (92%) e com adição de carregador (96%). A biodistribuição indicou maior captação pelo esqueleto (16,4%) do produto com carregador e após 24 horas a %DI/g para o osso: ($2,27 \pm 0,20\%$).

BANERJEE et al (2001) citaram derivados de ácidos tetrafosfônico, estruturalmente diferentes do HEDP e MDP, como o EDTMP (etileno-diamino-tetrametileno-fosfonato), o DTPMP (dietileno-triamino-pentametileno-fosfonato) e o HMDTMP (hexametileno-diamino-tetrametileno-fosfonato), e para a comparação dos estudos de biodistribuição desses diferentes ligantes, o kit de MDP (agente mais comum para o mapeamento ósseo por imagem), atuou como uma referência dos padrões de captação tecidual para os compostos radiomarcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, assim como o complexo de ^{186}Re -HEDP para os tetrafosfonatos radiomarcados com ^{186}Re .

MURPHY et al. (2001^a) para desenvolver um novo BF, marcaram o alendronato (ABP: 4-amino-1-hidroxi-1,1-butilideno-bifosfonato), com ^{188}Re reduzido pelo SnF_2 com maior potencial de redução. O rendimento da marcação pelo método direto de 95%, e a biodistribuição do ^{188}Re -ABP revelou um possível agente terapêutico de

metástases ósseas com captação óssea de 37%.

LISIC et al. (2001) sintetizaram e caracterizaram o SEDP (ácido-2-sulfonato-1,1-etilideno-bifosfônico) para a radiomarcagem com o ^{188}Re , purificando os complexos antes dos estudos de biodistribuição. Os resultados da captação pelos órgãos e tecido ósseo foram comparáveis ao ^{188}Re -HEDP, após 24 horas da injeção a (%DI/g) para o osso: ($2,47 \pm 0,23\%$) do ^{188}Re -SEDP e ($1,94 \pm 0,16\%$) do ^{188}Re -HEDP.

PERVEZ et al. (2003) prepararam o radiofármaco ^{188}Re -EDTMP baseando-se nos complexos formados com ^{153}Sm e ^{166}Ho que são agentes terapêuticos no tratamento de metástases ósseas. Com a otimização das condições de marcação, o rendimento alcançado foi de aproximadamente 98% (livre ou com a adição de carregador), os resultados da biodistribuição mostraram rápida depuração e baixa captação nos tecidos não-alvos. A %DI/g do ^{188}Re -EDTMP no fêmur após 3 horas da injeção foi ($1,12 \pm 0,04\%$ sem carregador) e ($2,13 \pm 0,14\%$ com carregador).

FAINTUCH et al. (2003) compararam os resultados da radiomarcagem do ^{188}Re com três complexos: MDP, HEDP e EDTMP. Em todos os resultados a complexação foi >95% com a otimização das condições de radiomarcagem e a biodistribuição após 4 horas da injeção em animais, apresentaram o mesmo valor na razão fêmur/músculo entre o ^{188}Re -MDP e ^{188}Re -HEDP de (4,9), o ^{188}Re -EDTMP com (28,5), cuja captação do fêmur (%DI/g) foi: ($1,2 \pm 0,1\%$), ($1,0 \pm 0,1\%$) e ($3,1 \pm 0,1\%$), respectivamente.

BANERJEE et al. (2004) realizaram estudos biológicos da radiomarcagem de ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{175}Yb e ^{186}Re com ligantes poliaminofosfonato cíclicos, conhecidos por formar complexos com maior estabilidade termodinâmica, como o DOTMP (ácido-1,4,7,10-tetra-aza-ciclododecano-1,4,7,10-tetrametileno-fosfônico) e CTMP (ácido-1,4,8,11-tetra-aza-ciclotetradecano-1,4,8,11-tetrametileno-fosfônico). Os produtos marcados foram $^{186/188}\text{Re}$ -CTMP, ^{177}Lu -DOTMP, ^{175}Yb -EDTMP, ^{153}Sm -DOTMP, ^{153}Sm -EDTMP e todos os complexos exibiram uma excelente estabilidade e alta pureza radioquímica. Os estudos de biodistribuição revelaram maior captação óssea (% DI/g) para o ^{177}Lu -DOTMP (5,23) e menor do ^{186}Re -CTMP (1,82). A marcação do ^{186}Re -CTMP, em meio aquoso com aquecimento, recebeu 2 mg de SnCl_2 para atingir ~98% de complexação.

MITTERHAUSER et al. (2004) na tentativa de aprimorar a biodistribuição do EDTMP radiomarcado, promoveram a radiomarcagem de um kit disponibilizado

comercialmente de EDTMP (Multibone) e otimizou as condições de marcação com diferentes radionuclídeos: ^{188}Re , ^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

EL-MABHOUH (2004) estudou a radiomarkação com o ^{188}Re dos complexos conjugados de (ácido-dietileno-triamino-penta-acético / bisfosfonato: DTPA/BF e 5-fluor-uracil / bisfosfonato: 5-FU/BF). O ^{188}Re -HEDP serviu de padrão na comparação dos resultados sobre a seletividade pelo tecido ósseo.

1.4.2 Tecido Ósseo: um sítio metastático

O osso é composto por uma matriz orgânica dura fortalecida pela deposição de sais de cálcio. Cerca de 30% do seu peso é dado pela matriz e os 70% restantes são de sais. A matriz orgânica do osso é responsável pela força de tensão do tecido ósseo por ser constituída de 90-95% de fibras colágenas, preenchidas pela substância fundamental (composta de proteoglicanos – condroitinos sulfato e ácido hialurônico).

Os sais ósseos depositados na matriz orgânica são compostos principalmente por cálcio, fosfato e outros íons como o magnésio, sódio, potássio e carbonato. O principal sal cristalino é a hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

O mecanismo da calcificação óssea é iniciado pelos osteoblastos que secretam monômeros de colágeno e substância fundamental, mas o processo consome um longo período de semanas a meses até completarem a formação dos cristais de hidroxiapatita.

A função de absorção óssea é dada pelos osteoclastos, que são grandes células fagocitárias multinucleadas. A FIG. 9 apresenta uma imagem histológica do osso normal, com os osteoclastos (grupo de células multinucleadas) e o aspecto ondulado resultado da ação fagocitária na superfície óssea adjacente. (SITE 5)

FIGURA 9. Imagem histológica do osso normal e um grupo de osteoclastos ativos (Lâmina corada com Tricrômico de Goldner e aumento de 500x).

O osteoclasto secreta duas substâncias: as enzimas proteolíticas, que dissolvem a matriz orgânica do osso e vários ácidos (ex. ácido cítrico e ácido láctico), que solubilizam os sais ósseos. A dinâmica do tecido ósseo é balanceada pela atividade osteoclástica e atividade osteoblástica, reguladas por fatores sistêmicos e locais.

O osso é um sítio freqüente de câncer metastático. Diferentes tipos de câncer como de mama, pulmão, tireóide, próstata, renal e mieloma mostram uma preferência pelo tecido ósseo. A TAB. 5 mostra a porcentagem de casos que envolvem o esqueleto mediante o avanço do câncer. (COLEMAN, 2006)

TABELA 5. Incidência de metástases ósseas.

TIPO DE CÂNCER	Incidência de metástases ósseas (%)
Mieloma	95-100
Mama	65-75
Próstata	65-75
Tireóide	60
Bexiga	40
Pulmão	30-40
Renal	20-25
Melanoma	14-45

As metástases ósseas podem resultar na destruição ou em nova formação do osso, pois podem ser osteolíticas ou osteoblásticas, ou ainda serem mistas. Em pacientes com câncer de próstata as metástases osteoblásticas são predominantes.

No câncer de mama, o principal mecanismo para a destruição óssea é a estimulação dada pelo tumor com a secreção de mediadores químicos aumentando o número de osteoclastos no local. O osteoclasto por sua vez, libera na matriz extracelular fatores de crescimento e acaba estabelecendo um círculo vicioso que garante o crescimento do tumor.

A estimulação pelo tumor com mediadores químicos ou a estimulação sistêmica para aumentar a formação dos osteoclastos no tecido ósseo metastático também pode ser feita através de hormônios, um exemplo é a proteína relacionada ao hormônio paratireóideo (PTHrP).

Outros fatores produzidos pelos tumores estimulam a reabsorção osteoclástica e incluem a interleucina (IL)-6 e (IL)-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a proteína inflamatória macrofágica (MIP-1 α). O mecanismo geral da progressão de células tumorais metastáticas para o osso pode ser visto na FIG.10. (SAAD, 2006)

FIGURA 10. Mecanismo geral de células tumorais metastáticas no osso.

Assim, o aumento da atividade do osteoclasto e a ativação dos osteoclastos pré-formados promovem uma destruição osteolítica. Os resultados do aumento dos mediadores químicos também promovem uma reação inflamatória que circunda o tumor, além de todos os processos secundários dentre eles: dores severas, fraturas, hipercalcemia e síndromes de compressão nervosa. (FULFARO et al.,1998; COOK & FOGELMAN, 2001; COLEMAN, 2006)

1.4.2.1 Dor Óssea

A dor associada à presença do câncer metastático no osso é um sintoma comum e pode ser de difícil controle somente com medicação analgésica. Diferentes agentes de uso sistêmico como os quimioterápicos, BFs, terapia hormonal e radioterapia convencional com feixes externos são medidas de controle da dor óssea.

Pelo menos dois terços dos pacientes com diferentes tipos de câncer (TAB. 5) apresentam metástases ósseas. Dentre os pacientes, a prevalência das metástases ósseas

está: 70% nas vértebras e costelas, 40% na pélvis, 25% no fêmur e 15% no crânio. (SILBERSTEIN, 2005)

Em virtude da alta incidência e o longo curso clínico dos carcinomas de mama e próstata, cerca de 80% dos casos com metástases ósseas, em particular, levam à redução da funcionalidade e autonomia dos pacientes. (COLEMAN, 2001)

No início dos anos quarenta, o ^{89}Sr foi utilizado com fins terapêuticos, mas a maior triagem clínica de um radionuclídeo terapêutico para metástases ósseas foi realizada anos mais tarde com o ^{32}P . Em razão dos radionuclídeos ^{89}Sr ($E_{(\text{máx})} \beta^-$ 1,49 MeV / $T_{1/2}$ 50,5 dias) e ^{32}P ($E_{(\text{máx})} \beta^-$ 1,71 MeV / $T_{1/2}$ 14,3 dias) serem emissores de partículas beta de alta energia com meia-vida longa, há o maior alcance e permanência nos tecidos, o que limita a dose de aplicação por apresentarem uma toxicidade hematológica decorrente da supressão medular. (ATKINS, 1998; McEWAN, 2000). Por isso, outros radionuclídeos com emissão de partículas beta e meia-vida mais favoráveis estão sendo pesquisados.

O objetivo dos radionuclídeos terapêuticos é aliviar a dor secundária às metástases ósseas para melhorar o estado funcional do paciente e essa aplicação tem sido efetiva mediante a experiência clínica. (SILBERSTEIN, 2005)

No tratamento paliativo com radionuclídeos deve existir um balanço entre a possibilidade máxima de cura e uma incidência tolerável de eventos adversos, tendo em vista, a obtenção do alívio dos sintomas com a dose mais baixa absorvida em um maior número de pacientes. (ATKINS, 1998)

Todos os radionuclídeos atualmente usados para o tratamento da dor são produzidos em reator. A TAB. 6, contém exemplos de radiofármacos terapêuticos para metástases ósseas. (SILBERSTEIN, 2000; 2005)

TABELA 6. Radiofármacos para terapia de metástases ósseas.

Radiofármaco	¹⁸⁸ Re- HEDP	¹⁵³ Sm- EDTMP	¹⁸⁶ Re- HEDP	^{117m} Sn- DTPA	⁹⁰ Y- citrato	³² P- fosfato	⁸⁹ Sr- cloreto
T_½ (dias)	0,7	1,9	3,8	13,6	2,7	14,3	50,5
E_(máx) β⁻ (MeV)	2,12	0,81	1,07	0,127 / 0,152*	2,27	1,71	1,46
Alcance máximo no tecido (mm)	11,0	2,5	4,5	0,27	11,1	7,9	7,0
E_{média} β⁻ (MeV)	0,73-0,79	0,23	0,33	-	0,94	0,70	0,58
Alcance médio no tecido (mm)	2,7 – 3,1	0,6	1,1	0,2 – 0,3	2,5	3,0	2,4
Raios-γ (MeV)	0,155	0,103 (28%) -	0,137	0,159	-	-	0,909
% abundância	(10%)	0,070 (5%)	(9%)	(86%)	-	-	(0,10%)

*elétrons de conversão

Os radiotraçadores para irradiar o esqueleto com metástases difusas como o ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, são radionuclídeos beta-emissores com meia-vida curta e podem liberar uma emissão de radiação com alta taxa de dose. A baixa transferência de energia linear (LET) da radiação liberada tem demonstrado ser eficiente e biologicamente equivalente às radiações com baixa taxa de dose. (PERVEZ et al., 2003)

1.5 Radiomarcção do ^{188}Re -HEDP

1.5.1 Analogia no Preparo de Agentes Terapêuticos

Seguindo o exemplo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, em que o desenvolvimento do sistema de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ propiciou a expansão do uso clínico de diferentes agentes utilizados em medicina nuclear para diagnósticos, o ^{188}Re proveniente do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, tem sido reconhecido como um radionuclídeo terapêutico em potencial. (DEUTSCH et al., 1986; PERVEZ, 2003; EL-MABHOUH & MERCER, 2004; FINLAY et al., 2005)

A analogia química entre os elementos Tc e Re, por pertencerem ao mesmo grupo da tabela periódica dos elementos (VIIb), permite o embasamento nos produtos estudados com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para constituir novos radiofármacos terapêuticos com ^{188}Re , antecipando os possíveis resultados de biodistribuição e efeitos nos tecidos-alvos.

1.5.2 Propriedades Químicas do ^{188}Re

Embora a transição do elemento Re pertença ao mesmo grupo da tabela periódica do Tc, esses dois elementos dificilmente exibem um comportamento químico similar. Na radiomarcção com ^{188}Re ocorrem certas limitações nas condições de preparo, o que dificulta a obtenção de bons rendimentos e uma biodistribuição *in vivo* satisfatória aos mesmos produtos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

O principal problema em transferir um procedimento químico do Tc para o Re aparece na diferença entre os potenciais de redução (E°) dos metais. (BOSCHI et al., 2003; ESCOBAR, 2001)

Em particular, o potencial redox (U) do Re é mais baixo do que para o Tc :

A diferença de aproximadamente 220 mV no potencial redox, faz dos complexos de Re mais estáveis termodinamicamente quando estão com um maior estado de oxidação comparados aos análogos de Tc.

A estabilidade termodinâmica dificulta a redução do centro do metal $[^{188}\text{Re}][\text{ReO}_4]^-$, e limita a obtenção de radiofármacos com ^{188}Re quando são utilizados os procedimentos de radiomarcção padrão para o Tc. (BOSCHI et al., 2003; ESCOBAR, 2001; SEIFERT et al., 2006)

O radionuclídeo ^{188}Re é obtido do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ sob a forma química do ânion tetraoxo $[^{188}\text{Re}][\text{ReO}_4]^-$, que constitui a espécie mais estável em soluções aquosas para este metal (BOSCHI et al., 2003). Os ligantes orgânicos somente formam complexos após a redução do Re aos menores estados de oxidação. Assim, um agente redutor forma as espécies catiônicas mais comuns de Re (Re^{4+} e Re^{5+}) que serão queladas aos ligantes.

A redução do perrenato em solução pode gerar dois contaminantes potenciais que precisam ser controlados, isso se dá com um procedimento de radiomarcção eficiente e apropriado. Configuram como contaminantes (ou impurezas), o próprio ReO_4^- da sua redução incompleta ou reoxidação, e o Re coloidal sob a forma de ReO_2 . (ESCOBAR, 2001)

Da mesma maneira que os compostos de Tc, a formação dos compostos com Re sob condições térmicas e hidrolíticas também devem resultar em alta estabilidade termodinâmica, para serem empregados na medicina nuclear. (SERGIENKO, 2001)

1.5.3 HEDP (Etidronato)

O ácido fosfônico HEDP forma complexos estáveis com o Re e foi o primeiro *BF* estudado para a terapia paliativa da dor de metástases ósseas.

Os ácidos 1,1 difosfônico $\text{H}_2\text{O}_3\text{P-CR1(R2)-PO}_3\text{H}_2$ diferem na natureza dos substituintes R1 e R2, e o mais estudado é o ácido 1-hidroxi-etilideno-difosfônico (HEDP; R1= OH, R2= CH_3).

A estrutura química dos compostos de HEDP apresenta a adição de 2 grupos fosfônicos com átomos de oxigênio (com propriedades ácidas) no átomo de carbono central, também ligado a um grupo alfa-hidroxi que exibe propriedades básicas.

Essa estrutura leva a diferentes formas de complexação pelo HEDP. A alta capacidade de complexação com grupos de metais *p*, *d* e *f* faz do HEDP um agente complexante peculiar em comparação a outros agentes.

Os estudos da caracterização estrutural dos complexos de HEDP com diferentes metais, dentre eles o Sn, revelaram a dependência nas condições de síntese quanto a capacidade de desprotonação do HEDP, como o pH da solução, a razão metal/HEDP e se há ligantes competidores. SERGIENKO (2001)

1.5.4 Agente Redutor

Cloreto estanoso é o principal componente usado em kits para a redução do ^{99m}Tc , nas preparações de radiofármacos. Os kits (frio) usualmente contêm um ligante, cloreto estanoso e diferentes aditivos como agentes complexantes, antioxidantes e tampões. A quantidade total de estanho tem um valor limitado aos efeitos toxicológicos que devem ser considerados. (DECRISTOFORO et al., 1998)

Similar ao $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a redução do $^{188}\text{ReO}_4^-$ em geral é feita pela adição de SnCl_2 em solução ácida. Em comparação ao redox do Tc, a radiomarcagem com Re necessita de maiores concentrações de SnCl_2 , em consequência da rápida reversão do redox das espécies Re^{5+} , Re^{4+} para Re^{7+} . (DADACHOVA et al., 1996; VOLKERT & HOFFMAN, 1999)

Estudos sobre a formulação de complexos com o Tc em kits com diferentes agentes complexantes, mas com a mesma quantidade de Sn(II) nas formulações, mostram que os desempenhos das marcações não são similares. Dessa forma, cada kit com Sn(II), deve ser avaliado de modo único, relacionando fatores como a quantidade total de Sn, a razão do ligante-Sn, o tipo de ligante e as condições de marcação. (SRIVASTAVA et al., 1977)

HILES, (1973) estudou as vias de distribuição e excreção do estanho inorgânico, administrando doses via oral de 20 mg de Sn(II) ou Sn(IV)/kg, (50% do Sn absorvido foi excretado dentro de 48 horas) e com doses via intravenosa de 2 mg de Sn(II) ou Sn(IV)/kg (a taxa de eliminação foi de 30% pela urina correspondendo a um tempo de 10 horas e 11% pela bile dentro de 10 – 24 horas). Somente o tecido ósseo apresentou uma captação proporcional a dose, considerando a meia-vida biológica do Sn em ossos

calculada em 20-40 dias.

GUEDES et al.(2006) demonstraram os efeitos toxicológicos do Sn, na tentativa de esclarecer as controvérsias sobre a citotoxicidade, genotoxicidade e efeitos mutagênicos do SnCl₂. Os modelos utilizados nos estudos foram dois tipos de culturas de bactérias *E. coli*, nas quais a indução de plasmídeos (que mostra a eficiência bacteriana de transformação através dos fragmentos de DNA em culturas ativas) pode ser inibida pela presença de componentes que estão presentes nos kits de radiofármacos. Assim, a eficiência bacteriana de transformação em uma cultura sem efeito dos kits foi o controle. Os resultados mostraram que nem todos os componentes dos kits causam danos no DNA, mesmo com a adição de SnCl₂.

1.5.5 Estudos Clínicos com ¹⁸⁸Re-HEDP

Os primeiros estudos clínicos com ¹⁸⁸Re-HEDP foram conduzidos em Bonn na Alemanha. (KNAPP et al., 1997; LAMBERT & KLERK, 2006)

O ¹⁸⁸Re ganhou o interesse da classe médica para o controle paliativo da dor de metástases ósseas e até 2005 os dados sobre o uso terapêutico estavam restritos a 4 estudos clínicos. (FINLAY et al., 2005)

Depois da administração o ¹⁸⁸Re-HEDP apresenta uma meia-vida biológica em média de 11 horas para a medula óssea e 12 horas para o corpo inteiro. Os elétrons emitidos pelo ¹⁸⁸Re tem um alcance de 3-5 mm no tecido ósseo atingindo o tumor assim como toda sua margem trabecular e periósteo.

