



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Desenvolvimento do método de marcação de Doxiciclina com tecnécio-99m
e avaliação do potencial para diagnóstico de processos infecciosos**

VANESSA MACIEL XAVIER DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientadora:
Profa. Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda

São Paulo
2024

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da
Saúde

**Desenvolvimento do método de marcação de Doxiciclina com
tecnécio-99m e avaliação do potencial para diagnóstico de processos
infecciosos.**

VANESSA MACIEL XAVIER DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientadora:
Profa. Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda

São Paulo
2024

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

Como citar:

DA SILVA, V. M. X. . Desenvolvimento do método de marcação de Doxíciclina com tecnécio-99m e avaliação do potencial para diagnóstico de processos infecciosos. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva, Vanessa Maciel Xavier
Desenvolvimento do método de marcação de Doxíciclina com tecnécio-99m e avaliação do potencial para diagnóstico de processos infecciosos. / Vanessa Maciel Xavier da Silva; orientadora Margareth Mie Nakamura Matsuda . -- São Paulo, 2024.
79 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde (Medicina Nuclear e Radiofarmácia) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2024.

1. Radiofarmácia. 2. Diagnóstico de Infecção e Inflamação. 3. Tecnécio-99m. 4. Doxíciclina. 5. Medicina Nuclear. I. Matsuda , Margareth Mie Nakamura, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Vanessa Maciel Xavier da Silva

Título: Desenvolvimento do método de marcação de Doxiciclina com tecnécio-99m e avaliação do potencial para diagnóstico de processos infecciosos.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Data: _/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e, em segundo lugar, a toda a minha família e amigos que me auxiliaram nesta jornada de aprendizado e conhecimento.

“Eu me deitei e dormi; acordei, porque o Senhor me sustentou.”
Salmos 3:5

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tem me ajudado e sustentado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo, Fábio, que nesses últimos anos tem me apoiado de todas as formas e tem sido os meus braços e as minhas pernas no cuidado dos filhos e da casa. O êxito desse trabalho também é seu!

Aos meus filhos, Miguel, Matheus e Micaella, meus grandes tesouros que sempre me inspiram todos os dias a ser um ser humano melhor.

Aos meus pais, Rosana e Carlos, por todo aconselhamento, carinho e apoio. Sem eles, não teria chegado até aqui.

Às minhas irmãs, Beatriz, Karolina e Juliana, em especial a Karolina, por todo seu apoio e por sempre me aconselhar a persistir e nunca desistir.

À minha família, em especial a minha tia Regina, meu avô Joaquim e minha saudosa e querida avó Olinda, que sempre estiveram presentes na minha vida e sempre me apoiaram em todos os momentos.

À Prof.^a Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda, agradeço imensamente por todos os ensinamentos, carinho e apoio. Gratidão por ter me acolhido e me aceitado como aluna. Além de ser uma excelente profissional, é um excelente ser humano. Eu passei por momentos muito difíceis no percurso do mestrado, e tenho certeza de que sua orientação, expertise, apoio e acolhimento foram fundamentais para a continuidade e êxito desse estudo.

Ao Prof.^o Dr. Luís Alberto Pereira Dias, agradeço imensamente pelo acolhimento, ensinamentos e apoio. Gratidão pelos insights no desenvolvimento do projeto, pelo fornecimento da molécula e por todo aconselhamento, empenho e auxílio. Toda sua orientação, apoio e encorajamento foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo. Você e a Prof.^a Margareth me acolheram no momento que eu mais precisei; serei eternamente grata!

Ao colaborador mestrando Joel Mendes dos Santos, agradeço imensamente pela generosidade, ajuda, apoio e empenho no desenvolvimento desse estudo. Um químico excepcional! Sem você, eu descreveria as 100 formas diferentes de não se marcar a Doxiciclina com tecnécio-99m, mas graças ao seu auxílio e empenho, conseguimos êxito na marcação.