Cerca de 40% da atividade é eliminada pela urina dentro de 8 horas. O alívio da dor pode durar 3 meses ou mais e o processo inicia-se após 1 a 8 semanas do tratamento. A atividade máxima tolerada no tratamento é de 3,3 GBq em preparações com a adição de carregador. (FINLAY et al., 2005; LAMBERT & KLERK, 2006)

LI et al. (2001) estudaram o uso clínico da preparação do ¹⁸⁸Re-HEDP que foi feita de acordo com a metodologia de LIN et al.(1997 / TAB. 32). Os diferentes tipos tumorais representados no estudo, em geral, apresentaram uma resposta de 50-100% ao tratamento. Os estudos das atividades injetadas variaram de 2,3 GBq a 6,9 GBq. A toxicidade foi verificada com a contagem das plaquetas e de leucócitos.

LIEPE et al. (2003) investigaram o alívio da dor com ^{188}Re -HEDP (2,7 GBq a 3,5 GBq) e se o efeito reduziu a quantidade de analgésicos administrados. Os resultados apresentados após 12 semanas foram de 74 ± 7 a $85 \pm 9\%$ ($n=27$), dos pacientes com câncer de próstata com metástases nos ossos atingiram os benefícios do uso paliativo mostrando baixa toxicidade medular.

PALMEDO et al. (2003) desenvolveram estudos de fase II para avaliar os efeitos da repetição do tratamento com ^{188}Re -HEDP em pacientes com câncer de próstata. O método de preparo dos complexos foi definido em um estudo anterior relacionado na TAB. 32. Os grupos apresentaram toxicidade baixa, com moderada trombocitopenia e leucopenia. A efetividade dos complexos foi diferenciada entre os grupos estudados ($n=64$) e foi melhor no grupo que recebeu uma segunda dose com uma taxa de resposta de 92% e uma média de 5,7 meses de ação.

1.6 IPEN: Justificativa

O Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN é responsável pela produção e distribuição de radiofármacos para uso em Medicina Nuclear. Na busca constante de oferecer novos produtos à classe médica brasileira, o interesse na produção de geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ tem papel de destaque dentro da política de pesquisa e desenvolvimento do CR.

Além disso, a *IAEA* criou um projeto de pesquisa coordenada (CRP) para o desenvolvimento de geradores radioterápicos e o IPEN representa o Brasil neste projeto contribuindo com os estudos da marcação do HEDP com o ^{188}Re

Por ser amplamente estudado pela comunidade científica, o HEDP pode se tornar um parâmetro da qualidade dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. A radiomarcagem serve como um método importante na validação da produção dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, preparados no IPEN no futuro atendimento à classe médica.

2. Objetivo da Tese

O objetivo deste trabalho é o estudo aprofundado da marcação do HEDP, envolvendo três aspectos principais:

- A origem do ^{188}Re ;
- A forma da marcação ;
- Controle de pureza radioquímica do ^{188}Re -HEDP.

Diferentes geradores cromatográficos de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ foram utilizados:

- A base de Al_2O_3 de uso comercial produzido pelo Oak Ridge National Laboratory (ORNL) nos EUA e pela POLATON na Polônia;
- A base de Al_2O_3 preparado no IPEN com $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ importado;
- Um tipo-gel de ^{188}WZr , também preparado no IPEN.

As proposições inéditas deste plano são:

- Marcação do HEDP com ^{188}Re proveniente de gerador tipo-gel nacional;
- Comparação dos diferentes métodos de controle de qualidade de pureza radioquímica dos estudos cromatográficos: CP (Cromatografia de Papel), CCD (Cromatografia de Camada Delgada), CI (Cromatografia Iônica) e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Infra-Estrutura e Equipamentos

Os processamentos químicos de marcação e controle de qualidade foram realizados nos laboratórios do Centro de Radiofarmácia (CR) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN–CNEN/SP.

Os equipamentos utilizados estão listados a seguir:

- Espectroscopia gama com detector de Ge hiperpuro, modelo GX1518 da Canberra, acoplado ao programa Geniepc para tratamento dos dados;
- Calibrador de doses, modelo CRM-35R – Capintec;
- Liofilizador, modelo Super Modulyo 12K – Edwards;
- Balança analítica modelo M-220 – Denver Instrument Company;
- Estufa com microprocessador de controle da temperatura, modelo Orion 515 – Fanen;
- Chapa de aquecimento com agitador;
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); sistema Waters: bomba 600, integrador 746 e detector UV-vis 486.

3.2 Lista de Materiais e Reagentes

- Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$; (ORNL, POLATON ou Nacional)
- Suporte universal e vidrarias;
- Filtros 0,22 μm - Millipore;
- Agulhas e seringas – BD (Becton Dickinson)
- Papel indicador de pH: (0 - 2,5; 2,5 - 4,5 e 0 - 14) – EMD / Merck;
- Colunas de vidro para montagem dos geradores (2 x 7 cm) – IPEN;

- Agulhas para eluição (superior e inferior) – IPEN;
- Frascos para eluição com solução NaCl 0,9% – IPEN;
- Frascos em vácuo para eluição – IPEN;
- Cartucho de troca catiônica (ICAg) – Alltech Associates;
- Cartucho de troca aniônica (QMA light Sep Pak) – Waters Corporation;
- Suportes cromatográficos:
 1. Cromatografia de camada delgada (CCD): ITLC-SG – Gelman;
 2. Cromatografia em Papel (CP): Whatman 1 M – Whatman;
- Coluna PD-10 de Sephadex G-25 médio – Amersham Pharmacia Biotech;
- Coluna para CLAE Fase Reversa C-18 – Dionex;
- HEDP (ácido-1-hidroxietilideno-1-1-difosfônico), >97% pureza – Fluka AG;
- Ácido Ascórbico P.A. (>99,7% pureza) – Merck;
- Ácido Gentísico (ácido-2,5-dihidroxibenzóico) P.A. (>99% pureza) – Aldrich Chemical Company;
- Cloreto Estanoso: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (P.A. 98 -103%) – Quimex;
- TBA: Brometo de Tetra-N-Butil-Amônio, (P.A., 99%) – Merck;
- Óxido de Rênio (VII), 99,9% pureza – Alfa Aesar;
- Água bidestilada – Purificador Milli-RX45, Millipore;
- Nitrogênio gasoso, P.A. – White Martins;
- Acetato de Sódio Trihidratado P.A. (99,5 – 100,5%) – Merck;
- Acetato de Etila P.A. (99,5%) – Merck;
- Acetona P.A (99,5%) – Vetec Química Fina;
- Solução de NaCl 0,9% - Sanobiol.

3.3 Preparo das Soluções

3.3.1 Preparo da Solução do Ligante

A metodologia de preparo do ^{188}Re -HEDP foi estabelecida através dos métodos bem definidos de marcação do ^{186}Re -HEDP discutidos no trabalho de KNAPP et al., 1997, onde a formulação básica para 1 mL de solução do ligante com pH final de ~ 1 , foi estabelecida em 16,6 mg de HEDP, 6 mg de ácido gentísico e 7,7 mg de SnCl_2 . O método apresenta uma ordem de adição dos reagentes na qual o ligante HEDP e o ácido gentísico foram dissolvidos em NaCl 0,9% e o volume final transferido diretamente para o frasco do agente redutor.

O procedimento para a marcação do ^{188}Re -HEDP descrito por KNAPP et al., (1997) simplificou o procedimento inicial de preparo que envolvia o uso de uma solução ácida de HCl (0,1 mol/L) nitrogenada durante 20 minutos para a dissolução do SnCl_2 para ser adicionada ao meio de reação como agente redutor.

O método para o preparo das formulações (dos kits líquidos e liofilizados), sem a dissolução do SnCl_2 em meio ácido nitrogenado, foi o principal procedimento adotado para a radiomarkação do HEDP com ^{188}Re apresentados nesse trabalho.

Apenas as quantidades de reagentes foram modificadas, estabelecendo-se novas concentrações: HEDP $14,6 \times 10^{-2}$ mol/L (~ 30 mg) e ácido ascórbico $1,7 \times 10^{-2}$ mol/L ou ácido gentísico $1,95 \times 10^{-2}$ (ambos ~ 3 mg) em água destilada. A solução com pH final 1,5 foi transferida para o frasco com $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $3,1 \times 10^{-2}$ mol/L (~ 7 mg).

Os *kits* líquidos foram preparados com 1 mL da solução do ligante em frascos lacrados para a adição do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$.

Os *kits* liofilizados foram preparados com 1 mL da solução do ligante, sendo colocados em frascos lacrados e submetidos ao processo de liofilização.

Todas as formulações desse estudo contêm a presença de agentes estabilizantes, o ácido ascórbico ou ácido gentísico, que são muito importantes nas reações de radiomarkação, pois impedem a formação de peróxidos e evitam a radiólise dos complexos marcados.

3.3.2 Preparo da Solução do Carregador

A solução de carregador foi preparada com óxido de rênio VII (Re_2O_7) muito solúvel em água. A quantidade de 20 mg de Re_2O_7 foi dissolvida em 200 mL de NaCl 0,9%. Os estudos com adição de carregador para a formação de complexos com ^{188}Re continham $4,13 \times 10^{-8}$ mol/L de Re.

3.3.3 Preparo da Solução Tampão

A solução tampão utilizada para o ajuste do pH de 1,5 para 5 no final da reação foi o acetato de sódio trihidratado 0,3 M (39 mg de $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ /mL de H_2O bidestilada). A solução tampão foi submetida à purga de N_2 durante 20 minutos antes de adicioná-la aos frascos de reação.

3.4 Preparação dos Kits Liofilizados

3.4.1 Liofilização

A função do processo de liofilização é reduzir o índice de água no produto favorecendo a conservação dos substratos pela inibição dos microorganismos, das enzimas ou radicais livres. Nesse processo, a água da formulação passa por uma mudança no estado físico através da sublimação, ou seja, passa diretamente do estado sólido ao gasoso.

Em função do equipamento o processo de liofilização pode chegar até 27 horas e as etapas são:

1. *Congelamento ultra-rápido*: a água é transformada em gelo com um alto teor de pureza;
2. *Secagem primária*: após a estabilização da temperatura dentro do equipamento é realizada a aplicação do vácuo elevado na liofilização e faz com que o gelo sublime rapidamente.
3. *Secagem secundária*: método de secagem com calor sob vácuo para retirar a umidade residual, os índices da umidade chegam a menos de 1%. Os frascos são lacrados em atmosfera inerte de N_2 .

As soluções líquidas desidratadas por este processo podem ser hidratadas (ou reconstituídas) muito mais rapidamente e facilmente porque deixam poros microscópicos no pó resultante. Os poros são criados pelos cristais de gelo que sublimaram, deixando aberturas ou poros em seu lugar.

3.5 Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$

Diferentes geradores cromatográficos de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ foram utilizados:

- A base de Al_2O_3 , de uso comercial produzido pelo *Oak Ridge National Laboratory* (ORNL) nos EUA;
- A base de Al_2O_3 , de uso comercial produzido pela *Polaton* na Polônia;
- A base de Al_2O_3 preparado no IPEN com $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ importado;
- Um tipo-gel de ^{188}WZr , também preparado no IPEN.

O ^{188}Re liberado pelos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ deve apresentar uma pureza radioquímica $> 98\%$.

As eluições dos geradores foram realizadas com solução de NaCl 0,9% e o eluato foi utilizado diretamente para a marcação de radiofármacos ou foi concentrado com o sistema *tandem* de concentração descrito no item 3.5.4.

3.5.1 Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Importado – ORNL

O gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ da ORNL, preparado com base de Al_2O_3 e 18,5 GBq (500 mCi), foi enviado para o Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP, financiado pela AIEA – Agência Internacional de Energia Atômica, pela participação no projeto de pesquisas coordenadas: CRP- *Coordinated Research Project*, que têm o objetivo do “*Desenvolvimento da tecnologia de geradores para radionuclídeos terapêuticos*”, sendo os principais itens de estudo os radionuclídeos ^{188}Re e ^{90}Y .

3.5.1.1 Eluição do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ - ORNL

O método de eluição foi manual utilizando seringas de 10 mL com solução de NaCl 0,9%, embora o sistema do gerador importado de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ tenha sido desenvolvido para acoplar uma bomba de fluxo (1 mL/min) para facilitar as eluições e diminuir o tempo de exposição do operador.

O gerador importado foi eluído nos dois primeiros meses com volume de eluição de 10 mL. Após esse período, o gerador passou a ser eluído com 20 mL. A FIG. 11 mostra o gerador importado de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ da ORNL e o esquema para a eluição: entrada da solução salina, Sep-Pak de alumina ácida, filtro Millipore 0,22 μm e o frasco para a coleta.

FIGURA 11. Esquema para eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ sem STC.

3.5.2 Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Importado – POLATON

O gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ produzido pela Polaton, foi adquirido pelo IPEN e enviado para o Brasil em julho de 2006. Em junho a calibração do gerador foi de 16 GBq (432,4 mCi).

A coluna foi produzida com Al_2O_3 para adsorção do ^{188}W . As agulhas de saída possuem um filtro bacteriológico e ainda, possuem frascos de proteção com solução 0,2% de brometo de lauril-dimetil-benzilamônio.

FIGURA 12. Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ importado da Polônia.

3.5.2.1 Eluição do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ - POLATON

O gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ da POLATON foi eluído com NaCl 0,9%, em frascos com 10 mL específicos para o gerador por ser dotado de um sistema para controlar o volume de eluição em: 4, 6 e 8 mL. Os eluatos foram coletados com frascos em vácuo.

3.5.3 Preparo dos Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Nacionais

3.5.3.1 Preparo do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re} - \text{Al}_2\text{O}_3$

Para a preparação do gerador com base de Al_2O_3 , foram utilizadas duas colunas de vidro (2 x 7 cm) com capacidade de 3 g de alumina calcinada e acidificadas (pH 1,5 – pois melhora a adsorção dos íons tungstato na coluna). As colunas foram produzidas pelo CR-IPEN, as mesmas utilizadas na produção do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

A primeira coluna de alumina foi carregada com 0,1 mL de $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ (240,5 MBq: ~6,5 mCi) mais 0,9 mL de NaCl 0,9%. A outra coluna foi carregada com 0,45 mL de $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ (625,3 MBq: ~16,9 mCi), com mais 0,9 mL de NaCl 0,9%. A FIG. 13 mostra o $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ na ampola de polipropileno e as embalagens de alumínio e chumbo produzidos pela Rússia no FSUE “State Scientific Centre of Russia Research Institute of Atomic Reactors”.

FIGURA 13. Ampola de polipropileno com o $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ e as blindagens de alumínio e chumbo.

O esquema com o tipo de coluna de vidro com Al_2O_3 para a montagem do gerador nacional de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, os frascos com NaCl 0,9% e em vácuo para a coleta do eluato estão demonstrados na FIG. 14.

FIGURA 14. Coluna de vidro do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ e esquema de eluição.

3.5.3.2 Preparo do Gerador Tipo-Gel ^{188}WZr

A preparação do gerador tipo gel foi realizada com a metodologia apresentada por Oliveira (2004), excluindo-se as etapas de dissolução dos alvos, visto que o ^{188}W recebido já estava processado. O gel WZr envolve o preparo de soluções com diferentes conteúdos que foram misturados conforme a metodologia descrita a seguir:

- 1) **Frasco 1:** 1 g de WO_3 dissolvidos em 18 mL de NaOH 2 mol/L e pH ajustado para 4,0 com HNO_3 2 mol/L.
- 2) **Frasco 2:** 3 g de $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 42 mL de H_2O bidestilada e pH ajustado para 1,5 com Na_2CO_3 3 mol/L.

O volume de 0,45 mL de $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ (555 MBq: ~15 mCi) foi adicionado ao frasco 1 e o volume final foi aquecido a 50 °C sob agitação. O conteúdo do frasco 2 foi adicionado gota a gota (cerca de 80 gotas/minuto) no frasco 1.

Durante dez minutos a mistura foi agitada, e após esse tempo, retirada da chapa de aquecimento para o ajuste do pH final em $4,5 \pm 0,2$ com NaOH 2 mol/L e agitada por mais 15 minutos. O volume final foi filtrado a vácuo e o material recolhido foi seco em estufa em temperatura de 90 °C por 23 horas.

Decorrido este período, o gel foi “quebrado” (quebra da estrutura cristalina) com solução salina quatro vezes para retirar o pó mais fino (partículas com diâmetro menor que 100 μm) e colocado para secar a temperatura de 60 °C por 23 horas.

Antes de colocar o gel na coluna de vidro para a montagem do gerador, aproximadamente 1 g de Al_2O_3 acidificada foi colocada na base, próximo da agulha de saída com a finalidade de reter ^{188}W durante a eluição. O gel foi colocado por cima da Al_2O_3 e tampada com a agulha da entrada, ficando pronta para a eluição e avaliação do desempenho. A FIG. 15 demonstra a composição do recheio da coluna de vidro dos geradores e a posição das agulhas para a eluição.

FIGURA 15. Esquema da montagem do gerador tipo-gel de ^{188}WZr .

3.5.3.3 Eluições dos Geradores Nacionais

Os geradores nacionais, tanto com base em Al_2O_3 como o gerador tipo-gel de ^{188}WZr , foram eluídos com frascos-ampola de solução NaCl 0,9% com volumes predefinidos em 6 mL e frascos em vácuo para coleta e secagem da coluna do gerador. Os frascos foram fornecidos pelo IPEN.

A FIG. 16 mostra o esquema de eluição dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacionais.

FIGURA 16. Esquema para eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional.

3.5.4 STC – Sistema *Tandem* de Concentração do ^{188}Re

De acordo com item 1.3.5, o sistema completo consiste na inclusão de filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore), conectados aos cartuchos *Sep-Paks*: alumina A (ácida), coluna de troca catiônica (IC-Ag da Alltech) e a coluna de troca aniônica (QMA da Waters).

Os cartuchos foram condicionados com 10 mL de água destilada com a finalidade de diminuir a resistência do volume a ser concentrado. A etapa de concentração da atividade foi realizada no decorrer da eluição do gerador importado da ORNL, mas em grande parte dos experimentos, os eluatos foram concentrados após a eluição retirando os volumes dos frascos de coleta com uma seringa de 10 mL.

A FIG. 17 mostra os cartuchos responsáveis pelas reações de troca iônica para a concentração do ^{188}Re e a disposição da seringa preenchida com NaCl 0,9% para lavar o QMA e retirar toda atividade do ^{188}Re .

FIGURA 17. Imagem do STC montado com os cartuchos de troca iônica.

3.6 Marcação do ^{188}Re -HEDP

3.6.1 Marcação dos Kits: Líquidos e Liofilizados

Os estudos da radiomarcção do HEDP com o ^{188}Re foram realizados com as soluções do ligante na forma líquida ou liofilizada, a partir de uma reação direta de complexação em meio aquoso, iniciada no momento da adição de 1 mL de $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$.

O ^{188}Re -HEDP foi obtido em temperatura ambiente e com aquecimento de 100°C durante 30 minutos. Exceto nos estudos sobre a influência do tempo de incubação no rendimento de marcação, após o aquecimento foi estabelecido o tempo de reação de 60 minutos.

Todos os complexos foram preparados com o pH de 1,5 e ao término do período de incubação o pH foi ajustado para 5.

Diferentes condições na preparação do ^{188}Re -HEDP podem afetar sensivelmente os teores de marcação, a estabilidade dos produtos e a pureza dos complexos. Dentre tais condições estão o pH, o tempo de reação, a temperatura e a razão molar dos reagentes, que foram estudadas com certas variações descritas a partir do item 3.6.2.

Com base nesses estudos é possível encontrar uma condição ótima para a formação dos complexos, e ainda, selecionar os métodos analíticos mais convenientes para a determinação da pureza dos produtos.

3.6.2 Variáveis Estudadas

A formulação denominada padrão (FP) tem a mistura de componentes nas quantidades: 30 mg de HEDP, 3 mg de ácido ascórbico e 7 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A partir desta formulação as variáveis estudadas foram descritas nos itens a 3.6.2.1 até 3.6.2.6.

3.6.2.1 Efeito da Massa do Agente Redutor

A determinação da quantidade da massa de agente redutor para a formulação padrão dos *kits* é um estudo importante, pois a marcação do ^{188}Re com o agente ligante só acontece se o Re for reduzido.

No estudo do efeito da variação da massa do agente redutor, o mesmo modo de preparo da solução do ligante estabelecido no item 3.3.1 foi realizado e para cada frasco com 1 mL da formulação contendo 30 mg de HEDP e 3 mg de ácido ascórbico, foram acrescentados de 5 a 14 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em reações conduzidas à temperatura ambiente. Em reações de marcação submetidas ao aquecimento foram acrescentados de 1 a 8 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3.6.2.2 Efeito da Massa do HEDP

As massas de HEDP usadas foram: 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mg. As reações foram conduzidas em temperatura ambiente, com aquecimento de 30 minutos em

temperatura de 100 °C e ajuste de pH. O preparo da solução do ligante seguiu a metodologia do item 3.3.1.

3.6.2.3 Temperatura e Tempo de Reação

O tempo de reação (incubação) para a formação dos complexos ^{188}Re -HEDP inicia-se no momento da mistura do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$. Nos estudos em temperatura ambiente, o tempo de incubação foi estabelecido em 60 e 180 minutos.

Nas reações conduzidas sob aquecimento, a temperatura do banho foi fixada em 100 ± 2 °C e o tempo do banho em 30 minutos, seguido de 60 minutos para o resfriamento.

3.6.2.4 Uso do Carregador

Como a preparação do ^{188}Re -HEDP usando o ^{188}Re eluído do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, é praticamente livre de carregador, os rendimentos da radiomarcagem foram avaliados com a presença do carregador utilizando 20 µL da solução descrita no item 3.3.2 para a comparação dos rendimentos da radiomarcagem da FP sem o uso do carregador .

3.6.2.5 Influência do pH

O pH final da solução do ligante para a formação dos complexos é igual a 1,5. O ajuste do pH para 5 foi feito com a adição de 2 mL da solução tampão do item 3.3.3. Também foi estudado o efeito da adição de diferentes volumes de solução tampão nos rendimentos de marcação. Os volumes de solução tampão variaram de 0,5 a 4,5 mL e foram adicionadas às misturas de marcação que reagiram em temperatura ambiente, com aquecimento e adição de carregador.

3.6.2.6 Estabilidade dos Kits Líquidos e Liofilizados

A estabilidade da formulação dos kits líquidos foi avaliada submetendo a FP líquida a radiomarcção sem adição de carregador ou aquecimento. A solução inicial de ligante que foi fracionada e armazenada em geladeira por até 19 dias. A estabilidade do kit liofilizado foi avaliada após 8 meses de sua produção.

3.6.2.7 Estabilidade da Radiomarcção

Para checar a estabilidade da FP com pH ajustado em 5, foram utilizados os kits liofilizados marcados nas melhores condições laboratoriais previamente estudadas. Duas maneiras para avaliar a estabilidade foram utilizadas, a primeira partiu da comparação dos rendimentos iniciais com os rendimentos obtidos após intervalos de tempo de: 2, 4, 6, 18 e 21 horas com estudos de CP e CCD. O critério de estabilidade foi considerado como a manutenção do resultado obtido no rendimento de marcação inicial.

O segundo modo de análise, para verificar possíveis degradações dos complexos e perda nos rendimentos após um intervalo de tempo, foi feito com a CLAE (item 3.7.4). Os produtos marcados foram armazenados protegidos da luz e sob temperatura ambiente.

A estabilidade do kit (liofilizado) também foi analisada por meio de radiomarcções com alta atividade, (atividades de uso clínico) para checar a capacidade de formação dos complexos de acordo com as variáveis da FP.

3.7 Controle de Qualidade

Nos estudos de controle de qualidade foram utilizados métodos físico-químicos para a determinação da pureza radionuclídica e radioquímica. Por conta dos objetivos desse trabalho, os testes biológicos que controlam a qualidade microbiológica dos radiofármacos, como o teste de *Limulus* (*LAL- Limulus Amebocyte Lysate*) e ensaios de esterilidade não foram realizados, salvo a administração *in vivo* dos complexos de ^{188}Re -HEDP nos estudos de biodistribuição.

3.7.1 Pureza Radionuclídica

O detector de GeHP (Germânio Hiper Puro) é um equipamento de espectroscopia de radiação gama, um método analítico sensível e com boa precisão. Este equipamento foi utilizado na determinação da pureza radionuclídica e nos cálculos dos rendimentos de marcação.

A determinação da pureza radionuclídica a partir da aquisição de dados espectrais dos fotopicos com energias características dos radionuclídeos, pode identificar outros radionuclídeos presentes nas amostras dos eluatos e são identificados como impurezas.

A análise da pureza radionuclídica é um controle de qualidade que afere o desempenho dos geradores. Isso se deve a própria montagem das colunas dos geradores, cujo material dentro da coluna pode ser degradado pelo efeito da radiólise.

O ^{188}Re liberado pelos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ deve apresentar uma pureza radionuclídica com $< 0,5\%$ de ^{188}W . O fotopico de energia de 290,67 keV corresponde ao ^{188}W , o qual foi investigado nas amostras dos eluatos dos geradores após uma semana de decaimento do ^{188}Re .

3.7.2 Pureza Radioquímica

Após a radiomarcagem, as técnicas radioquímicas envolvidas nos estudos do controle de qualidade, foram associadas aos processos cromatográficos. Assim, a determinação da pureza radioquímica foi calculada relacionando a área de contagem do fotopico de energia característico de 155 keV do ^{188}Re e estão descritos nos itens 3.7.3.1 e 3.7.3.1.1.

O resultado de pureza radioquímica ($\geq 95\%$) comprova a eficiência da radiomarcagem e garante a qualidade do radiofármaco.

3.7.3 Cromatografia

A obtenção de bons resultados de radiomarcção está relacionada com a menor quantidade de impurezas e de radionuclídeo livre (oxidado) no produto final. A qualidade dos produtos foi avaliada com técnicas radioquímicas, nas quais os rendimentos da radiomarcção foram estimados com estudos cromatográficos:

- CP: Cromatografia de Papel com *Whatman 01*;
- CDD: Cromatografia de Camada Delgada, utilizando como suporte as fitas de vidro revestidas de sílica gel (*ITLC-SG: Instant Thin Layer Chromatography – Sílica Gel*);
- CI: Cromatografia de Troca Iônica com o *Sephadex G-25* e o cartucho *QMA*;
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de fase reversa (coluna C-18).

Em geral, a cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de compostos de uma mistura através da sua distribuição em duas fases que estão em contato íntimo. Em todas as separações cromatográficas a amostra é dissolvida numa fase móvel (FM). A fase móvel percorre uma fase imiscível, que é a fase estacionária (FE) na qual permanece na coluna ou em uma superfície sólida.

A separação dos componentes da mistura é feita a partir das interações dos componentes com a FE durante a eluição da FM. O fluxo da FM move mais rapidamente os componentes que interagem fracamente com a FE, e em consequência das migrações diferenciadas são separados em bandas discretas e podem ser analisados de forma qualitativa ou quantitativa.

3.7.3.1 CP e ITLC-SG

A cromatografia com papel e ITLC-SG são métodos que separam o produto marcado, as impurezas e o ^{188}Re na sua forma livre. Após o tempo de incubação para a formação dos complexos ^{188}Re -HEDP, uma alíquota foi aplicada nos suportes a um centímetro e meio da margem inferior ($R_f = 0$).

O suporte foi colocado em uma cuba de vidro com a FM, que por capilaridade desenvolve pelo suporte até 10 cm do ponto de aplicação ($R_f = 1$). A FIG. 18 mostra o esquema dos suportes cromatográficos utilizados.

Figura 18. Esquema dos suportes cromatográficos CP e CCD.

Para identificar as espécies separadas, as fitas foram secas em estufa a 60 °C e cortadas a 5 cm do ponto de partida ($R_f = 0$). Os segmentos foram colocados dentro de uma cuba de vidro e levados para o contador de espectroscopia gama de GeHP, nos quais foram medidos os totais da área do fotopico característico do ^{188}Re .

3.7.3.1.1 Suportes e Fase Móvel

A TAB. 7, relaciona os suportes cromatográficos com as respectivas FM que foram utilizadas em todo o trabalho.

TABELA 7. Suportes e FM utilizados nas cromatografias CP e CCD.

SUPORTE	FM
Whatman 01 (CP)	Acetona (P.A.)
ITLC-SG (CCD)	NaCl 0,9%

A cromatografia em papel foi conduzida com o solvente (acetona) que precipita o $^{188}\text{Re-HEDP}$ e as impurezas no ponto $R_f = 0$. O ReO_4^- interage fracamente com o suporte e é arrastado com a frente do solvente até o ponto $R_f = 1$.

A cromatografia em camada delgada separa as impurezas da mistura ($R_f = 0$) e foi feita com a solução NaCl 0,9% que arrasta o $^{188}\text{Re-HEDP}$ e o ReO_4^- até o ponto $R_f = 1$. Os cálculos de eficiência de marcação – $EM(\%)$, foram feitos de acordo com a equação 1.

$$EM(\%) = 100 - (\%) \text{ impurezas} - (\%) \text{ ReO}_4^- \quad (EQ. 1)$$

3.7.4 Cromatografia de Troca Iônica – CI

A separação de materiais por cromatografia de troca iônica está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A afinidade dos íons da fase móvel pela matriz se resume nas diferenças de carga. (COLLINS et al., 1995)

Quando uma molécula com carga é aplicada sob um trocador com carga oposta, a molécula fica adsorvida enquanto os outros componentes da mistura, neutros ou de carga igual ao suporte, são eluídos com volume que passa pela coluna. A ligação dos

compostos carregados é reversível e os compostos adsorvidos são comumente eluídos com um sal ou com gradiente de pH.

A seleção de um suporte de troca iônica depende das propriedades dos compostos a serem separados. O ponto isoelétrico (pI) e o efeito do pH na estabilidade dos compostos determinam a estratégia de separação com CI.

Em relação ao pI dos compostos, quando a solução apresenta um pH maior que o pI, a carga dos compostos fica negativa e com pH menor que o pI, carregado positivamente. Assim, se o composto apresentar estabilidade em pH elevado, o suporte mais adequado é um trocador aniônico e se for estável com um pH mais baixo, o melhor suporte será de troca catiônica.

O efeito do pH na CI também pode determinar o tipo de trocador a ser usado. Um suporte de troca iônica forte mantém sua capacidade de reação mesmo com uma larga faixa de pH, enquanto um suporte fraco perde sua capacidade de reação quando o pH e o pKa dos grupos funcionais do suporte se igualam.

Em relação à forma iônica, muitos trocadores estão disponíveis em várias formas, mas podem ser convertidos para outra. A forma iônica do grupo funcional faz referência aos íons que estão adsorvidos no suporte, dessa forma, cada suporte exibe seletividade específica para a troca dos íons.

A porosidade é outra qualidade do suporte e refere-se ao volume total do poro da matriz do suporte. Um suporte muito poroso pode ter uma variação no tamanho dos poros. O limite de exclusão dado pelo suporte define-se pelo tamanho do maior composto capaz de passar pelo poro sob condições controladas.

Os poros com maiores limites de exclusão são recomendados para compostos de alto peso molecular, como proteínas, anticorpos e outras biomoléculas. A menor porosidade com baixos limites de exclusão é recomendada para a separação de compostos de baixo peso molecular como íons inorgânicos e ácidos orgânicos.

3.7.4.1 Matrizes dos Suportes Seleccionados

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, com características inertes, insolúveis em água e solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos de trocadores iônicos. Para realizar o controle de qualidade com cromatografia de troca iônica foram utilizados dois suportes: *Sephadex G-25* e *QMA*.

3.7.4.1.1 Trocadores com Matriz de Dextrano

O dextrano é formado por unidades de glicose. O Sephadex (nome comercial) é um gel polimérico de dextrano, com ligações cruzadas de pontes de hidrogênio entre as cadeias, criando uma estrutura porosa. Os grupos –OH, tornam o material fortemente hidrofílico e a presença de partículas esféricas, onde grupos iônicos podem ser ligados, permite que seja utilizado como trocador iônico. (COLLINS et al., 1995)

A coluna de Sephadex foi usada como suporte para cromatografia de troca catiônica fraca. O limite de exclusão é de aproximadamente 30,000 Da que admite pequenas moléculas no seu interior. A faixa de pH adequada para a operação é de 6 – 10 com capacidade de troca iônica de 4.0-5.0 meq/g.

Foram utilizadas as colunas PD-10 de Sephadex G-25 condicionadas com 20 mL de NaCl 0,9%. As amostras de ^{188}Re -HEDP foram colocadas em cima do gel com uma seringa.

A eluição do gel foi feita com solução de NaCl 0,9% e as frações de volume utilizadas variaram de 1 a 2 mL. Em cada eluição, as frações coletadas foram analisadas pela contagem da radioatividade com o detector de GeHP e com o calibrador de dose.

Os cálculos dos rendimentos de complexação são obtidos pelas equações 2 e 3:

$$R(\%) = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100, \text{ onde:} \quad (EQ. 2)$$

A_1 é a atividade inicial da carga na coluna Sephadex;

A_2 é a atividade residual após a eluição com o solvente NaCl 0,9%.

Outra relação pode ser estabelecida na contagem dos eluídos, sempre em volumes iguais para respeitar a geometria do contador de GeHP, sendo o rendimento calculado pela área:

$$R_{\text{área}}(\%) = \{100 - [(At - Ao) / At] \times 100\}, \text{ onde} \quad (EQ. 3)$$

At é a área total do pico de energia do ^{188}Re (keV);

Ao é a área da primeira porção eluída (10 mL).

3.7.4.1.2 Trocadores Orgânicos Sintéticos

As resinas de troca básica (aniônicas) são preparadas por clorometilação seguida por uma reação com amina terciária ou outro reativo apropriado. A estrutura pode conter trocadores de grupos: $-\text{CH}_2 - \text{N}^+\text{R}_3$ com OH^- ou Cl^- . (COLLINS et al., 1995)

O segundo suporte utilizado, o cartucho QMA (Waters), foi baseado em dois estudos: LISIC et al. (2001) e PALMEDO et al. (2000)

O cartucho de separação de fase sólida, denominado QMA, é preparado com base de sílica (copolímero de acrilamida em sílica-diol), com tamanho de partícula entre 37-55 μm , com tamanho grande de poros (300 Å). A funcionalidade da superfície é dada por $[-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-]$.

O QMA possui caráter hidrofílico e característica de troca aniônica forte, sua aplicação é viável para a extração de analitos aniônicos em soluções aquosas e não aquosas.

LISIC et al. (2001) apresentaram uma metodologia de purificação do composto marcado ^{188}Re -HEDP utilizando um cartucho de extração em fase sólida – o QMA.

O procedimento de LISIC et al. para a radiomarcagem do HEDP, utilizou um frasco com 100 mg de HEDP dissolvidos em 3 mL de solução de ácido ascórbico 0,003 mol/L e a adição de 30 mg de SnCl_2 foi precedida da adição de 1 mL de ^{188}Re (325,6 MBq). A mistura de reação foi aquecida em temperatura de 100 °C durante 10 minutos e permaneceu por mais 2 horas em temperatura ambiente.

Para avaliar o desempenho dos cartuchos QMA, com a finalidade de purificação dos complexos formados com HEDP e ^{188}Re , essa metodologia foi adaptada. Um volume de 3 mL de kit líquido foi transferido para um frasco de reação de 50 mL e adicionando em seguida 1 mL de ^{188}Re (370 MBq: ~ 10 mCi). A solução de carregador utilizada (especificada no item 3.3.2) foi modificada com o acréscimo de 0.5 mg de TBA.

Para avaliar o desempenho da separação do cartucho QMA, os primeiros experimentos contaram com a marcação do HEDP com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Os testes utilizaram os kits líquidos e liofilizados da FP.

Todas as reações de radiomarcagem ocorreram com aquecimento durante 30 minutos em 100°C e mais 60 minutos de incubação.

A segunda etapa da metodologia que é a purificação, foi seguida conforme os procedimentos descritos por LISIC et al. O cartucho QMA foi condicionado com 10 mL da solução de ácido ascórbico $0,003\text{ mol/L}$, e 20 mL da mesma solução foram utilizados na diluição da mistura de reação.

O volume previamente diluído foi percolado lentamente pelo QMA com o descarte da solução coletada, logo depois o QMA foi eluído com água bidestilada. Para a separação das espécies, o QMA foi eluído com 10 mL de solução pH 7 de NaCl $0,3\text{ mol/L}$ (preparado com uma solução de ácido ascórbico $0,003\text{ mol/L}$ e HEDP $0,01\text{ mol/L}$). Cada mL coletado foi analisado no detector de GeHP e no calibrador de doses.

PALMEDO et al. (2000) usaram a cromatografia de troca iônica com o cartucho QMA para o controle de qualidade, e avaliaram a separação das espécies com propriedades aniônicas do produto marcado ^{188}Re -HEDP. O perfil de eluição foi comparado com o ^{186}Re -HEDP (um produto comercial da Mallinckrodt).

A metodologia de separação é semelhante ao método apresentado por LISIC et al. (2001) porque também está baseado na separação iônica por gradiente de eluição. Foram utilizados os kits liofilizados com solução de carregador e a radiomarcagem seguiu conforme o item 3.6.1.

No primeiro experimento, o QMA foi condicionado com 10 mL de uma solução de água destilada com 30 mg/mL de HEDP e $5,2\text{ mg/mL}$ de ácido ascórbico. A mistura de reação para a formação dos complexos ^{188}Re -HEDP (com o pH ajustado para

5), apresentou um volume final de 3 mL. A mistura de reação não foi diluída e apenas 1 mL desse volume final foi retirado com uma seringa e eluído pelo QMA.

No segundo experimento, uma solução de água destilada com 3 mg/mL de HEDP e 0,5 mg/mL de ácido ascórbico foi preparada para o condicionamento do QMA e para a diluição da mistura de reação. O QMA foi condicionado com 10 mL dessa solução e após a radiomarcagem do ^{188}Re -HEDP, uma alíquota de 0,4 mL da mistura de reação foi diluída em 10 mL e eluída pelo QMA.

Para a separação por gradiente das espécies aniônicas foram preparadas soluções de NaCl com diferentes forças iônicas de concentração: 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M, 1 M e 2 M. O QMA foi lavado com dois mL de cada solução e o volume foi coletado em frascos e analisados em contador automático do tipo poço.

O rendimento das espécies coletadas (EC%) em cada volume de gradiente de eluição foi calculado de acordo com a equação 4.

$$EC(\%) = [(A_2 \times 100) / A_1] \quad (EQ.4)$$

A_1 é a atividade da carga do QMA;

A_2 é a atividade da porção eluída (2 mL).

3.7.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE

O controle de qualidade dos complexos de ^{188}Re -HEDP com CLAE foi realizado com uma coluna de 4,6 x 150 mm de fase reversa C18 preenchida com sílica 5 μm de alta pureza com poros de 120 Å. A coluna foi escolhida por ser mais acessível (economicamente) do que uma coluna de troca iônica. Dessa maneira, para uma coluna de cromatografia de fase reversa C18 se transformar em um trocador iônico, a matriz do suporte foi modificada com a FM descrita por DE GROOT et al. (1986, 1987).

A composição da FM usada na CLAE é fundamental nos resultados da separação. Por isso, a concentração dos eluentes da FM pode evitar a decomposição dos complexos e a alteração dos picos principais, como o tempo de retenção das espécies na coluna e a largura da banda dos picos.

Como no trabalho de DE GROOT et al. (1987), para modificar o grupo funcional da sílica C18 dois reagentes fundamentais nesse processo foram utilizados: o tetrabutilamonio (TBA) e acetato de etila (EtAc). A concentração de TBA na FM foi de 0,03 M e o EtAc em 1 e 2%. Na FM também foi utilizado HEDP 0,005 M para evitar a decomposição dos complexos durante a separação e acetato de sódio (NaAc) 0,001 M.

Os parâmetros da CLAE foram ajustados para operar no modo isocrático, com fluxo de 1mL/min de eluição da FM e pressão de 300 psi. A temperatura de operação do equipamento foi mantida automaticamente em 25 - 27 °C e a leitura do detector UV-vis foi fixada em $\lambda = 268$ nm, que corresponde à absorbância do HEDP.