Ao colaborador Dr. Fábio Fernando Alves da Silva, agradeço imensamente

pela generosidade, ajuda, apoio e empenho no desenvolvimento desse estudo. Gratidão pelo aconselhamento sobre a utilização de quelantes para marcação com tecnécio-99m; sem esses insights, não obteríamos êxito na marcação. E gratidão por todo apoio e auxílio no desenvolvimento do modelo animal de infecção e aquisição da imagem.

Aos colaboradores doutorando Carlos Farias Felgueiras e Luan Junior dos Santos, agradeço imensamente pela generosidade, ajuda, apoio e empenho no desenvolvimento desse estudo. Gratidão por todo apoio e auxílio nos estudos microbiológicos e insights na padronização do ensaio de ligação.

À toda equipe do controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia, em especial ao farmacêutico Natanael Gomes da Silva, que me forneceu informações valiosas sobre as marcações com tecnécio-99m.

Aos meus colegas da Turma 3, em especial o Denis dos Santos, muito obrigada pela parceria nos trabalhos e atividades acadêmicas e todo apoio e aconselhamento na edição dessa dissertação.

RESUMO

DA SILVA, V. M. X. **Desenvolvimento do método de marcação de Doxiciclina com tecnécio-99m e avaliação do potencial para diagnóstico de processos infecciosos**. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

Na medicina nuclear (MN), uma variedade de radiofármacos com diferentes respostas têm sido empregados rotineiramente na clínica para determinação de foco de infecção e inflamação. Eles são constituídos por diversos radionuclídeos como: tecnécio-99m (^{99m}Tc), flúor-18, gálio-67 e índio-111.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um método de marcação de doxiciclina (DOX) com ^{99m}Tc e avaliar o potencial desse radiofármaco para o diagnóstico de processos infecciosos por SPECT-CT. As marcações diretas de DOX com ^{99m}Tc resultaram em baixa pureza radioquímica, enquanto a marcação indireta utilizando o agente quelante HYNIC e o co-ligante EDTA alcançou uma pureza radioquímica de 98,85% por CP/CCD e 92,21% por HPLC. Os estudos de estabilidade demonstraram que o produto marcado manteve sua pureza acima de 90% após 24 horas. Os ensaios *in vitro* com *Staphylococcus aureus* evidenciaram uma taxa de ligação do radiofármaco de 10,5%. Nos estudos preliminares *in vivo* com modelo animal de infecção por *S. aureus*, o produto da marcação indireta apresentou captação significativamente maior na pata infectada ($0,58 \pm 0,03\%$ ID/g) em comparação à pata não infectada, evidenciando o potencial desse radiofármaco na detecção de focos infecciosos por SPECT-CT. Os resultados sugerem que o radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA pode ser uma alternativa viável para o diagnóstico de processos infecciosos por técnicas de MN.

Palavras-chave: medicina nuclear; radiofármacos; diagnóstico para infecção e inflamação. tecnécio-99m; doxiciclina.

ABSTRACT

DA SILVA, V. M. X. **Development of the labeling method of Doxycycline with technetium-99m and evaluation of its potential for diagnosing infectious processes.** 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

In nuclear medicine (NM), a variety of radiopharmaceuticals with different responses have been routinely employed in the clinic for the determination of infection and inflammation foci. They consist of various radionuclides such as technetium-99m (^{99m}Tc), fluorine-18, gallium-67, and indium-111.

The present study aimed to develop a method for labeling doxycycline (DOX) with ^{99m}Tc and to evaluate the potential of this radiopharmaceutical for diagnosing infectious processes using SPECT-CT. Direct labeling of DOX with ^{99m}Tc resulted in low radiochemical purity, while indirect labeling using the chelating agent HYNIC and the co-ligand EDTA achieved radiochemical purity of 98.85% by CP/CCD and 92.21% by HPLC. Stability studies demonstrated that the labeled product maintained its purity above 90% after 24 hours. In vitro assays with *Staphylococcus aureus* showed a radiopharmaceutical binding rate of 10.5%. In preliminary in vivo studies with an animal model of *S. aureus* infection, the product of indirect labeling presented significantly higher uptake in the infected paw ($0.58 \pm 0.03\%$ ID/g) compared to the non-infected paw, demonstrating the potential of this radiopharmaceutical in detecting infectious foci using SPECT-CT. The results suggest that the radiopharmaceutical [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA may be a viable alternative for diagnosing infectious processes using NM techniques.