3.7.6 Distribuição Biológica do ^{188}Re -HEDP

Os estudos de distribuição *in vivo* do ^{188}Re -HEDP foram feitos em ratos wistar sadios (n=4, de 32 ± 2 g). Os kits liofilizados da FP (item 3.6.1), preparados com ácido ascórbico e ácido gentísico, foram avaliados na aquisição de imagens de cintilografia óssea.

Amostras de ^{188}Re -HEDP (37 MBq: 1 mCi) com volumes de 300 μL foram injetadas na veia caudal dos ratos. Os complexos foram preparados com os kits liofilizados da FP com ácido gentísico (n=2) e com ácido ascórbico (n=2).

Após três horas da administração do produto, os animais foram sedados e foram obtidas as primeiras imagens. Os animais foram mantidos vivos, por mais 24 horas para a aquisição de imagens e, em seguida, sacrificados com uretana.

A infra-estrutura do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas foi utilizada na aquisição das imagens. O equipamento Siemens LEM+ analógico, com campo de visão circular, possui um multicanal para espectros com energias entre 15 – 510 keV. O colimador para baixa energia (máximo 200 keV) foi utilizado para a projeção de imagens planares. O *software* ImageJ processou as imagens que foram obtidas durante 10 minutos (por animal).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eluição dos Geradores

4.1.1 Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}(\text{Al}_2\text{O}_3)$ – Importados

Na primeira eluição do gerador importado (ORNL), uma grande quantidade de solvente foi necessária para condicionar a coluna de Al_2O_3 . Os primeiros 10 mL foram completamente retidos pela coluna e seguidos de mais 23 mL para retirar a atividade da coluna.

Mesmo com a percolação de grandes volumes da solução NaCl 0,9% pela coluna os íons de tungstato permaneceram adsorvidos, coletando o radioisótopo ^{188}Re na forma de perrenato de sódio ($\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$).

O rendimento de eluição foi calculado pela medida da atividade do ^{188}Re , com o contador tipo poço (Capintec). A TAB. 8 relaciona o desempenho do gerador a partir da atividade total eluída, levando em consideração o decaimento do ^{188}W .

TABELA 8. Rendimentos da primeira e segunda eluição (gerador ORNL).

Data da calibração: 17/03/2005 A=17,02 GBq	Data, Atividade de eluição e volume	Atividade teórica de ^{188}W	Desempenho do gerador
	19/04/05		
Primeira eluição	10,62 GBq 23 mL	12,22 GBq	86,91%
	27/04/05		
Segunda eluição	9,10 GBq 17 mL	11,28 GBq	80,87%

A FIG. 19 mostra os rendimentos das frações obtidas na primeira eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ da ORNL, com atividade total de 10,62 GBq. A pureza radioquímica encontrada com CP e CCD foi de 99,62%.

Todas as análises de determinação da pureza radionuclídica, foram feitas após o decaimento do ^{188}Re nos eluatos e não indicaram a presença de ^{188}W .

FIGURA 19. Perfil da primeira eluição do gerador importado.

As eluições do gerador importado da Polônia, utilizando o método mais simples de eluição com frascos de solução NaCl 0,9% e em vácuo, resultaram em eluatos com pureza radioquímica superiores a 99,8%. De acordo com a especificação do fabricante, a primeira fração de 4 mL deve apresentar um rendimento superior a 90% e com a segunda fração de 4 mL, o rendimento deve ser >95%.

A TAB. 9 relaciona as atividades eluídas de ^{188}Re com a atividade teórica de ^{188}W da coluna do gerador. Os resultados mostram que os desempenhos são superiores a 100%, o

que sugere um carregamento do Al_2O_3 com ^{188}W diferente da calibração específica de 16 GBq no rótulo do gerador.

TABELA 9. Eluições do gerador POLATON

Tempo de decaimento (dias) do ^{188}W	Desempenho do Gerador	Volume de eluição	Atividade de ^{188}Re
65	137,37%	6 mL	11,21 GBq
114	135,95%	4 mL	6,92 GBq
127	133,11%	8 mL	5,95 GBq
142	132,29%	4 mL	5,08 GBq

As análises de pureza radionuclídica também não identificaram a presença de ^{188}W nas amostras dos eluatos.

4.1.2 Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) – Nacional

As eluições do gerador com base de alumina de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional apresentaram bom desempenho. O primeiro gerador com a coluna de Al_2O_3 carregada com 0,1 mL de ^{188}W , apresentou um desempenho de aproximadamente 60%.

A eluição de cada fração de 1 mL apresentou um rendimento diferenciado e como pode ser visto na FIG. 20, nos 4 primeiros mL, ~ 90% da atividade total foi eluída. Os resultados mostram que as eluições do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional com o volume de 6 mL de NaCl 0,9% fracionados em 1 mL possuem o mesmo perfil de eluição e estão de acordo com as especificações de geradores comerciais (ex. POLATON).

FIGURA 20. Desempenho da eluição do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional.

O segundo gerador com a coluna de Al_2O_3 carregada com 0,45 mL de ^{188}W atingiu um desempenho aproximado em 89,30% da atividade inicial, um ótimo resultado da liberação do ^{188}Re e além da pureza radioquímica >99%.

A FIG. 21, mostra o perfil das eluições com seus respectivos volumes com a contagem de ^{188}Re de acordo com o decaimento do ^{188}W . Em geral, nenhum problema foi identificado na montagem do gerador nacional com a coluna de alumina.

FIGURA 21. Perfil da eluição do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ nacional.

No segundo gerador as eluições também apresentaram um rendimento na primeira fração de 4 mL superior a 90%. Um exemplo do rendimento determinado nas frações eluídas do segundo gerador nacional pode ser visto na TAB. 10.

TABELA 10. Exemplo do desempenho da eluição do segundo gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) nacional.

Frascos de eluição 1	Valores	Rendimento da Atividade x Volume (%)
Volume (mL)	5,05	
Atividade (MBq)	552,78 (~14,94 mCi)	99%
Frascos de eluição 2		
Volume (mL)	1,04	
Atividade (MBq)	5,62 (~0,152 mCi)	1%

4.1.3 Gerador Tipo-Gel de ^{188}WZr

O gel de ^{188}WZr foi preparado nas condições descritas no item 3.5.3, e apresentou características físicas adequadas após a quebra e o processo de secagem do gel. O desempenho de eluição foi analisado com a transferência do gel para a coluna.

LIANG et al. (1997) preparam geradores tipo-gel com atividade máxima de 740 MBq e diferentes íons foram analisados na formação do gel, assim como diferentes sistemas de solventes para a eluição. Os resultados do desempenho dos geradores foi $\leq 10\%$ quando a água ou etanol foram os solventes utilizados. Os estudos com outros solventes orgânicos, apresentaram os melhores resultados com a solução de NaCl 0,9%.

Desse modo, os resultados encontrados a partir das eluições do gerador tipo-gel com a percolação do NaCl 0,9% em grandes volumes, mostraram uma forte retenção das espécies de ^{188}Re , pela dificuldade de liberar grande parte da atividade que permaneceu retida na coluna. Em todas as tentativas de eluições do gerador tipo-gel, os eluatos apresentaram o aspecto turvo, com gel em suspensão, inadequados para a marcação. O gerador não liberou mais do que $\sim 26\%$ da atividade inicial de preparo do ^{188}WZr , como pode ser visto na TAB. 11. O estudo de pureza radionuclídica não indicou a presença de ^{188}W nos eluatos.

TABELA 11. Desempenho do gerador tipo-gel de ^{188}WZr .

Eluição 1	Valores	Rendimento da Atividade x Volume
Volume 1 (mL)	5,26	
Atividade (MBq)	96,94 ($\sim 2,62$ mCi)	17,47%
Volume 2 (mL)	5,94	
Atividade (MBq)	48,47 ($\sim 1,31$ mCi)	8,73%

CONTINUAÇÃO: TABELA 11. Desempenho do gerador tipo-gel de ^{188}WZr .

Eluição 2	Valores	Rendimento da Atividade x Volume
Volume (mL)	5,55	
Atividade (MBq)	94,35(2,55 mCi)	17,59%
Volume (mL)	6,12	
Atividade (MBq)	37 (~1 mCi)	6,89%

4.1.4 Sistema Tandem de Concentração: STC

Os resultados referentes ao STC são os valores das atividades e foram transformados em percentuais para visualização mais clara dos rendimentos obtidos e as frações que correspondem à perda no STC.

O STC utilizado da forma completa, ou seja, com os filtros Millipore de 0,22 μm e o Sep-Pak de alumina ácida conectados aos cartuchos de cromatografia iônica, apresentou resultados relacionados na TAB.12. A atividade considerada 100% foi a soma dos valores eluídos e das porções do STC conectado diretamente no gerador importado de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (ORNL).

TABELA 12. Percentual relativo a cada unidade do STC observado nos experimentos.

<i>Unidades do STC</i>	<i>Experimentos do STC</i> <i>Percentual das atividades (%)</i>		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Millipore	1,80	4,33	2,19
Alumina-A	5,23	4,50	3,78
Cartucho (IC-Ag)	1,30	4,74	2,93
Cartucho QMA	4,90	0,70	0,12
Perda da atividade com o sistema	13,23	14,27	9,02

Os resultados mostram uma média de 12,2% na perda da atividade que é inerente ao procedimento STC. Em geral, durante os experimentos com o STC, a perda relacionada ao uso do método de concentração após a eluição do gerador apresentou uma média de 10% da atividade, para o STC montado apenas com os cartuchos de troca iônica e a manipulação dos eluatos com seringas.

A vantagem do uso do método de concentração sem dúvida é a redução do volume de eluição, dentro dos resultados apresentados na TAB.12, as atividades obtidas antes e depois do STC podem ser observadas na TAB 13.

TABELA 13. Atividades concentradas pelo STC.

<i>Atividade (MBq) / mL de eluição antes do STC</i>	<i>Atividade (MBq) / mL depois do STC</i>
141	560
115	352
55	279

A FIG. 22 apresenta a capacidade de concentrar as atividades dos eluatos, o perfil de eluição do gerador com o desempenho e respectivos volumes de eluição e a recuperação da atividade com o cartucho de QMA.

FIGURA 22. Desempenhos das eluições do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ e dos cartuchos QMA.

Durante o procedimento de concentração foi notado um prejuízo do rendimento conforme o fluxo de eluição se torna mais rápido. Nos trabalhos de OH et al. (2003), as eluições do gerador foram automatizadas (conectado ao STC), e um volume de 18 mL de NaCl 0,9% foi eluído com baixo fluxo de eluição (1,5 mL/min) apresentando um rendimento de $95 \pm 1,5\%$, e um fluxo entre 2-3 mL/min o rendimento foi de $85 \pm 1,2\%$. Essa observação é pertinente nos resultados observados durante o uso do STC, no qual a eluição manual acaba prejudicando o desempenho dos cartuchos, pois o fluxo de eluição dificilmente é mantido regular em função do tempo e volume.

Nos trabalhos de SINGH et al. (1993) onde os primeiros estudos sobre a concentração do ^{188}Re foram reportados, no sistema de concentração o cartucho de troca aniônica utilizado foi a *BondElut SAX* no lugar do QMA, mantendo o cartucho de troca catiônica (com íons de prata – IC-Ag da Alltech). Os autores relatam que a eficiência de eluição do perrenato foi $>95\%$ em eluições manuais, mas foi preciso mudar o sistema de solvente para bicarbonato de sódio 0,1 mol/L.

Aproximadamente após quatro $T_{1/2}$ do ^{188}W ($T_{1/2} = 69$ dias) os experimentos de radiomarcagem com atividades e volumes ideais para as reações foram possíveis com o uso do sistema de concentração e o gerador foi utilizado no decorrer de 10 meses.

Assim como KNAPP et al. (1997) o sistema de concentração foi importante para prolongar o uso do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, muito eficaz no seu propósito e sendo um método disponível, apesar do processo de importação dos cartuchos ser demorado, porém o cronograma do trabalho já previa a necessidade de concentração das atividades e a compra dos materiais foi providenciada de antemão ao decaimento do ^{188}W .

4.2 Variáveis Estudadas na Marcação do ^{188}Re -HEDP

Os estudos das variáveis para a marcação do ^{188}Re -HEDP foram feitos com os kits mantidos na forma líquida. Os kits que passaram pelo processo de liofilização foram testados após a otimização da metodologia de marcação, e também, utilizados nos estudos com alta atividade de marcação.

4.2.1 Efeito da Massa do Agente Redutor

Os estudos com diferentes massas de agente redutor foram realizados para definir uma massa adequada de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na formulação padrão a ser liofilizada. O rendimento de marcação foi o parâmetro para verificar o efeito da variação da massa do agente redutor.

As reações de radiomarcagem foram realizadas mantendo-se as mesmas condições laboratoriais, como: o tempo, a temperatura do meio de reação, os componentes da mistura dos *kits* líquidos fixados em 30 mg de HEDP e 3 mg de ácido ascórbico em 1 mL de H_2O . Em todos os frascos de reação foram adicionados o $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ (1 mL) com atividade de 74 MBq (2 mCi).

A FIG. 23, mostra a curva de eficiência de marcação para massas a partir de 5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em reações conduzidas em temperatura ambiente e o tempo de reação de 180 minutos.

Na FIG. 24 estão os resultados das formulações contendo inicialmente 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que foram submetidas a aquecimento de 100 °C durante 30 minutos seguidos do tempo de incubação de 60 minutos para o resfriamento.

FIGURA 23. Curva de eficiência de marcação em função da massa de agente redutor.

FIGURA 24. Eficiência de marcação em função da massa de agente redutor em reações conduzidas sob aquecimento.

FAINTUCH et al. (2003), relataram rendimentos de $95,3 \pm 1,2\%$ na formação dos complexos ^{188}Re -HEDP, utilizando 1,5 mg/mL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e com condições de marcação aproximadas dos experimentos, os quais ocorreram sem a adição de carregador e aquecimento de 100°C durante 30 minutos.

HSIEH et al. (1999) trabalharam com kits liofilizados com 15 mg de HEDP, 4,5 mg de SnCl_2 e 4 mg de ácido gentísico, e os resultados dos rendimentos para o ^{188}Re -HEDP foram apresentados de modo genérico ($>90\%$) para todas as preparações.

A dependência de massa de SnCl_2 para o aumento do rendimento de marcação foi observada nos estudos de HASHIMOTO (1995, 1997 e 1999), nos quais os derivados de aminometilenofosfonato (AMP), HEDP e MDP foram radiomarcados com ^{188}Re em reações conduzidas em temperatura ambiente e livre de carregador, e ainda, nos estudos de PERVEZ et al. (2003) nas marcações também em temperatura ambiente do ^{188}Re -EDTMP.

De acordo com KOTHARI et al. (1999) no estudo da radiomarcação do ^{186}Re com o HEDP, também foi observada a formação dos complexos em temperatura ambiente se massas maiores de SnCl_2 forem empregadas.

A mesma influência da concentração de SnCl_2 foi encontrada nos estudos da radiomarcação do ^{188}Re -AEDP. (QUINGNUAN et al., 2000)

O único trabalho que utilizou o SnF_2 , como fonte de Sn(II) para a redução do ^{188}Re foi reportado por MURPHY et al. (2001), porém a dependência da concentração na eficiência de marcação foi igualmente apresentada.

KOUDELKOVÁ et al. (2003a) objetivaram a redução da quantidade de SnCl_2 presente nos kits, devido ao seu potencial tóxico, e definiram um modo de diminuir a concentração de SnCl_2 sem afetar a eficiência de marcação do ^{186}Re -HEDP. Ao estabelecerem as quantidades de ligantes e carregador concluíram que a concentração ideal na solução final é de 5,64 mg/mL (25 mmol/L)

Embora não haja um consenso sobre a melhor quantidade de Sn presente nos kits de HEDP, outros autores atingiram bons rendimentos com diferentes formulações dos kits nos estudos de radiomarcação (de acordo com a TAB. 32). As variações na formulação e as

condições de marcação influenciaram diretamente nos rendimentos de complexação do ^{188}Re -HEDP, sendo a quantidade de Sn a primeira delas.

Dessa maneira, a quantidade máxima de SnCl_2 necessária para obter bons rendimentos de complexação foi estabelecida em 7 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.1×10^{-2} mol/L) para os outros estudos das variáveis e dos *kits* liofilizados.

4.2.2 Efeito da Massa do HEDP

Os primeiros estudos de radiomarcagem, foram realizados com um procedimento diferente no preparo das soluções de ligantes, que consistia em um frasco com 300 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (24 mg/mL de HCl 0,1 mol/L) e 200 μL de ácido ascórbico (15 mg/mL de H_2O) e mais 500 μL de água destilada para completar o volume para 1 mL.

Em seguida mais 1 mL de $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ com atividade de 111 MBq (3 mCi) foi adicionado em cada valor de massa de HEDP (mg). A solução de ligante foi incubada durante 60 minutos em temperatura ambiente e os resultados obtidos em pH 1,5 estão apresentados na FIG. 25.

FIGURA 25. Efeito da concentração de HEDP na formação dos complexos.

Esse estudo demonstrou o efeito direto da presença de agente ligante, no qual o HEDP em excesso melhora os rendimentos dos complexos de ^{188}Re -HEDP.

Quando as soluções de ligantes são submetidas ao aquecimento, as massas intermediárias (30 e 40 mg) apresentaram melhores rendimentos de complexação quando comparados com os resultados das reações em temperatura ambiente, mas quantidades de massas maiores, não apresentam o mesmo efeito que foi observado em temperatura ambiente.

A FIG. 26 mostra que a variação da massa de HEDP acima de 40 mg, em reações com aquecimento, contribui pouco para o aumento do rendimento dos complexos ^{188}Re -HEDP, mas aumentam ligeiramente sua estabilidade quando o pH é ajustado para 5.

FIGURA 26. Efeito da massa de HEDP em reações submetidas ao aquecimento.

KOUDELKOVÁ & KRIZOVÁ (2003) mostraram que a presença em excesso de HEDP otimiza a complexação com o ^{186}Re reduzido e minimiza a formação de impurezas ReO_2 . Esse efeito acontece em pH 2 e pH 5 contribuindo para a formação de complexos mais estáveis.

HASHIMOTO (1996), no estudo com MDP, demonstrou que existe um limite no aumento da concentração de SnCl_2 com a sua precipitação no meio de reação, esse limite é atingido quando a massa de ligante utilizada não mantém o pH baixo suficiente para a dissolução do SnCl_2 . Isso também foi observado quando uma quantidade inferior de HEDP foi utilizada.

Os resultados observados com o ajuste de pH condizem com os estudos de HASHIMOTO (1998), nos quais a influência da massa de HEDP em função do rendimento de marcação também variou com o pH mostrando melhor eficiência em pH mais baixo.

KOTHARI et al. (2001) observaram que a massa de ligante HEDP em excesso poderia contribuir com melhor estabilidade dos complexos, visando não só bons rendimentos de marcação como partida para o desenvolvimento de uma formulação. A formulação revisada com 50 mg de HEDP e 10 mg de SnCl_2 apresentou rendimentos >95% e estabilidade por até 4 dias ou uma semana se armazenada em temperatura e pH baixos.

4.2.3 Tempo de Marcação

As concentrações do agente redutor e do ligante foram estabelecidas em 7 e 30 mg, respectivamente. Essa formulação padrão, presente nos kits líquidos, serviu de base para os estudos sobre a influência do tempo de incubação na formação dos complexos.

As reações foram conduzidas em temperatura ambiente e ao final dos intervalos de: 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, o pH foi ajustado para 5. O aumento do volume proporcionado pela adição de solução tampão (2 mL de NaAc 0,3 mol/L) e a própria variação do pH influenciaram os resultados iniciais dos rendimentos de marcação, como pode ser visto na FIG. 27.

FIGURA 27. Variação do tempo de marcação para a formulação FP.

Dentre os resultados, praticamente não houve uma grande variação nos rendimentos de marcação nas soluções com o pH 1,5, mas a influência do tempo na estabilidade termodinâmica dos complexos pode ser vista quando o pH é ajustado para 5.

A variação que ocorre entre os resultados com o pH ajustado para 5, indica uma possível recombinação na formação dos complexos quando o tempo de incubação é inferior a 150 minutos.

HASHIMOTO (1999), observou que a formação dos complexos do ^{188}Re -EDTMP em pH mais altos (~ 4) foi dependente do tempo de reação, o que vem de encontro com os resultados obtidos nesse trabalho.

4.2.4 Temperatura

Altos rendimentos de complexação podem ser obtidos com Re, mas a estabilidade dos complexos formados varia com os ligantes, a concentração de SnCl_2 e a temperatura de reação. (BANERJEE et al., 2001)

Nos estudos anteriores sobre o efeito da variação das massas de agente redutor e ligante, a temperatura desenvolveu um papel importante no apontamento de diferentes resultados de marcação.

Ao comparar os resultados das reações ocorridas à temperatura ambiente com as reações à 100 °C, a formação de complexos ^{188}Re -HEDP ocorreu em situações onde a concentração de Sn está bem reduzida, e ainda os rendimentos ficaram próximos a 95% (FIG. 24), além de permitir que uma menor massa de ligante seja utilizada, sem afetar a eficiência de marcação (FIG. 26).

Dessa forma, o aumento da temperatura a 100 °C no meio de reação, também contribuiu para a formação de complexos mais estáveis, possivelmente ao expulsar uma quantidade de oxigênio durante o tempo de reação diminuindo a reoxidação do ^{188}Re .

Como pode ser observado nas TAB. 14 e 15, nas reações sem aquecimento o tempo de reação foi diferenciado em 60 e 180 minutos, sendo que os resultados do rendimento de marcação são superiores quando a mistura de reação é incubada por mais tempo e a qualidade do eluato é modificada pelo STC.

Os resultados sugerem que além de catalisar a reação de radiomarcagem com o aquecimento, outras variáveis apresentam-se igualmente importantes para a melhora da estabilidade, como a presença de carregador e o uso do STC. Tais resultados podem ser conferidos na TAB 16 e 17.

TABELA 14. Resultados dos experimentos de marcação em temperatura ambiente sem adição do carregador.

<i>Condições: Sem carregador ^a Temperatura ambiente</i>	<i>Experimentos (n)</i>	<i>Rendimentos de marcação (%)</i>			
		<i>180 minutos</i>		<i>60 minutos</i>	
		<i>pH 1,5</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 1,5</i>	<i>pH 5</i>
FP Com STC	1	94,20	88,10	92,73	
	2	98,10	92,70	94,18	
	3	97,90	75,40	95,13	ND
	Média	96,73	85,40	94,01	
	sd	2,20	8,96	1,21	
	cv	2,27	10,49	1,29	
FP Sem STC	1	81,60	83,30	94,19	
	2	82,10	76,82	91,05	
	3	78,50	84,90	94,72	ND
	Média	80,73	81,67	93,32	
	sd	1,95	4,28	1,98	
	cv	2,42	5,24	2,13	

Observações: ^a 20 µg de Re₂O₇, FP= fórmula padrão, STC= Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação.

TABELA 15. Resultados dos experimentos de marcação em temperatura ambiente e uso de carregador.

Condições: Com carregador ^a Temperatura ambiente	Experimentos (n)	Rendimentos de marcação (%)			
		180 minutos		60 minutos	
		pH 1,5	pH 5	pH 1,5	pH 5
FP Com STC	1	98,40	94,04	96,93	88,84
	2	98,10	93,11	96,76	84,08
	3	98,30	92,93	92,49	76,13
	Média	98,27	93,36	95,40	83,02
	sd	0,15	0,60	2,51	6,42
	cv	0,16	0,64	2,63	7,74
FP Sem STC	1	96,08	94,88	97,29	95,58
	2	95,19	96,98	96,98	95,56
	3	96,55	95,02	96,79	83,13
	Média	95,94	95,63	97,02	91,42
	sd	0,69	1,17	0,25	7,18
	cv	0,72	1,23	0,26	7,86

Observações: ^a 20 µg de Re₂O₇, FP= fórmula padrão, STC= Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação.

TABELA 16. Resultados das reações de marcação com aquecimento sem adição de carregador.

Condições: Sem carregador ^a, 30 minutos de aquecimento 100 °C, Resfria 60 minutos	Rendimentos de marcação (%)		
	Experimentos (n)	pH 1,5	pH 5
FP Sem STC	1	91,65	94,46
	2	90,55	95,00
	3	93,88	90,68
	4	93,40	90,34
	Média	92,37	92,62
	<i>sd</i>	<i>1,55</i>	<i>2,45</i>
	<i>cv</i>	<i>1,67</i>	<i>2,65</i>
FP Com STC	1	96,83	88,01
	2	96,70	88,20
	3	95,18	88,35
	4	91,78	88,12
	Média	95,12	88,17
	<i>sd</i>	<i>2,35</i>	<i>0,14</i>
	<i>cv</i>	<i>2,47</i>	<i>0,16</i>

Observações: ^a 20 µg de Re₂O₇, FP= fórmula padrão, STC= Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação.

TABELA 17. Resultados das reações de marcação com aquecimento e uso de carregador.

Condições: Com carregador ^a 30 minutos de aquecimento 100 °C, Resfria 60 minutos	Rendimentos de marcação (%)		
	Experimentos (n)	pH 1,5	pH 5
FP Com STC	1	98,88	94,44
	2	97,64	96,56
	3	97,84	92,74
	4	98,73	98,32
	5	98,11	97,58
	6	98,61	98,38
	7	99,16	98,52
	8	99,19	98,76
	9	98,17	98,03
	Média	98,48	97,04
	sd	0,57	2,10
	cv	0,57	2,17
FP Sem STC	1	97,85	92,06
	2	97,84	89,81
	3	97,62	91,46
	4	97,95	95,54
	5	97,65	94,14
	6	97,46	92,41
	7	98,58	97,19
	8	98,87	97,15
	9	98,72	97,13
	Média	98,06	94,10
	sd	0,52	2,80
	cv	0,53	2,97

Observações: ^a 20 µg de Re₂O₇, FP= fórmula padrão, STC= Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação.

BANERJEE et al. (2001) demonstraram resultados satisfatórios com 30 minutos de aquecimento, com relação à estabilidade dos complexos formados. Os primeiros experimentos indicam que a complexação ocorre sem aquecimento, mas a estabilidade dos produtos formados foi prejudicada.

LIN et al. (1999) relataram que a temperatura não apresentou o efeito esperado com o aumento da estabilidade dos complexos, os resultados mostram uma eficiência >93% no final do tempo de incubação e após 48 horas 86%. A formulação utilizada (com adição de carregador de 10^{-4} mol/L) continha 15 mg de HEDP, 4,5 mg de SnCl_2 e 4 mg de ácido gentísico.

HASHIMOTO et al. (1996) e HASHIMOTO (1998 e 1999), enfatizaram que o aumento da temperatura do meio de reação não aumentou o rendimento de marcação embora tenha reduzido o tempo de reação.

KOTHARI et al. (1999) discutiram a respeito da temperatura, onde de fato os complexos podem ser formados em reações conduzidas em temperatura ambiente, embora não apresentem muita estabilidade em função do tempo de estocagem em comparação aos resultados das reações conduzidas a 100 °C.

Até o momento, os estudos sobre as condições de reação na preparação do ^{188}Re -HEDP, envolveram a presença de quantidades suficientes de SnCl_2 e HEDP para a formação de complexos estáveis, além do tempo e a temperatura de reação, a influência do carregador no rendimento de marcação e na estabilidade dos complexos estão apresentados nos itens 4.2.5, 4.2.7 e nos subitens de 4.3.

4.2.5 Carregador

A preparação do ^{188}Re -HEDP usando o ^{188}Re eluído do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ é praticamente livre de carregador. (KNAPP et al., 1997; KNAPP, 1998; PALMEDO et al., 2000)

A presença de grande quantidade de Re como carregador pode alterar quimicamente a marcação dos complexos de Re. Assim, as condições experimentais são padronizadas para que os radiofármacos com Re possuam maiores atividades específicas.

PALMEDO et al. (2000) discutiram o uso do carregador na formulação do ^{188}Re -HEDP, incitando a importância da presença de Re estável em quantidades macroscópicas nas preparações, sobretudo como um fator decisivo em respeito às espécies químicas formadas. Nas preparações contendo carregador formam espécies com ligações Re-Re, que não podem ser constituídas ao utilizar o ^{188}Re livre de carregador.

LIN et al. (1997 e 1999) conduziram as reações de marcação com aquecimento de 100 °C e adição de carregador (vide TAB.32). Os resultados obtidos após 2 horas de incubação foram 96,2% e a estabilidade em 48 horas com 91,3% de rendimento. Maiores quantidades de carregador não melhoraram os rendimentos de complexação.

MURPHY et al. (2001) mencionaram o aumento nos rendimentos de marcação, um efeito importante em virtude do uso de carregador para a formação dos complexos ^{188}Re -ABP, outro agente para o tratamento paliativo de metástases ósseas. A eficiência de marcação atingiu cerca de 98%.

PERVEZ et al., (2003) determinaram o efeito do carregador na estabilidade do ^{188}Re marcado com EDTMP adicionando 0,1 mg de NH_4ReO_4 na mistura de reação. As preparações apresentaram uma melhor estabilidade com o uso do carregador após 6 e 24 horas de marcação, além do aumento na captação óssea *in vivo*.

VERDERA et al., (1997) citaram resultados de marcação do ^{188}Re -HEDP utilizando carregador com uma pureza radioquímica >99% e os complexos formados

apresentaram-se estáveis por até 24 horas. Ao passo que nos experimentos sem adição de carregador, os resultados obtidos foram na ordem de 90% até 6 horas de incubação.

Para avaliar o efeito da presença do carregador nas reações de radiomarcção foi estabelecida uma relação entre as condições de marcação, como: o tempo de reação, a temperatura do meio de marcação e a adição (ou não) do carregador. O preparo da solução do ligante foi realizado de acordo com o item 3.3.1. As principais variáveis que influenciaram os rendimentos finais de complexação estão nas TAB. 18, 19 e 20.

Tabela 18. Rendimentos de marcação para a FP sem adição de carregador e solução tampão.

<i>Condições: STC, Temperatura ambiente Tempo de reação: 60 minutos</i>	<i>Rendimentos de marcação (%)</i>			
	<i>Experimentos (n)</i>	<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO₄⁻</i>
74 MBq Sem carregador ^a	1	94,92	0,40	4,70
	2	94,15	0,25	5,60
	3	94,19	0,24	5,56
	4	94,72	0,58	4,70
	5	91,05	0,52	8,43
	6	92,54	0,58	4,70
	Média	93,60	0,43	5,62
	sd	1,37	0,14	1,32
	cv	1,46	33,36	23,49

Observações: ^a 20 µg de Re₂O₇, FP = fórmula padrão, STC = Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação e ND = Não determinado.

Tabela 19. Separação percentual das impurezas e ^{188}Re livre, (de acordo com os resultados da TAB. 14).

<i>Condições: STC, Temperatura ambiente Tempo de reação: 60 minutos</i>	<i>Experimentos (n)</i>	<i>Rendimentos de marcação (%)</i>					
		<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>	<i>pH 5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>
111 MBq Com Carregador ^a	1	96,93	1,65	1,42	88,84	0,98	10,17
	2	96,76	1,02	2,22	84,08	0,59	15,32
	3	92,50	1,16	6,34	76,13	1,16	22,71
	Média	95,40	1,28	3,33	83,02	0,91	16,07
	sd	2,51	0,33	2,64	6,42	0,29	6,30
	cv	2,63	25,91	79,36	7,74	32,02	39,23

Observações: ^a 20 µg de Re_2O_7 , FP = fórmula padrão, STC = Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação e ND = Não determinado.

De acordo com os resultados das tabelas 18 e 19, em relação às médias dos rendimentos de complexação das reações conduzidas em temperatura ambiente e pH 1,5 a adição do carregador na mistura de reação provocou uma pequena variação da média (+1,8%). Porém, essa pequena diferença na média não revela as quantidades de $^{188}\text{ReO}_4^-$ livres ou o total de impurezas produzidas no final da incubação da mistura.

O efeito da adição do carregador torna-se mais significativo, a partir do aquecimento das misturas de reação. O efeito da temperatura combinado com o carregador se mostrou positivo com relação à formação e estabilidade dos complexos formados. A TAB. 20 apresenta os rendimentos das misturas submetidas ao aquecimento e adição de carregador na formulação padrão.

Tabela 20. Rendimentos de marcação da FP com carregador e com aquecimento.

Condições: STC, 30 minutos 100 °C, Resfria por 60 minutos		Experimentos (n)	Rendimentos de marcação (%)					
			pH 1,5	% Impurezas	% ReO_4^-	pH 5	% Impurezas	% ReO_4^-
187 MBq Com Carregador ^a		1	98,73	1,12	0,15	98,32	1,33	0,35
		2	98,11	1,66	0,23	97,58	1,79	0,63
		3	98,61	1,31	0,08	98,38	1,33	0,29
		4	99,18	0,73	0,08	98,76	0,81	0,43
		5	99,16	0,72	0,13	98,51	1,10	0,38
		6	98,17	1,68	0,14	98,03	1,69	0,28
		Média	98,66	1,20	0,14	98,26	1,34	0,39
		sd	0,46	0,43	0,06	0,41	0,36	0,13
		cv	0,47	35,49	41,04	0,42	27,16	32,74

Observações: ^a 20 µg de Re_2O_7 , FP= Fórmula padrão, STC= Sistema *tandem* de concentração, sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação.

Os resultados obtidos com a adição do carregador evidenciam uma mudança cinética no comportamento *in vitro* dos complexos de ^{188}Re -HEDP. Essa mudança pode ser vista com a menor quantidade de $^{188}\text{ReO}_4^-$ livre presente na mistura de reação.

A combinação dos fatores, aquecimento e carregador, indicam uma importante melhora na estabilidade dos complexos depois de um volume adicional da solução tampão e ajuste do pH para 5.

4.2.6 Influência do Volume de Kit Líquido

Reduzir ou aumentar o volume do kit líquido de uma formulação padrão, significa modificar as concentrações ideais dos agentes na mistura de reação. O efeito do excesso de agentes (redutor e ligante) na mistura de reação foi verificado a partir das reações de marcação, nas quais a formulação FP foi mantida, mas o volume utilizado foi modificado em 0,5, 1 e 2 mL e além de um volume adicional de 1 mL de ^{188}Re com atividade de 111 MBq.

A FIG. 28 correlaciona os resultados dos estudos, que seguiram sem adição do carregador e com diferentes condições de marcação.

FIGURA 28. Variação do volume de agentes e condições experimentais.

Em geral, pode-se observar que o excesso de agentes contribuiu com um aumento da estabilidade dos complexos quando o volume e pH são alterados. Com 180 minutos de reação em temperatura ambiente em pH 5, a influência desse excesso de agentes resultou em:

81,66; 87,15 e 96,95% para 0,5, 1 e 2 mL de kit líquido, respectivamente.

As reações com aquecimento e 2 mL de kit líquido, apresentaram resultados similares àqueles obtidos em reações em temperatura ambiente durante 180 minutos. A variação entre esses valores foi na ordem de $1 \pm 0,5\%$.

4.2.7 Efeito da Adição de Solução Tampão

As soluções foram preparadas de acordo com o item 3.3.3 e foram nitrogenadas durante 20 minutos. Os resultados apresentados na FIG. 29 foram conseguidos com kits líquidos da FP e o pH foi medido com papel indicador. O efeito tampão ocorre após a adição de 5 mL de NaAc 0,3 mol/L e prejudica muito o rendimento final nas misturas de reação incubadas em temperatura ambiente.

FIGURA 29. Efeito do volume de solução tampão no ^{188}Re -HEDP.

A FIG. 30 mostra a mesma relação da influência do volume de solução tampão nas misturas de reação, porém, neste caso todas as misturas foram submetidas ao aquecimento e como pode ser visto, ao adicionar o carregador na formulação, os complexos ^{188}Re -HEDP passam a ter maior estabilidade, mesmo quando grandes volumes são adicionados e o efeito tampão é atingido.

FIGURA 30. Efeito da adição de solução tampão nos complexos formados com aquecimento.

HASHIMOTO (1996) verificou que sob as mesmas condições de reação, os rendimentos dos complexos ^{188}Re -HEDP foram maiores ao utilizar carregador, e notadamente os complexos formados em reações com aquecimento, formaram complexos mais estáveis observados com o ajuste de pH. Esse efeito também foi observado nos estudos do ^{188}Re -MDP.

Outros autores preconizaram que o pH afeta os rendimentos de marcação, nos quais o mesmo efeito do pH pode ser observado. (QINGNUAN et al., 2000; PERVEZ et al., 2003; KOUDELKOVA & KRÍŽOVÁ, 2003)

4.2.8 Estabilidade dos Kits Líquidos

A estabilidade das soluções do ligante foi avaliada com estudos de radiomarcação para a formação de complexos ^{188}Re -HEDP em kits líquidos preparados e mantidos em geladeira por até 19 dias.

O tempo em que as soluções foram estocadas com a conseqüente perda de eficiência de marcação estão demonstradas na FIG. 31. As marcações dos kits líquidos da FP não envolveram a adição de carregador ou aquecimento e o pH foi mantido em 1,5.

Figura 31. Perda da eficiência de marcação em função do período de estocagem do kit líquido.

Embora o meio de reação não foi aquecido, tampouco o carregador foi adicionado, os resultados da radiomarcagem apresentaram bons rendimentos. Conforme a FIG. 31, os resultados são melhores quando o tempo de incubação é maior, e ainda, indica que a formulação líquida da FP pode ser estocada por até 12 dias ($\geq 95\%$).

4.3 Kits Liofilizados

Após o preparo das soluções de ligantes, cada mL foi submetido ao processo de liofilização descrito no item 3.4.1.

A FIG. 32 mostra os frascos submetidos ao processo de liofilização com as diferentes formulações de solução do ligante e agentes estabilizantes, um com ácido gentísico e outro com ácido ascórbico.

Figura 32. Kits liofilizados, frascos da esquerda: solução do ligante com ácido gentísico e frascos da direita: solução do ligante com ácido ascórbico.

O resultado da liofilização apresentou diferenças quanto à composição da FP. Os agentes estabilizantes, o ácido ascórbico e o ácido gentísico, determinaram o aspecto físico dos produtos liofilizados. Todos os kits FP com ácido ascórbico que foram liofilizados apresentaram o aspecto de gel, sendo comum aos produtos com composição semelhante.

4.3.1 Radiomarcção

Os kits liofilizados foram avaliados com diferentes condições de radiomarcção. Os padrões de resultados observados nos kits líquidos foram mantidos nos kits liofilizados, indicando a metodologia ideal para atingir bons rendimentos de complexação.

Os resultados da TAB. 21 apresentam bons rendimentos de marcação, porém podem ser melhorados com o aumento da temperatura e uso do carregador. Os resultados das radiomarcções dos kits liofilizados com essas variáveis podem ser observados na TAB. 22.

TABELA 21. Resultados das marcações dos kits liofilizados (com ácido ascórbico) em temperatura ambiente.

<i>Condições: STC, 180 minutos, Temperatura ambiente</i>	<i>Atividade (MBq)</i>	<i>Experimentos (n)</i>	<i>Rendimento (%)</i>		
			<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO₄⁻</i>
Sem carregador ^a	117,7	1	94,49	3,04	2,48
	123,2	2	96,38	2,51	1,11
	132,5	3	96,23	1,57	2,2
	176,8	4	94,28	2,84	2,88
	235,7	5	94,73	3,56	1,71
	360,8	6	94,39	3,51	2,09
		Média	95,08	2,84	2,08
		sd	0,96	0,74	0,62
		cv	1,01	26,03	29,60

Observações: ^a 20 µL de carregador, FP = fórmula padrão, STC = Sistema Tandem de Concentração, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação.

TABELA 22. Resultados das marcações dos kits liofilizados (com ácido ascórbico) com aquecimento.

<i>Condições: STC, 30 min. 100 °C, Resfria por 60 min., Atividade 148 MBq</i>		<i>Rendimento (%)</i>			<i>Estabilidade após 6 horas do início da marcação</i>		
		<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO₄⁻</i>	<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO₄⁻</i>
Sem carregador ^a	1	98,85	1,44	0,28	96,59	1,26	2,16
	2	96,95	2,67	0,38	97,53	0,54	1,93
	3	97,53	1,95	0,52	94,19	1,14	4,68
	Média	97,78	2,02	0,39	96,10	0,98	2,92
	sd	0,97	0,62	0,12	1,72	0,39	1,53
	cv	1,00	30,59	30,65	1,79	39,36	52,19
Com carregador ^a	1	98,73	1,10	0,17			
	2	98,51	1,32	0,17			
	3	98,47	1,44	0,09		ND	
	Média	98,57	1,29	0,14			
	sd	0,14	0,17	0,05			
	cv	0,14	13,40	32,22			

Observações: ^a 20 µL de carregador, FP = fórmula padrão, STC = Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação e ND = Não determinado.