Keywords: nuclear medicine; radiopharmaceuticals; diagnosis for infection and inflammation; technetium-99m; doxycycline.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	17
2.1.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Histórico e evolução do diagnóstico por imagem	18
3.2 Radiofármacos	21
3.3 Inflamação e infecção	22
3.4 Diagnóstico de infecção e inflamação	25
3.5 Medicina nuclear no diagnóstico de infecção e inflamação	26
3.5.1 Radiofármacos marcados com Gálio-67 e Gálio-68.....	26
3.5.2 Flúor-18-FDG	28
3.5.3 Leucócitos marcados	28
3.5.4 Peptídeos antimicrobianos	30
3.5.5 Anticorpos marcados com ^{99m}Tc	31
3.5.6 Antibióticos marcados com ^{99m}Tc	32
3.6 Antibióticos	34
3.6.1 Doxiciclina	34
3.7 Tecnécio-99m	36
3.8 Marcação com $^{99m}\text{TcO}_4^-$	39
3.8.1 Marcação direta	39
3.8.2 Marcação indireta.....	40
3.9 Controle de qualidade	41
3.9.1 Controle de qualidade físico-químico	42
3.9.2 Controle de qualidade biológico	42
3.9.3 Cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada para ^{99m}Tc ..	43

3.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Materiais.....	46
4.1.2 Equipamentos e materiais.....	46
4.1.3 Lista de reagentes.....	47
4.2 Métodos	47
4.2.1 Espectro de Infravermelho por transformada de Fourier da DOX.....	47
4.2.2 Preparo prévio de soluções e reagentes para marcação de [^{99m} Tc]Tc-DOX	48
4.2.3 Determinação das marcações de DOX com [^{99m} Tc] TcO ₄ ⁻	48
4.2.4 Marcação para o estudo de estabilidade	50
4.3 Pureza radioquímica das marcações diretas e indiretas.....	50
4.3.1 Sistema cromatográfico para determinação de ^{99m} TcO ₂ e ^{99m} TcO ₄ ⁻	51
4.3.2 Sistema cromatográfico por HPLC para determinação da % PRq produto marcado DOX- ^{99m} Tc.....	53
4.3.3 Estudo de estabilidade	53
4.4 Estudo <i>in vitro</i>.....	53
4.4.1 Preparo de bactérias de <i>S. aureus</i> para ensaio de ligação.....	53
4.4.2 Ensaio de ligação de [^{99m} Tc]Tc-DOX a <i>S. aureus</i>	54
4.5 Estudo <i>in vivo</i>.....	55
4.5.1 Modelo animal de infecção.....	55
4.5.2 Aquisição da imagem	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Espectro de infravermelho por transformada de Fourier da DOX.....	56
5.2 Pureza radioquímica do produto marcado com sistema cromatográfico CCD e CP	56
5.3 Pureza radioquímica do produto marcado com HPLC	59
5.4 Estudos de estabilidade	62

5.5 Ensaio de ligação.....	63
5.6 Estudo em modelo animal de infecção com <i>S. aureus</i>.....	64
5.6.1 Aquisição de imagem.....	64
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	66
7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico preciso de infecções e processos inflamatórios são de extrema importância na prática médica, especialmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com doenças autoimunes, em tratamento oncológicos, transplantados, em uso prolongado de corticosteroides ou imunossupressores, e pacientes infectados pelo HIV/AIDS (MANDEL *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2017). Esses pacientes possuem maior suscetibilidade a infecções nosocomiais, ou seja, infecções adquiridas no ambiente hospitalar, causadas por bactérias e microrganismos (MO) oportunistas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, e leveduras do gênero *Candida* sp., representando um grave problema de saúde pública global (PEREIRA, 1998; AURITI, 2003; GASPAR, 2015; CHAVES, 2020).