A TAB. 23 relaciona os resultados dos kits liofilizados que foram marcados com os elutos do gerador de ¹⁸⁸W / ¹⁸⁸Re nacional com base de Al₂O₃.

TABELA 23. Resultados das marcações com os eluatos do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Al_2O_3) – Nacional.

Condições: Sem STC, 30 minutos 100 °C, Resfria por 60 minutos		Experimentos (n)	Rendimento(%)				
Atividade 111 MBq	pH 1,5		% Impurezas	% ReO_4^-	pH 5	% Impurezas	% ReO_4^-
Sem carregador ^a	1	93,12	5,78	1,10	87,20	9,53	3,27
	2	92,56	6,33	1,11	93,17	2,30	4,53
	Média	92,84	6,06	1,11	90,19	5,92	3,90
	sd	0,40	0,39	0,01	4,22	5,11	0,89
	cv	0,43	6,42	0,64	4,68	86,43	22,84
Com carregador ^a	1	97,88	1,97	0,15	93,85	5,81	0,34
	2	97,80	2,12	0,08	95,75	3,92	0,33
	Média	97,84	2,05	0,12	94,80	4,87	0,34
	sd	0,06	0,11	0,05	1,34	1,34	0,01
	cv	0,06	5,19	43,04	1,42	27,47	2,11

Observações: ^a 20 µL de carregador, FP = fórmula padrão, STC = Sistema *Tandem* de Concentração, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação

4.3.2 Estabilidade dos Kits Liofilizados

A FP liofilizada com ácido ascórbico apresentou menor estabilidade. O processo de degradação foi mais acelerado e a decomposição do seu formato gelatinoso em um líquido amarelado foi observado após 3 meses, mesmo sendo conservado em temperaturas de 6 ± 2 °C.

Os kits liofilizados, com o agente estabilizante ácido gentísico, permaneceram com o mesmo aspecto físico após o longo período de conservação em geladeira (congelador), cerca de 8 meses.

A estabilidade da composição desses kits foi colocada a prova em estudos de radiomarcagem. Os kits receberam 1 mL do eluato proveniente do gerador da POLATON com atividade de 370 MBq (~10 mCi). Os rendimentos de marcação estão apresentados na TAB. 24.

TABELA 24. Rendimentos de radiomarcagem de kits liofilizados da FP com ácido gentísico após 8 meses de produção.

<i>Condições:</i>	<i>Gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ – POLATON</i>					
	<i>Rendimento da marcação (%)</i>					
	<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>	<i>pH 5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>
Após incubação						
1	98,51	1,16	0,33	95,95	2,80	1,27
2	98,76	0,97	0,27	97,44	1,77	0,79
3	98,33	1,33	0,34	96,59	2,60	0,81
Média	98,53	1,15	0,31	96,66	2,39	0,96
sd	0,22	0,18	0,04	0,75	0,55	0,27
cv	0,22	15,61	12,08	0,77	22,85	28,38
Após 24 horas do período de incubação						
1				92,12	0,18	7,67
2				92,23	0,09	7,68
3				91,62	0,30	8,08
Média				91,99	0,19	7,81
sd				0,33	0,11	0,23
cv				0,35	55,45	2,99

Observações: ^a 20 µL de carregador, sd = Desvio padrão, cv = Coeficiente de variação

4.3.3 Estabilidade dos Complexos de ^{188}Re -HEDP

4.3.3.1 Estabilidade x Atividade

A estabilidade dos kits liofilizados da FP com ácido ascórbico (recém preparados), foi avaliada pela capacidade de formação de complexos ^{188}Re -HEDP com altas atividades.

As formações de complexos em reações com atividade de 3,33 GBq (~90 mCi) apresentaram ótimos rendimentos e boa estabilidade com a adição de carregador no meio de marcação. A taxa de formação de $^{188}\text{ReO}_4^-$ (Re livre) foi mais evidente em preparações sem a adição de carregador, sendo este resultado coerente com os estudos envolvendo carregador, porém, o uso do carregador também favoreceu a recombinação dos complexos após um longo período de incubação nas formulações com o pH 5.

A FIG. 33, mostra o perfil do rendimento de marcação e as variáveis do meio de reação com carregador (C), sem carregador e após 24 horas de incubação em pH 5.

FIGURA 33. Perfil do rendimento de marcação para diferentes variáveis e atividade de 3,33 GBq.

A estabilidade encontrada nas preparações do ^{188}Re -HEDP com atividade de 1,85 GBq e variáveis idênticas apresentou um perfil do rendimento de marcação semelhante com os kits da FP liofilizados marcados com 3,33 GBq. Os resultados podem ser vistos na FIG. 34.

FIGURA 34. Perfil do rendimento de marcação para diferentes variáveis e atividade de 1,85 GBq.

4.3.3.2 Estabilidade x Tempo de Incubação

Os kits liofilizados da fórmula FP marcados com o ^{188}Re foram armazenados em temperatura ambiente e a pureza radioquímica foi analisada em intervalos de tempo (máximo de 30 horas). A TAB. 25 relaciona os resultados dos cromatogramas, todas as amostras indicaram uma ótima estabilidade dos complexos formados e também apresentaram boa reprodutibilidade. Apenas a amostra 1 foi analisada com o método de CLAE, os cromatogramas estão apresentados na FIG. 14, do item 4.6.

TABELA 25. Resultados dos cromatogramas com Whatman 01 e ITLC-SG até 30 horas de armazenamento.

<i>Condições: STC, Com carregador, 30 minutos 100 °C, Resfria 60 minutos.</i>		<i>Rendimento (%)</i>					
<i>Atividade 111 MBq</i>	<i>Tempo de armazenamento (horas)</i>	<i>pH 1,5</i>	<i>%</i>		<i>pH 5</i>	<i>%</i>	
			<i>Impurezas</i>	<i>ReO₄⁻</i>		<i>Impurezas</i>	<i>ReO₄⁻</i>
AMOSTRA 1	0	98,74	1,17	0,09	97,86	1,73	0,41
	2				98,31	0,51	1,18
	4				98,85	0,64	0,50
	6				98,71	0,57	0,72
	18				97,69	1,54	0,77
	21				98,34	0,56	1,10
	30				97,54	1,07	1,39
AMOSTRA 2	0	98,93	0,99	0,07	98,22	1,40	0,38
	2				98,36	0,89	0,75
	4				98,62	0,76	0,61
	6				98,40	0,76	0,84
	18				97,86	1,45	0,69
	21				98,47	0,58	0,94
	30				98,48	0,74	0,78
AMOSTRA 3	0	98,64	1,20	0,16	97,96	1,68	0,36
	2				98,23	0,66	1,11
	4				98,33	0,76	0,91
	6				98,59	0,36	1,05
	18				96,96	1,58	1,46
	21				98,64	0,38	0,99
	30				97,48	1,28	1,24

Observações: ^a 20 µg de carregador, FP = fórmula padrão, STC = Sistema Tandem de Concentração.

4.4 Gerador Tipo– Gel ^{188}WZr : Estudos de Radiomarcção

Mesmo com a presença do gel em suspensão no eluato e o baixo rendimento da atividade, conforme o item 4.1.3, o controle de qualidade foi o estudo da capacidade de formação de complexos ^{188}Re -HEDP com o eluato utilizado sem filtração prévia nos experimentos. A TAB. 26, mostra os resultados obtidos com a fórmula FP com diferentes agentes estabilizantes, mesmo com um eluato de qualidade inferior no qual os bons rendimentos não são esperados.

TABELA 26. Diferentes kits liofilizados marcados com o eluato do gerador tipo-gel ^{188}WZr .

Condições: STC, Sem carregador, 30 minutos 100 °C, Resfria 60 minutos		Gerador Tipo-gel ¹⁸⁸ WZr						
		Rendimento(%)						
Agente Estabilizante		pH 1,5	% Impurezas	% ReO ₄ ⁻	pH 5	% Impurezas	% ReO ₄ ⁻	
18,5 MBq	Ácido ascórbico		97,90	0,96	1,14	92,86	1,50	5,64
			97,63	0,91	1,47	95,41	0,73	3,86
		Média	97,77	0,94	1,31	94,14	1,12	4,75
		sd	0,19	0,04	0,23	1,80	0,54	1,26
	cv	0,20	3,78	17,88	1,92	48,83	26,50	
18,5 MBq	Ácido gentísico		96,93	1,04	2,04	94,99	1,19	3,82
			96,82	1,58	1,60	90,99	3,05	5,95
		Média	96,88	1,31	1,82	92,99	2,12	4,89
		sd	0,08	0,38	0,31	2,83	1,32	1,51
	cv	0,08	29,15	17,09	3,04	62,04	30,83	

Observações: ^a 20 µg de carregador, FP= fórmula padrão, STC= Sistema Tandem de Concentração

Para possibilitar a radiomarcção dos kits liofilizados com o eluato sem o gel em suspensão, a atividade da segunda eluição do gerador tipo-gel ^{188}WZr foi concentrada e purificada com o STC. Os volumes dos frascos de eluição foram concentrados em 1 mL e a atividade final foi de 119,14 MBq ($\sim 3,22$ mCi). A perda de atividade ao utilizar o STC foi de 9,3%.

Os resultados com o eluato recuperado com a qualidade e volume necessários para a radiomarcção estão apresentados na TAB. 27.

TABELA 27. Kit liofilizado (com ácido ascórbico) marcado com o eluato do gerador tipo-gel ^{188}WZr .

<i>Condições: STC, Com carregador, 30 minutos 100 °C, Resfria 60 minutos</i>	<i>Gerador Tipo-gel ^{188}WZr Rendimento(%)</i>					
	<i>pH 1,5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>	<i>pH 5</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>
Após incubação	98,37	1,55	0,08	94,29	5,54	0,17
Após 3 horas do período de incubação				99,01	0,42	0,57

Os resultados demonstram um ótimo rendimento de marcação, onde a qualidade de purificação do eluato contribuiu com um resultado superior a 98% (pH 1,5). O resultado da marcação sugere que existe um rearranjo dos complexos formados em pH 5, somente após um longo período de incubação, o rendimento foi recuperado e esse efeito foi demonstrado nos estudos da radiomarcção com os eluatos dos geradores $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ com base de Al_2O_3 .

4.5 Cromatografia de Troca Iônica – CI

4.5.1 Trocadores com Matriz de Dextrano

As primeiras experiências com a coluna de troca iônica Sephadex analisaram o comportamento do complexo marcado e do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$. A separação dos compostos com a coluna Sephadex pode ser previamente vista com a FIG. 35.

Na eluição do complexo, cerca de 94,8% da atividade total eluída fica entre o 1º - 10º mL. Já no caso do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$, a atividade se concentra principalmente entre o 11º até o 20º mL e totaliza 99,8% da atividade total eluída.

FIGURA 35. Curva de eluição do ^{188}Re -HEDP (pH 1,5) e do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$.

As curvas de eluição foram obtidas com 50 mL de NaCl 0,9% e as amostras foram eluídas com o fluxo de 1 mL/min, coletando-se o volume de 1 mL para as contagens no GeHP.

Dessa forma, a tabela 28 relaciona os resultados obtidos com diferentes métodos quantitativos para os rendimentos de marcação do ^{188}Re -HEDP, realizados com CP, CCD e Sephadex G-25.

TABELA 28. Rendimentos de marcação obtidos com cromatogramas de Whatman 01 e ITLC-SG e Sephadex G-25

<i>Experimentos (n)</i>	<i>EM (%)</i>	<i>R (%)</i>	<i>R_{Área} (%)</i>	<i>Contagens (%)</i>
1	97,73	96,53	97,29	98,12
2	98,51	96,86	97,04	97,42
3	98,47	97,31	98,00	98,25
4	98,87	94,62	97,92	97,71
5	96,38	95,31	95,93	95,98
6	97,95	95,04	97,57	98,85
7	97,90	96,41	97,38	97,94
8	98,11	96,23	ND	ND
9	98,03	96,97	ND	ND
10	97,50	95,22	ND	ND
<i>Média</i>	<i>97,95</i>	<i>96,05</i>	<i>97,30</i>	<i>97,75</i>
sd	0,68	0,93	0,70	0,90
cv	0,70	0,97	0,71	0,92

sd = Desvio padrão , cv = Coeficiente de variação

Os resultados correspondentes a coluna denominada EM(%) são os percentuais de eficiência de marcação a partir das cromatografias com suportes de papel e ITLC-SG. Já para os rendimentos expressos como $R(\%)$, $R_{\text{Área}}(\%)$ e *Contagens*, são os percentuais de rendimento a partir do cálculo pela atividade descritos no item 3.7.3.1.1, quantificados pela análise dos 10 primeiros mililitros eluídos pela coluna de Sephadex G-25.

Um detalhe importante, é a adição da solução tampão acetato de sódio 0,3 M e o comportamento de eluição dos complexos formados em pH 5.

Na FIG. 36, praticamente toda a atividade percentual calculada pela área do pico com energia de 155 keV obtidos com a medição no GeHP dos 10 primeiros mL, mostra que o deslocamento pela coluna Sephadex não se altera, indicando o mesmo comportamento iônico para a faixa de pH entre 1,5 até 5. Outros estudos ajustando o pH acima de 5 não foram realizados.

FIGURA 36. Perfil de eluição pela coluna Sephadex G-25 ¹⁸⁸Re-HEDP com pH 5.

O comportamento observado dos complexos de HEDP marcados com ¹⁸⁸Re nas colunas Sephadex G-25, apresenta similaridade ao comportamento do HEDP marcado com ¹⁵³Sm, visto que nos estudos de GASIGLIA (2000), as atividades percentuais dos complexos formados com ¹⁵³Sm também se concentram entre o 1º -10º mL da solução NaCl 0,9% eluídos pela coluna de Sephadex C-25.

4.5.2 Trocador Orgânico Sintético – QMA

Os primeiros resultados da radiomarcção do HEDP e o seu comportamento no trocador QMA foram demonstrados com ^{99m}Tc , pois não havia atividade suficiente de ^{188}Re dos geradores com base de Al_2O_3 (ORNL e Nacionais) e tampouco haveria cartuchos para a concentração do ^{188}Re nesses testes preliminares até o domínio da técnica. Outra razão dos estudos do comportamento da separação com o QMA do ^{99m}Tc -HEDP, foi o recebimento do gerador POLATON posterior a data dos experimentos. Nas FIG. 37 e 38, estão demonstrados os resultados da separação dos produtos ^{99m}Tc -HEDP.

FIGURA 37. Resultados da separação do ^{99m}Tc -HEDP de kits líquidos da FP.

Com base na distribuição da atividade entre as frações eluídas de NaCl 0,3 mol/L, a principal porção de complexos marcados foi retirada no primeiro mL do solvente. A TAB. 29 mostra os resultados em cada etapa do procedimento de purificação com o QMA. Com base nos resultados da EM(%) ficou demonstrada a purificação dos complexos de ^{99m}Tc -HEDP preparados de acordo com o item 3.7.4.1.2.

TABELA 29. Resultados dos rendimentos de marcação do ^{99m}Tc -HEDP (kit líquido) antes e depois do QMA.

<i>frasco 1</i>	<i>EM (%)</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% TcO_4^-</i>
Após marcação	57,93	41,89	0,18
Diluído (20 mL)	93,87	5,81	0,32
1º ml	94,61	5,30	0,09
<i>frasco 2</i>			
Após marcação	53,66	46,21	0,13
Diluído (20 mL)	95,65	4,00	0,35
1º ml	95,98	3,92	0,10
<i>frasco 3</i>			
Após marcação	78,36	21,43	0,21
Diluído (20 mL)	93,59	6,18	0,23
1º ml	95,28	4,62	0,10

O mesmo efeito de separação ocorre com a radiomarcação e purificação dos complexos preparados a partir de kits liofilizados. A TAB. 30 mostra os resultados dos rendimentos de marcação em cada etapa do procedimento de purificação dos complexos preparados com kits da FP liofilizada.

FIGURA 38. Resultados da separação do ^{99m}Tc -HEDP de kits liofilizados da FP.

Tabela 30. Resultados dos rendimentos de marcação do ^{99m}Tc -HEDP (kit liofilizado) antes e depois do QMA.

<i>frasco 1</i>	<i>EM (%)</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% TcO_4^-</i>
Após marcação	96,31	3,66	0,03
Diluído (20 mL)	94,44	5,35	0,21
1º ml	93,92	5,97	0,11
<i>frasco 2</i>			
Após marcação	97,18	2,73	0,09
Diluído (20 mL)	94,37	4,96	0,67
1º ml	92,87	6,98	0,15
<i>frasco 3</i>			
Após marcação	95,64	4,21	0,15
Diluído (20 mL)	94,02	4,96	1,02
1º ml	92,12	7,67	0,21

No segundo experimento, com os kits liofilizados, não ficou demonstrada a purificação dos complexos de ^{99m}Tc -HEDP. Em consequência do procedimento, foi observado um aumento na quantidade de impurezas (%).

Dessa forma, o procedimento de radiomarcação do HEDP com ^{188}Re , a partir de kits líquidos deveria apresentar um perfil de distribuição da atividade semelhante aos resultados do ^{99m}Tc -HEDP com kits líquidos.

Seguindo a segunda etapa do procedimento de LISIC et al. (2001), a radiomarcação do ^{188}Re -HEDP foi feita em um frasco com o volume final suficiente para 3 kits líquidos da FP. O perfil de distribuição se mostrou um pouco semelhante aos resultados de referência, a diferença encontrada foi a separação da maior porção da atividade nas frações de 7-9 mL.

No trabalho de LISIC et al. (2001), a apresentação dos resultados da purificação faz menção sobre a primeira fração eluída do QMA como Re livre (~4%) e que 65% do produto é recuperado nas frações de 3-6 mL de solvente, com uma pureza radioquímica (em CP) >96%. A FIG. 39 mostra o perfil da separação com o QMA dos complexos de ^{188}Re -HEDP.

FIGURA 39. Resultados da separação com o QMA do $^{188}\text{Re-HEDP}$ (kit líquido).

A partir das separações, os produtos foram avaliados com CP e CCD para determinação da pureza radioquímica. Os resultados apresentaram uma grande diferença quanto à pureza dos complexos e podem ser observados na TAB. 31. O processo de separação com o QMA pouco contribuiu para a purificação dos complexos marcados, principalmente pela forte retenção do $^{188}\text{Re-HEDP}$, em contradição aos resultados de LISIC et al.(2001). As atividades calculadas (nas frações recuperadas) também apresentaram uma diferença significativa, quando confrontadas com a referência.

TABELA 31. Resultados dos rendimentos de marcação do $^{188}\text{Re-HEDP}$ (kit líquido) antes e depois do QMA.

<i>frasco 1</i>	<i>EM (%)</i>	<i>% Impurezas</i>	<i>% ReO_4^-</i>	<i>Atividade</i>
Após a marcação	97,62	2,06	0,32	100%
Diluído (20 mL)	95,43	4,12	0,45	
1º mL	98,31	1,17	0,52	6 %
7-9 mL	78,73	18,55	2,72	40%

Os resultados de controle de qualidade utilizando o QMA para a separação das espécies quando comparados ao experimento de referência (KNAPP et al., 1997; PALMEDO et al., 2000), apresentaram uma grande similaridade. O perfil da separação das espécies foi comparável ao perfil da referência embora as concentrações da solução para a lavagem do QMA e diluição do produto marcado, e a própria quantidade de amostra diluída foram modificados.

PALMEDO et al.(2000) conduziram os experimentos com um pequeno volume de amostra (0,01 mL) dissolvido em 2 mL de uma solução, cuja concentração foi a mesma dos agentes ligantes do kit marcado sob um fator de 10. Seguindo o mesmo princípio, uma solução foi preparada para a lavagem do QMA e diluição do produto, na qual a concentração final foi de 3 mg de HEDP/ mL de H₂O destilada e 0,5 mg de ácido ascórbico/ mL de H₂O destilada.

A FIG. 40 apresenta os resultados da referência com os trabalhos conduzidos no IPEN. A legenda mostra que nos estudos de PALMEDO et al. (2000), além dos produtos preparados com kits liofilizados para testes de laboratório, também foram marcados os kits comerciais da Mallinkrodt, e todas as frações eluídas pelo QMA apresentaram o mesmo perfil, inclusive o HEDP marcado no IPEN com o ¹⁸⁸Re do gerador da POLATON.

(0,4 mL de ¹⁸⁸Re-HEDP/ 10 mL da solução HEDP + ác. ascórbico)

FIGURA 40. Comparação dos perfis de eluição dos complexos de ^{188/186}Re-HEDP com um gradiente de eluição e aumento da força iônica da solução.