Além das infecções nosocomiais, outras patologias infecciosas e inflamatórias, como febre de origem indeterminada (FOI), inflamação de origem desconhecida, osteomielite, infecção de próteses vasculares e articulares, pé diabético, endocardite, doença inflamatória intestinal, infecções neurológicas e infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos, também representam um desafio clínico (AKTER *et al.*, 2023; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Os métodos diagnósticos tradicionais, que incluem o exame físico, o histórico do paciente e exames laboratoriais, apresentam limitações na detecção precoce de processos infecciosos e inflamatórios. Embora em conjunto com técnicas como tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassonografia sejam úteis para identificar focos de infecção ou inflamação, a aquisições dessas se baseiam principalmente em alterações anatômicas para definir as lesões. Por essa razão, essas técnicas não são eficazes na detecção de processos em estágio inicial, pois, nesse período, ainda não ocorrem mudanças anatômicas significativas (DIAS, 2015; SIGNORE *et al.*, 2019; VALERO-MARTÍNEZ *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a Medicina Nuclear (MN) tem se destacado como uma ferramenta avançada capaz de fornecer informações precisas sobre a localização e extensão de focos infecciosos e inflamatórios pela aquisição de imagens

funcionais e moleculares (SIGNORE *et al.*, 2019; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Uma variedade de radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos, como tecnécio-99m (^{99m}Tc), flúor-18 (^{18}F), gálio-67 (^{67}Ga), gálio-68 (^{68}Ga) e índio-111 (^{111}In), têm sido empregados rotineiramente na clínica para o diagnóstico de infecções e inflamações. Dentre esses, os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc respondem por aproximadamente 80% de todos os exames diagnósticos em MN, devido a características físicas favoráveis desse radionuclídeo, como sua meia-vida física de 6 horas, energia gama de 140 keV, e a facilidade da sua obtenção a partir de geradores molibdênio-99 (^{99}Mo) / ^{99m}Tc (BOSCHI, 2019; MARQUES *et al.*, 2001).

Esses radiofármacos, acumulam-se no organismo por meio de diferentes mecanismos de ação, ligação a receptores, interação antígeno-anticorpo, ligação a moléculas específicas como lactoferrina e sideróforos bacterianos, diapedese dos leucócitos e dentre outros mecanismos. Alguns exemplos de radiofármacos utilizados no diagnóstico de infecção e inflamação incluem o citrato de ^{67}Ga (^{67}Ga]-Ga-citrato); leucócitos marcados, como o ^{99m}Tc -Hexametil-propileno-amino-oxima (^{99m}Tc]-Tc-HMPAO) e ^{18}F]-FDG (fluordesoxiglicose); anticorpos monoclonais marcados, como o ^{99m}Tc]-Tc-besilesonab; peptídeos antimicrobianos, como ^{99m}Tc]-Tc-UBI-29-41 e antibióticos marcados, como ^{99m}Tc]-Tc-ciprofloxacina e ^{99m}Tc]-Tc-anfotericina B (LUPETTI, 2003; VAN DER LAKEN, 2005; DIAS, 2015; VAHIDFAR *et al.*, 2024; AKTER *et al.*, 2023).

Os antibióticos, por sua capacidade de se acumularem seletivamente em sítios de infecção, surgiram como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de radiofármacos mais específicos para o diagnóstico de processos infecciosos (AULETTA *et al.*, 2016; PALESTRO, 2020; JIANG *et al.*, 2023).

As tetraciclinas de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ são uma das classes mais baratas de antibióticos, abundantemente usada em países em desenvolvimento com orçamentos limitados de saúde e tem vários efeitos não antibacterianos, incluindo anti-inflamatório, imunossupressão, inibição da atividade da lipase e colagenase e cicatrização de feridas (YANAGIMURA, 1989; CHAIDEMENOS, 2001; TARIQ, 2018). Eles são agentes bacteriostáticos e

apresentam vantagens em relação a outras classes de antibióticos, entre elas: o amplo espectro de ação em neurologia, oncologia e virologia com baixa toxicidade, e possui características biológicas e químicas específicas contra o MO interagindo com alvos e receptores celulares variados. (FUOCO, 2012; TARIQ, 2018).