A FIG 41. mostra o comportamento da eluição dos produtos marcados pelo cartucho de QMA, condicionada com a solução de HEDP e ácido ascórbico em uma concentração 10 vezes maior. O comportamento das espécies aniônicas foi diferenciado quando a concentração do solvente de eluição por gradiente atingiu 0,2 mol/L.

FIGURA 41. Comparação dos perfis de eluição dos complexos de $^{188/186}\text{Re}$ -HEDP com o ^{188}Re -HEDP (IPEN) sem diluição prévia.

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Para identificar o tempo de retenção do ^{188}Re livre, não encontrado em nenhuma referência estudada, foi feito um estudo utilizando o $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ não reduzido com um tempo de corrida de 40 minutos. Os resultados das amostras, coletadas em frações correspondentes a 10 minutos de corrida, mostraram que o Re livre é eluído totalmente entre 30 – 40 minutos.

Os resultados da eluição do ^{188}Re -HEDP pela CLAE com o sistema de solvente descritos no item 3.7.4., podem ser analisados pela corrida de 40 minutos, com a atividade de cada fração (de 1 mL coletado) representada pela área do pico característico de 155 keV do ^{188}Re , contados no detector de GeHP. Praticamente toda a fração dos complexos marcados foi eluída nos primeiros 4 minutos de corrida.

FIGURA 42. Eluição do ^{188}Re -HEDP pela coluna de CLAE C-18.

Os espectros do ^{188}Re -HEDP foram obtidos com a detecção em UV-visível com $\lambda = 268$ nm relacionado à molécula de HEDP. O tempo de retenção foi determinado a partir do kit liofilizado, reconstituído apenas com NaCl 0,9%, como um padrão com a mesma concentração de agentes ligantes. Os kits radiomarcados apresentaram cromatogramas que variaram com a quantidade de amostra injetada (20 ou 60 μL), os resultados podem ser analisados nas FIG. 43, 44 e 45.

Além do detector de UV-vis, um radiocromatógrafo foi utilizado para confirmar os picos correspondentes do ^{188}Re -HEDP durante a separação por CLAE. A FIG. 43 apresenta a separação dos produtos com pH 1,5 e a FIG. 44 com o pH 5.

FIGURA 43 . Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH final 1,5.

A FIG. 44 apresenta os cromatogramas do ^{188}Re -HEDP eluídos no final do tempo de incubação dos complexos com aquecimento. Esse estudo preliminar à análise das amostras incubadas pelo período máximo de 30 horas (pH 5), foi importante para verificar as espécies no final do tempo de marcação padrão, sendo possível determinar a degradação dos complexos ou outras formas de rearranjo do metal-ligante.

FIGURA 44 . Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH 5 – logo após a marcação.

Com os resultados dos cromatogramas da FIG. 45, foram confirmados os bons rendimentos de marcação no estudo da estabilidade dos kits liofilizados em função do tempo de incubação do item 4.3.3.2, com a pureza radioquímica sempre superior a 97%. Nos cromatogramas não houve a ocorrência de outros picos que demonstrassem a degradação ou outros complexos formados.

FIGURA 45 . Cromatogramas CLAE do ^{188}Re -HEDP com pH 5 – após 30 horas do início da marcação.

TABELA 32. Relação das variáveis de marcação dos principais autores estudados.

<i>AUTORES</i> <i>VARIÁVEIS</i>	VERDERA et al., 1997	KNAPP (RUSS) et al., 1997	LIN W-Y, et al., 1997	HASHIMOTO, 1998	PALMEDO et al., 2000	EL-MABHOUH & MERCER, 2004	KORSAK et al., 2006
<i>HEDP (mg)</i>	10	16,6	15	20	8,3	5	5
<i>Agente Estabilizante (mg)</i>	3 (ác. gentísico)	6 (ác. gentísico)	4,0 (ác. gentísico)	2,9 (ác. ascórbico)	3,0 (ác. gentísico)	0,5 mL D-Gluconato de sódio 0,5 mol/L	2,9 (ác. ascórbico)
<i>SnCl₂.2H₂O (mg)</i>	3,7	7,7	4,5	2,9	3,9	4,0	4,9
<i>Tipo de Kit</i>	Liofilizado	Líquido	Liofilizado	Líquido	Liofilizado	Liofilizado	Liofilizado
<i>Carregador</i>	0,3 mg de KReO ₄	0,01 mg de HReO ₄	0,01-0,1 mg NH ₄ ReO ₄	Livre de carregador	1 µmol/mL de HReO ₄	0, 1 mg de HReO ₄	0,5 mg de KReO ₄
<i>Volume do Eluato (mL)</i>	1	1	1	NI	1	0,1-0,2	2
<i>Tipo do Gerador</i>	Al ₂ O ₃ (ORNL)	Al ₂ O ₃ (ORNL)	Al ₂ O ₃ ¹⁸⁸ W importado (ORNL)	Al ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ (ORNL)	Al ₂ O ₃ (ORNL)	Al ₂ O ₃ (POLATON)
<i>Atividade (MBq ou GBq)</i>	(185 –740 MBq)	1295 MBq	55,5-92,5 MBq	NI	1,3- 4,4 GBq	2 MBq	250 MBq –3,66 GBq

CONTINUAÇÃO DA TABELA 32. Relação das variáveis de marcação dos principais autores estudados.

AUTORES VARIÁVEIS	VERDERA et al., 1997	KNAPP (RUSS) et al., 1997	LIN W-Y, et al., 1997	HASHIMOTO, 1998	PALMEDO et al., 2000	EL-MABHOUH & MERCER, 2004	KORSAK et al., 2006
<i>Temperatura (°C)</i>	100	96-100	100	100	90-100	90	95-100
<i>Tempo de reação (minutos)</i>	10	20	15	30	15	180	15
<i>Tempo de Resfriamento</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Solução Tampão</i>	2 mL NaAc 0,3 mol/L.	2 mL NaAc 0,3 mol/L.	1 mL NaAc.	0,5 mL (NaAc ou NaOH).	1 mL NaAc 0,3 mol/L e 0,01 µL NaOH).	NaOH 0,2 mol/L	2 mL NaAc 0,3 mol/L. com 30% de NaOH
<i>pH final da reação</i>	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	6,5-7	5-6
<i>CQ</i>	What. 1M/ acetona What. 3MM/ HEDP 0,01 mol/L e NaCl 0,9%	ITLC-SG NaCl 0,9% / acetona Eluição por gradiente (QMA)	ITLC / acetona	TLC / acetona ou etilcetona What. 1M/ NaCl 0,9%	ITLC-SG NaCl 0,9% / acetona Eluição por gradiente (QMA)	ITLC-SG: NaCl 0,9% / acetona	ITLC-SG / NaCl 0,9% What. 1M/ acetona
<i>Rendimento</i>	99,5 ± 5%	NI	96%	>95%	>95%	≥92%	>99%

NI= não informado., What. = Whatmann,

4.7 Distribuição Biológica do ^{188}Re -HEDP

A distribuição biológica e a estabilidade *in vivo* do ^{188}Re -HEDP com carregador e sem carregador demonstram grandes diferenças, em particular, somente os compostos com adição de carregador se acumulam em alta porcentagem no tecido ósseo. (PPALMEDO et al., 2000).

HSIEH et al. (1999) mostraram o rendimento *in vitro* do ^{188}Re -HEDP >90% (com ou sem carregador). Porém, com 10^{-4} mol/L de NH_4ReO_4 , a relação da captação óssea para tecidos moles passou de 0,89 (sem carregador) para 25,06 (com carregador).

LIN et al. (1999) otimizaram os estudos de biodistribuição a partir da adição de 10^{-4} mol/L de carregador e os estudos de cintilografia óssea mostraram uma ótima captação do ^{188}Re -HEDP, quando comparados aos estudos sem adição de carregador.

VERDERA et al. (1997) estudaram a biodistribuição do ^{188}Re -HEDP com carregador, demonstrando uma rápida captação óssea e depuração sangüínea dos produtos.

4.7.1 Aquisição de Imagens Cintilográficas

Os complexos de ^{188}Re -HEDP foram preparados com kits liofilizados com atividade de 370 MBq. As imagens foram adquiridas em gama-câmera com 3 e 24 horas da injeção (FIG. 46 e 47). Os animais 1, 2 e 3 foram sacrificados com uretana depois de 24 horas, exceto o animal 4 que não sobreviveu para a contagem de 24 horas. Para calcular a porcentagem da atividade injetada através das contagens da gama-câmera, o volume de injeção foi colocado em um recipiente como um simulador de dose.

Como todo *BF* para a cintilografia óssea, o ^{188}Re -HEDP é excretado principalmente pelo sistema renal. Nos estudos de LIN et al. (1997), após 1 hora da injeção dos complexos a atividade excretada foi de 46%. Cerca de 51% foi excretado após 4 horas de injeção e 60% em 24 horas.

Os produtos radiomarcados neste trabalho apresentaram resultados parcialmente semelhantes com os experimentos de LIN et al. (1997). Os produtos aparentemente apresentaram melhor estabilidade *in vivo* após 24 horas. De acordo com os

resultados, após 3 horas da injeção, a taxa de excreção foi de 45% (ácido gentísico, n=2) e 44 % (ácido ascórbico, n=2) e depois de 24 horas foi de 45% (ácido gentísico, n=1) e 42,6 % (ácido ascórbico, n= 2).

Animal 1

Animal 2

(*) Dificuldade de injeção do radiofármaco na veia caudal.

Legenda:

(1, 1' e 2, 2') – Imagens após 3 horas de injeção;

(A, A' e B, B') – Imagens após 24 horas de injeção;

Figura 46. Animal 1 e 2 com o produto injetado – ^{188}Re -HEDP, preparado com kit liofilizado com ácido ascórbico.

Legenda:
(3, 3') – Imagens após 3 horas de injeção;
(C, C') – Imagens após 24 horas de injeção;

Figura 47. Animal 3 com o produto injetado – ^{188}Re -HEDP, preparado com kit liofilizado com ácido gentísico.

Os resultados também sugerem que todo produto não captado pelos ossos nas primeiras 3 horas, foi rapidamente excretado pela urina. Após 24 horas os produtos demonstraram boa estabilidade e reprodutibilidade, permanecendo ligados no tecido ósseo, de acordo com a aquisição das imagens com boa visualização do esqueleto.

5. CONCLUSÃO

O objetivo foi alcançado com o amplo estudo das variáveis na formação dos complexos de ^{188}Re -HEDP. Os resultados indicaram uma formulação com excelente eficiência de marcação e estabilidade, tanto em kits líquidos como liofilizados. Em razão dos estudos, chegou-se a uma formulação padrão com bons resultados de pureza radioquímica e com boa estabilidade *in vitro* e *in vivo*.

A metodologia de preparo da formulação antes do processo de liofilização descrito por KNAPP et al. (1997) foi muito simples e prática, de modo que a melhor formulação continha as concentrações de ligantes com: 7 mg de SnCl_2 , 30 mg de HEDP, 3 mg de ácido ascórbico e adição de 20 μg de Re_2O_7 . As condições laboratoriais foram: aquecimento de 100 °C durante 30 minutos, seguidos de 60 minutos de incubação.

A marcação do ^{188}Re -HEDP se tornou um padrão para a avaliação da qualidade dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. A boa qualidade do ^{188}Re eluído ficou comprovada nos geradores importados, e o mais importante, nos geradores nacionais preparados com Al_2O_3 e o gel ^{188}WZr . No próprio *Report* - CRP (2006) da IAEA o HEDP foi considerado um parâmetro de avaliação para a qualidade dos eluatos dos geradores $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.

Os vários métodos de determinação da pureza radioquímica no controle de qualidade, apresentaram coerência com os resultados de referência. A única exceção foi o uso do QMA como método de purificação, proposto por LISIC et al. (2001), com resultados não satisfatórios. Em contraste, o uso do QMA para verificar as espécies aniônicas do ^{188}Re -HEDP apresentou conformidade com os resultados do método proposto por PALMEDO et al., (2000).

O objetivo acadêmico foi alcançado, a fisicoquímica do ^{188}Re e os procedimentos de radiomarkação foram conhecidos. Ao mesmo tempo, estabeleceu-se o procedimento de preparo deste radioisótopo com fins terapêuticos, que pode criar o interesse na classe médica de medicina nuclear brasileira.

Independente do radiofármaco estudado a base química das reações envolvendo o ^{188}Re são diferentes em relação ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e merecem este estudo aprofundado.

A metodologia de preparo do gerador tipo-gel de ^{188}WZr precisa ser revisada para atividades maiores e neste trabalho só não foram repetidas por falta de material ($\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$).

Os trabalhos futuros:

Envolvem a continuidade no desenvolvimento dos geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, sob a coordenação técnica da *IAEA*, e ainda, podem incitar a produção de produtos marcados com ^{188}Re , pelo Centro de Radiofarmácia caso houver o interesse pela classe médica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATKINS, H.P. Overview of nuclides for bone pain palliation. **Appl. Rad. Isot.**, v. 49, n. 4, p. 277-283, 1998.
- [2] BANERJEE, S.; CHAKRABORTY, S.; DAS T.; KOTHARI, K.; SAMUEL, G.; VENKATESH, M.; PILLAI, M. R. A. ^{177}Lu -DOTMP, ^{153}Sm -DOTMP, ^{175}Yb -EDTMP and $^{186/188}\text{Re}$ -CTMP: Novel agents for bone pain palliation and their comparison with ^{153}Sm -EDTMP. **World J. Nucl. Med.**, v. 3, n. 1, p. 22-37, 2004.
- [3] BANERJEE, S.; SAMUEL, G.; KOTHARI, K.; UNNI, P. R.; SARMA, H. D.; PILLAI, M. R. A. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{186}Re complexes of tetrakisphosphonate ligands and their biodistribution pattern in animal models. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28: p. 205-213, 2001.
- [4] BOSCHI, A.; BOLZATI, C.; UCCELLI, L.; DUATTI, A. High-yield synthesis of the terminal $^{188}\text{Re}\equiv\text{N}$ multiple bond from generator-produced $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$. **Nucl. Med. Biol.**, v. 30, p. 381-387, 2003.
- [5] BOSCHI, A.; UCCELLI, L.; DUATTI, A.; COLAMUSSI, P.; CITTANTI, C.; FILICE, A.; ROSE, A. H.; MARTINDALE, A. A.; CLARINGBOLD, P. G.; KEARNEY, D.; GALEOTTI, R.; TURNER, H. J.; GIGANTI, M. A kit formulation for the preparation of ^{188}Re -lipiodol: preclinical studies and preliminary therapeutic evaluation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. **Nucl. Med. Comm.**, v. 25, n. 7, p. 691-699, 2004.
- [6] BRAND, J. A. G. M. V. D.; DAS, H. A.; DEKKER, B. G.; LIGNY, C. L. D. The influence of experimental conditions on the formation of various $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})\text{EHDP}$ complexes. **Appl. Rad. Isot.**, v. 33, p. 39-45, 1982.
- [7] BRODSKAYA, G. A.; GAPUROVA, O. U. Development of a high-activity ^{188}W - ^{188}Re generator. **Radiokhimiya**, v. 35, n. 3, p. 92-97, 1993.
- [8] CASTRO, L.F.; SILVA, A.T.A.; CHUNG, M-C.; FERREIRA, A.G.; FERREIRA, E.I.; Bisfosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 3, p. 456-460, 2004.

- [9] CHEN, F. D.; HSIEH, B. T.; WANG, H. E.; OU, Y. H.; YANG, W. K.; PENG, J. W.; LIU, R. S.; KNAPP Jr, F. F. R.; TING, G.; YEN, S. H. Efficacy of Re-188-labelled sulphur colloid on prolongation of survival time in melanoma-bearing animals. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 835-844, 2001.
- [10] CHEN, J.; GIBLIN, M. F.; WANG, N.; JURISSON, S. S.; QUINN, T. P. In vivo evaluation of $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -labeled linear alpha-melanocyte stimulating hormone analogs for specific melanoma targeting. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 687-693, 1999.
- [11] COLEMAN, R.E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. **Canc. Treat. Rev.**, v. 27, p. 165-176, 2001.
- [12] COLEMAN, R.E. The role of bone markers in metastatic bone disease. **Canc. Treat. Rev.**, v. 32, n. 1, p. 1-2, 2006.
- [13] COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6 ed., Campinas, SP: Unicamp, 1995.
- [14] COOK, G.J.R.; FOGELMAN, I. The role of nuclear medicine in monitoring treatment in skeletal malignancy. **Semin. Nucl. Med.**, v. XXXI, n. 3, p. 206-211, 2001.
- [15] DADACHOV, M.S.; SO, L.V.; LAMBRECHT, R.M.; DADACHOVA, E. Development of a titanium tungstate-based $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ gel generator using tungsten of natural isotopic abundance. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 57, p. 641-646, 2002.
- [16] DADACHOVA, E.; SMITH, S. V.; MIRZADEH, S. Eletrolytic Reduction of Carrier-free ^{188}Re . **Appl. Rad. Isot.**, v. 47, n. 3, p. 289-292, 1996.
- [17] DE GROOT, G.J.; DAS, H.A.; LIGNY, C.L. The effect of the reduction method on the composition of ^{99m}Tc -EHDP complexes. **Appl. Rad. Isot.**, v. 38, n. 8, p. 611-614, 1987.
- [18] DE GROOT, G.J.; DAS, H.A.; LIGNY, C.L. The separation of $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})\text{EHDP}$ complexes by HPLC and GPC. **Appl. Rad. Isot.**, v. 37, n. 1, p. 23-27, 1986.
- [19] DECRISTOFORO, C.; OBENDORF, D.; REICHART, E.; STUBAUER, G.; RICCABONA, G. Determination of Sn(II) in technetium cold kits by voltammetry at the hanging mercury drop electrode (HMDE) and relevant radiopharmaceutical applications. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 675-683, 1998.

- [20] DEUTSCH, E.; LIBSON, K.; VANDERHEYDEN, J-L.; KETRING, A.R.; MAXON, H.R.; The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. **Nucl. Med. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 465-477, 1986.
- [21] DONDI, M.; ANDREO, P. Developing nuclear medicine in developing countries: IAEA's possible mission. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 33, p. 514-515, 2006.
- [22] DU, J.; MARQUEZ, M.; HILTUNEN, J.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A. R. Radiolabeling of dextran with rhenium-188. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 53, p. 443-448, 2000.
- [23] EISENHUT, M. Preparation of ^{186}Re -perrhenate for nuclear medical purposes. **Appl. Rad. Isot.**, v. 33, p. 99-103, 1982.
- [24] ESCOBAR, I. N. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with rhenium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors – a review of radiolabeling characteristics, quality control and in vitro stability studies. **Appl. Rad. Isot.**, v. 54, p. 399-406, 2001.
- [25] FAINTUCH, B. L.; FAINTUCH, S.; MURAMOTO, E. Complexation of ^{188}Re -phosphonates: in vitro and in vivo studies. **Radiochim. Acta**, v. 91, p. 1-6, 2003.
- [26] FINLAY, L.G; MASON, M.D.; SHELLEY, M. Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: a systematic review. **Lancet oncol.**, v. 6, p. 392-400. 2005.
- [27] FULFARO, F., CASUCCIO, A.; TICOZZI, C.; RIPAMONTI, C. The role of bisphosphonates in the treatment of painful metastatic bone disease: a review of phase III trials. **Pain**, v. 78, p. 157-169, 1998.
- [28] GARIN, E.; NOIRET, N.; MALBERT, C.; LEPAREUR, N.; ROUCOUX, A.; MAUGENDRE-C., S.; MOISAN, A.; LECLOIREC, J.; HERRY, J. Y.; BOURGUET, P. Development and biodistribution of ^{188}Re -SSS lipiodol following injection into the hepatic artery of healthy pigs. **Eur. J. Nucl. Med. Molec. Imag.**, v. 31, n. 4, p. 542-546, 2003.

- [29] GASIGLIA, H.T.; **Estudos sobre a formação do complexo ^{153}Sm com o EDTMP (Ácido Etilidenodiaminotetrametileno-Fosfônico) e dos complexos do ^{153}Sm com outros fosfonatos, em temperatura ambiente.** 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- [30] GUEDES, A.P.; CARDOSO, V.N.; DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; MATOS, V.C.; SILVA, J.C.F.; BEZERRA, R.J.A.C.; DE ARAUJO, A.C. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 915-921, 2006.
- [31] GUHLKE, S.; SHAFFLAND, A.; ZAMORA, P. O.; SARTOR, J.; DIEKMANN, D.; BENDER, H.; KNAPP, F. F.; BIRSACK, H.-J. ^{188}Re and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 as prosthetic groups for labeling amines and peptides: approaches with pre- and postconjugate labeling. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 621-631, 1998.
- [32] HAFELI, U. O.; ROBERTS, W. K.; PAUER, G. J.; KRAEFT, S.-K.; MACKLIS, R. M. Stability of biodegradable radioactive rhenium (^{186}Re and ^{188}Re) microspheres after neutron-activation. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 54, p. 869-879, 2001.
- [33] HAFELI, U.; PAUER, G.; FAILING, S.; TAPOLSKY, G. Radiolabeling of magnetic particles with rhenium-188 for cancer therapy. **J. Magnet. Mag. Mat.**, v. 225, p. 73-78, 2001.
- [34] HASHIMOTO, K. Labelling of aminomethylenephosphonate derivatives with generator-produced ^{188}Re , and a study of their stability. **Appl. Rad. Isot.**, v. 51: p. 307-313, 1999.
- [35] HASHIMOTO, K. Synthesis of a ^{188}Re -HEDP complex using carrier-free ^{188}Re , and a study of its stability. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 49, n. 4, p. 351-356, 1998.
- [36] HASHIMOTO, K.; BAGIAWATI, S.; IZUMO, M.; KOBAYASHI, K. Synthesis of ^{188}Re -MDP complex using carrier-free ^{188}Re . **Appl. Radiat. Isot.**, v. 47, n. 2, p. 195-199, 1996.
- [37] HILES, R. A. Absorption, distribution, and excretion on inorganic tin in rats. **Toxicol. App. Pharmacol.**, v. 27, p. 366-379, 1974.

- [38] HSIEH, B.-T., HSIEH, J.-F.; TSAI, S.-C.; LIN, W.-Y.; WANG, S.-J.; TING, G. Comparison of various rhenium-188-labeled diphosphonates for the treatment of bone metastases. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 973-976, 1999.
- [39] JEONG, J. M.; LEE, Y. J.; KIM, E.-H.; CHANG, Y. S.; KIM, Y. J.; SON, M.; LEE, D. S.; CHUNG, J.-K.; LEE, M. C. Preparation of ^{188}Re -labeled paper for treating skin cancer. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 58, p. 551-555, 2003.
- [40] KAMIOKI, H.; MIRZADEH, S.; LAMBRECHT, R. M.; KNAPP Jr, F. F. R.; DADACHOVA, K. ^{188}W - ^{188}Re generator for biomedical applications. **Radiochimica A.**, v. 65, p. 39-46, 1994.
- [41] KNAPP Jr, F. F. R. Rhenium-188 – a generator – derived radioisotope for cancer therapy. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 13, n. 5, p. 337-349, 1998.
- [42] KNAPP Jr, F. F. R.; BEETS, A. L.; GUHLKE, S.; ZAMORA, P. O.; BENDER, H.; PALMEDO, H.; BIRSACK, H.-J. Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment. **Anticancer Res.**, v. 17, p. 1783-1796, 1997.
- [43] KNAPP Jr, F. F. R.; MIRZADEH, S. The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 20, n. 12, p. 1151-1165, 1994.
- [44] KNAPP Jr, F.F.R.; BRIHAYE, C.; CALLAHAN, A.P. Generators. In: WAGNER, H.N.; SZALV, Z.; BUCHANAN, J.W. **Principles of Nuclear Medicine**, Saunders, 2 ed., 1995, p. 150-164.
- [45] KNAPP Jr, F.F.R.; CALLAHAN, A.P.; BEETS, A.L.; MIRZADEH, S.; HSIEH, B.T.; Processing of reactor-produced ^{188}W for fabrication of clinical scale alumina-based $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 45, n. 12, p. 1123-1128, 1994.
- [46] KNAPP Jr., F. F. R.; MIRZADEH, S.; BEETS, A. L.; DU, M. Production of therapeutic radioisotopes in the ORNL high flux isotope reactor (HFIR) for applications in nuclear medicine, oncology and interventional cardiology. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 263, n. 2, p. 503-509, 2005.

- [47] KORSACK, A.; MIKOLAJCZAK, R.; ZUCHLINSKA, M.; PAWLAK, D.; KONIOR, M.; ZELEK, Z. ^{188}Re -HEDP: pharmaceutical kit formulation and optimization of labeling procedure. **Quarterly J. Nucl. Med. Molec. Imag.**, v. 50, n. 1, p. 49-50, 2006.
- [48] KOTHARI, K.; PILLAI, M.R.A.; UNNI, P.R.; SHIMPI, H.H.; NORONHA, O.P.D.; SAMUEL, A.M.; Preparation, stability studies and pharmacological behavior of [^{186}Re] Re-HEDP. **Appl. Rad. Isot.**, 51: 51-58, 1999.
- [49] KOTHARI, K.; SAMUEL, G.; BANERJEE, S.; UNNI, P. R.; SARMA, H. D.; CHAUDHARI, P. R.; UNNIKRISHNAN, T. P.; PILLAI, M. R. A. ^{186}Re -1,4,8,11-tetraaza cyclotetradecyl-1,4,8,11-tetramethylene phosphonic acid: a novel agent for possible use in metastatic bone-pain palliation. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 709-717, 2001.
- [50] KOTHARI, L.; SURESH, S.; SARMA, H. D.; MEERA, V.; PILLAI, M. R. A. ^{188}Re -labeled hydroxyapatite particles for radiation synovectomy. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 58, p. 463-468, 2003.
- [51] KOUDELKOVA, M.; KRIZOVA, V. J. Capillary electrophoretic and thin-layer chromatographic characterization of rhenium complexation with 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid. **J. Chromatog. A.**, v. 990, p. 317-323, 2003.
- [52] KOUDELKOVA, M.K.; KONIROVA, R.; KRIZOVA, V. J. Chromatographic and electromigration analysis of rhenium compounds used in radiopharmacy. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 258. n. 3, p. 627-633, 2003.
- [53] LAMBERT, B.; KLERK, J.M.H. Clinical applications of ^{188}Re -labelled radiopharmaceuticals for radionuclide therapy. **Nucl. Med. Commun.**, v. 27, p. 223-229, 2006.
- [54] LAMBRECHT, R.; Radionuclide generators. **Radiochimica Acta.**, v. 34, p. 9-24, 1983.
- [55] LI, G.; WANG, Y.; HUANG, K.; ZHANG, H.; PENG, W.; ZHANG, C. The experimental study on the radioimmunotherapy of the nasopharyngeal carcinoma overexpressing HER2/neu in nude mice model with intratumoral injection of ^{188}Re -herceptin. **Nucl. Med. Bio.**, v. 32, p. 59-65, 2005.

- [56] LI, S.; LIU, J.; ZHANG, H.; TIAN, M.; WANG, J.; ZHENG, X. Rhenium-188 HEDP to treat painful bone metastases. **Clin. Nucl. Med.**, v. 26, n. 11, p. 919-922, 2001.
- [57] LIANG, Q.; EHRHARDT, G. J.; KETRING, A. R.; MILLER, R. Effect of stoichiometric and preparation parameters on W-188/Re-188 gel generator performance. **Radiochimica Acta**, v. 79, p. 137-140, 1997.
- [58] LIEPE, K.; KROPP, J.; RUNGE, R.; KOTZERKE, J. Therapeutic efficiency of rhenium-188-HEDP in human prostate cancer skeletal metastases. **British J. Canc.**, v. 89, p. 625-629, 2003.
- [59] LIN, U.-T.; CHU, C.-H.; HSIEH, B.-T.; HWANG, W.-S. Dose evaluation and measurement of the ^{188}Re liquid-filled balloon in intravascular brachytherapy. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 61, p. 1323-1333, 2004.
- [60] LIN, W.-Y.; HSIEH, J.-F.; LIN, S.-P.; HSIEH, B.-T.; TING, G.; WANG, S.-J.; Knapp Jr, F. F. R. Effect of reaction conditions on preparations of rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate complexes. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 455-459, 1999.
- [61] LIN, W.-Y.; LIN, C.-P.; YEH, S.-J.; HSIEH, B.-T.; TSAI, Z.-T.; TING, G.; YEN, T.-C.; WANG, S.-J.; KNAPP Jr, F. F. R.; STABIN, M. G. Rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate: a new generator-produced radiotherapeutic drug of potential value for the treatment of bone metastases. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 24, n. 6, p. 590-595, 1997.
- [62] LISIC, E.C.; PHILLIPS, M.; ENSOR, D.; NASH, K.L.; BEETS, A.; KNAPP Jr, F.F.R.; Synthesis of a new bisphosphonic acid ligand (SEDP) and preparation of a $^{188}\text{Re}-(\text{Sn})\text{SEDP}$ bone seeking. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 419-424, 2001.
- [63] LIU, C. -B.; LIU, G.-Z.; LIU, N.; ZHANG, Y.-M.; HE, J.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Radiolabeling morpholinos with ^{90}Y , ^{111}In , ^{188}Re , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. **Nucl. Med. Biol.**, v. 30, p. 207-214, 2003.
- [64] MABHOUH, A. E.; MERCER, J. R. ^{188}Re -labeled bisphosphonates as potential bifunctional agents for therapy in patients with bone metastases. **Appl. Rad. Isot.**, v. 62. n. 4, p. 1-9, 2004.

- [65] MATHIEU, L.; CHEVALIER, P.; GALY, G.; BERGER, M.; Preparation of rhenium-186 labelled EHDP and its possible use in the treatment of osseous neoplasms. **Int. J. Appl. Rad. Isot.**, v. 30, p. 725-727, 1979.
- [66] McEVAN, A.J.B. Use of radionuclides for the palliation of bone metastases. **Semin. Rad. Oncol.**, v. 10, n. 2, p. 103-114, 2000.
- [67] MITTERHAUSER, M.; WADSAK, W.; EIDHERR, H.; KRCAL, A.; KLETTER, K.; DUDCZAK, R.; VIERNSTEIN, H.; PIRICH, C. Labelling of EDTMP (multibone®) with [^{111}In], [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] and [^{188}Re] using different carriers for “cross complexation”. **Appl. Rad. Isot.**, v. 60, p. 653-658, 2004.
- [68] MURPHY, C. A.; FLORES, G. F.; LÓPEZ, M. P.; ALAFORT, L. M.; CROFT, B. Y.; RAMÍREZ, F.M.; PADILLA, J. Labelling of Re-ABP with ^{188}Re for bone pain palliation. **Appl. Rad. Isot.**, v. 54: p. 435-442, 2001^a.
- [69] MURPHY, C. A.; LOPEZ, M. P.; FLORES, G. F.; STACK, E. M.; MERCADO, L. C.; ASCENCIO, J. A.; SALINAS, L. G.; GUTIERREZ, S. H. Uptake of ^{188}Re - β -naphthyl-peptide in cervical carcinoma tumors in athymic mice. **Nuc. Med. Biol.**, v. 28, p. 319-326, 2001.
- [70] MUSHTAQ, A. Concentration of $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-/^{188}\text{ReO}_4^-$ by a single, compact, anion exchange cartridge. **Nucl. Med. Comm.**, v. 25, p. 957-962, 2004.
- [71] MUSHTAQ, A. Preparation of high specific-volume solutions of technetium-99m and rhenium-188. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 58, p. 309-314, 2003.
- [72] MUSHTAQ, A.; Recovery of enriched ^{186}W from spent $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators. **Appl. Rad. Isot.**, v. 47, n. 8, p. 727-729, 1996.
- [73] OH, S. J.; MOON, D. H.; HA, H.-J.; PARK, S.-W.; HONG, M.-K.; PARK, S.-J.; CHOI, T. H.; LIM, S.-M.; CHOI, C. W.; KNAPP Jr, F. F. R., LEE, H. K. Automation of the synthesis of highly concentrated ^{188}Re -MAG3 for intracoronary radiation therapy. **Appl. Radiat. Isot.**, v.54, p. 419-427, 2001.
- [74] OH, S. J.; MOON, D. H.; LEE, W. W.; PARK, S.-W.; HONG, M.-K.; PARK, S.-J.; SHIN, D.-I.; LEE, H. K. Automated preparation of ^{188}Re -labeled radiopharmaceuticals for endovascular radiation therapy. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 59, p. 225-230, 2003.

- [75] OLIVEIRA, A.; **Desenvolvimento da tecnologia de preparo de geradores $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$** . 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- [76] Olivier, P. Nuclear oncology, a fast growing field of nuclear medicine. **Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.**, v. 527, p. 4-8, 2004.
- [77] PALMEDO, H.; GUHLKE, S.; BENDER, H.; SARTOR, J.; SCHOENEICH, G.; RISSE, J.; GRUNWALD, F.; KNAPP Jr, F. F. R.; BIRSACK, H.-J. Dose escalation study with rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate in prostate cancer patients with osseous metastases. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.27, n. 2, p. 123-130, 2000.
- [78] PALMEDO, H.; WALUCH, A.M.; ALBERS, P.; WOLF, I.G.H.S.; REINHARDT, M.; EZZIDDIN, S.; JOE, A.; ROEDEL, R.; FIMMERS, R.; KNAPP Jr, F.F.R., GUHLKE, S.; BIRSACK, H.J. Repeated bone-targeted therapy for hormone-refractory prostate carcinoma: randomized phase II trial with the new high-energy radiopharmaceutical rhenium-188 hydroxyethylidenediphosphonate. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 15, p. 2869-2875, 2003.
- [79] PERVEZ, S.; MUSHTAQ, A.; ARIF, M.; CHOCHAN, H. $^{188}\text{Rhenium-EDTMP}$: a potential therapeutic bone agent. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 257, n. 2, p. 417-420, 2003.
- [80] PINKERTON, T.C.; FERGUSON, D.L.; DEUTSCH, E.; HEINEMAN, W. R.; LIBSON, K.; *In vivo* distributions of some component fractions of $\text{Tc}(\text{NaBH}_4)\text{-HEDP}$ mixtures separated by anion exchange high performance liquid chromatography. **Int. J. Appl. Rad. Isot.**, v. 33, p. 907-915, 1982.
- [81] PONSARD, B.; HILTUNE, J.; PENTTILLA, P.; RUIZ, H. V.; BEETS, A. L.; MIRZADEH, S.; KNAPP Jr, F. F. R. The tungsten-188/rhenium-188 generator: effective coordination of tungsten-188 production between the HFIR and BR2 reactors. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 257, n. 1, p. 169-174, 2003.
- [82] QINGNUAN, L.; XIAODONG, Z.; RONG, S.; WENXIN, L. Preparation of ^{188}Re -AEDP and its biodistribution studies. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 53, p. 993-997, 2000.

- [83] Report of the 2nd research coordination meeting on: **DEVELOPMENT OF GENERATOR TECHNOLOGIES FOR THERAPEUTIC RADIONUCLIDES**, Apr. 3-7, 2006, Milan, Italy – European Institute of Oncology. CRP 2006.
- [84] SAAD, F.; CLARKE, N.; COLOMBEI, M. Natural history and treatment of bone complications in prostate cancer. **Eur. Urology**, v. 49, p. 429-440, 2006.
- [85] SAHA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. New York, N.Y. Springer, 5 ed., 2004.
- [86] SEIFERT, S.; PIETZSCH, H.-J. The $^{188}\text{Re(III)-EDTA}$ complex – a multipurpose starting material for the preparation of relevant ^{188}Re complexes under mild conditions. **Appl. Rad. Isot.**, v. 64, p. 223-227, 2006.
- [87] SEITZ, U.; NEUMAIER, B.; GLATTING, G.; KOTZERKE, J.; BUNJES, D.; RESKE, S. N. Preparation and evaluation of the rhenium-188-labelled anti-NCA antigen monoclonal antibody BW 250/183 for radioimmunotherapy of leukemia. **Eur. J. Nucl. Med. Molec. Imag.**, v. 26, n. 10, p. 1265-1273, 1999.
- [88] SERGIENKO, V. S. Structural chemistry of 1-hidroxyethylidenediphosphonic acid complexes. **Russian J. Coordinat. Chem.**, v. 27, n. 10, p. 681-710, 2001.
- [89] SILBERSTEIN, E.B. Systemic radiopharmaceutical therapy of painful osteoblastic metastases. **Semin. Rad. Oncol.**, v. 10, n. 3, p. 240-249, 2000.
- [90] SILBERSTEIN, E.B. Teletherapy and radiopharmaceutical therapy of painful bone metastases. **Semin. Nucl. Med.**, v. 35, p. 152-158, 2005.
- [91] SINGH, J.; REGHEBI, K.; LAZARUS, C. R.; CLARKE, S. E. M.; CALLAHAN, A. P.; KNAPP Jr, F. F. R.; BLOWER, P. J. Studies on the preparation and isomeric composition of $^{186}\text{Re-}$ and $^{188}\text{Re-pentavalent}$ rhenium dimercaptosuccinic acid complex. **Nucl. Med. Comm.** v. 14, p. 197-203, 1993.
- [92] SITE 1 - HISTÓRIA DOS ELEMENTOS W e Re. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org> Acesso: 25/set/2006.
- [93] SITE 2 - TABELA DE NUCLÍDEOS W e Re. Disponível em:
<http://environmentalchemistry.com> Acesso: 25/set/2006.

- [94] SITE 3 - HISTÓRIA DO Re. Disponível em:
http://www.mspc.eng.br/quim1/quim1_075.asp#hist Acesso: 25/set/2006.
- [95] SITE 4 - HISTÓRIA DA MEDICINA NUCLEAR. Disponível em:
<http://interactive.snm.org/index.cfm?PageID=1107&RPID=10> Acesso:
08/set/2006.
- [96] SITE 5 – HISTOLOGIA – FIGURA DOS OSTEOCLASTOS. Disponível em:
www.conganat.org/iicongreso/conf/018/osteocl.htm
- [97] SRIVASTAVA, S. C.; MEINKEN, G.; SMITH, T. D.; RICHARDS, P. Problems associated with stannous ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. **Int. J. Appl. Isot.**, v. 28, p. 83-95, 1977.
- [98] TANABE, S.; ZODDA, J.P.; DEUTSH, E.; HEINEMAN, W.R. Effect of pH on the formation of $\text{Tc}(\text{NaBH}_4)$ -MDP radiopharmaceutical analogues. **Int. J. Appl. Rad. Isot.**, v. 34, n. 12, p. 1577-1584, 1983.
- [99] TANABE, S.; ZODDA, J.P.; LIBSON, K.; DEUTSCH, E.; HEINEMAN, W.R. The biological distributions of some technetium-MDP components isolated by anion exchange high performance liquid chromatography. **Int. J. Appl. Rad. Isot.**, v. 34, n. 12, p. 1585-1592, 1983.
- [100] VERDERA, E. S.; GAUDIANO, J.; LEON, A.; MARTINEZ, G.; ROBLES, A.; SAVIO, E.; LEON, E.; McPHERSON, D. W., KNAPP Jr, F. F. R. Rhenium-188-HEDP-kit formulation and quality control. **Radiochimica Acta**, v. 79, p. 113-117, 1997.
- [101] VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J.; Therapeutic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2269-2292, 1999.
- [102] WANG, S-J.; LIN, W.-Y.; CHEN, M.-N.; CHEN, J.-T.; HO, W.-L.; HSIEH, B.-T.; HUANG, H.; SHEN, L.-H.; TING, G.; KNAPP Jr, F. F. Histologic study of effects of radiation synovectomy with rhenium-188 microsphere. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 727-732. 2001.

- [103] WUNDERLICH, G.; PINKERT, J.; ANDREEFF, M.; STINTZ, M.; KNAPP JR, F.F.; KROPP, J.; FRANKE, W-G.; Preparation and biodistribution of rhenium-188 labeled albumin microspheres B 20: a promising new agent for radiotherapy. **Appl. Rad. Isot.**, v. 52, p. 63-68, 2000.
- [104] ZAMORA, P. O.; MAREK, M. J.; KNAPP Jr, F. F. R. Preparation of ^{188}Re -RC-160 somatostatin analog: a peptide for local/regional radiotherapy. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 48, n. 3, p. 305-309, 1997.
- [105] ZODDA, J.P.; TANABE, S.; HEINEMAN, W.R.; DEUTSH, E. The effect of formulation conditions on the distribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{NaBH}_4)$ -HEDP components separated by anion exchange HPLC. **Appl. Rad. Isot.**, v. 37, n. 4, p. 345-354, 1986.