A Doxiciclina (DOX) é um antibiótico pertencente à classe das tetraciclina, amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas. É uma tetraciclina de segunda geração, destacando-se por sua maior biodisponibilidade oral e meia-vida biológica prolongada, o que permite regimes de dosagem mais convenientes e eficazes, o que é vantajoso para a adesão ao tratamento (GRIFFIN *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2018; FUOCO, 2012; TARIQ, 2018).

A DOX vem sendo marcada com ^{99m}Tc para obtenção de ^{99m}Tc -DOX mostrando alta pureza radioquímica e imagem de inflamação e infecção em modelo animal. Ocorre rápida biodistribuição pelo corpo todo e alta absorção no músculo infeccionado relacionado ao músculo não infectado, e a imagem é obtida com boa captação quando adquirida após 2 horas e no máximo até 5 horas (İLEM-OZDEMİR *et al.*, 2014).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Esse estudo teve como objetivo realizar a marcação da Doxíciclina com ^{99m}Tc e avaliar o potencial do radiofármaco para a detecção de infecção bacteriana por SPECT-CT.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Padronizar a marcação de [^{99m}Tc]Tc-DOX;
2. Determinar a pureza radioquímica por cromatografia em papel, camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência;
3. Avaliar a estabilidade de produto marcado com maior rendimento de marcação;
4. Realizar estudo *in vitro*, ensaio de ligação bacteriana;
5. Obter imagem da infecção em modelo animal de infecção.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico e evolução do diagnóstico por imagem

O diagnóstico por imagem é uma área da medicina que se dedica à obtenção de imagens do corpo humano para fins de diagnóstico e tratamento. A descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895 marcou o início dessa especialidade. Röntgen, um físico alemão, fez essa descoberta enquanto experimentava com tubos de Crookes, identificando um novo tipo de radiação capaz de atravessar materiais opacos e produzir imagens das estruturas internas do corpo humano. Essa descoberta lhe rendeu o primeiro Prêmio Nobel de Física em 1901 e revolucionou a medicina ao possibilitar diagnósticos mais precisos e tratamentos mais eficazes (RÖNTGEN, 1896; RÖNTGEN, 1901; ARRUDA, 1996; DA CRUZ, 2013).

Nas décadas seguintes, diversas inovações tecnológicas foram introduzidas, ampliando as possibilidades diagnósticas. Na década de 1950, a ultrassonografia surgiu como uma técnica que utiliza ondas sonoras de alta frequência para produzir imagens dos órgãos internos, sem o uso de radiação ionizante. Os estudos e aprimoramento do ultrassom foi fortemente influenciado pelos avanços na tecnologia do Sonar (do inglês Sound Navigation and Ranging) durante a Segunda Guerra Mundial. Ian Donald, um obstetra escocês, foi um dos pioneiros no uso clínico do ultrassom, aplicando a técnica inicialmente para monitorar gravidez (DONALD *et al.*, 1958; RISTOW, 2015; CAMPBELL, 2013).

A tomografia computadorizada (CT), desenvolvida na década de 1970 por Godfrey Hounsfield e Allan Cormack, combina raios X com tecnologia de processamento de dados para gerar imagens transversais detalhadas do corpo. Essa técnica permite a visualização de cortes anatômicos finos, proporcionando uma visão mais clara e precisa das estruturas internas. Hounsfield e Cormack receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1979 por suas contribuições ao desenvolvimento da TC (HOUNSFIELD, 1973; KALENDER, 2006).

A ressonância magnética (RM), introduzida na década de 1980, utiliza campos magnéticos e pulsos de rádio frequência para produzir imagens

detalhadas dos tecidos moles. Raymond Damadian, Paul Lauterbur e Peter Mansfield foram figuras chave no desenvolvimento da RM. Lauterbur e Mansfield foram laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2003 por suas descobertas relativas à ressonância magnética, embora Damadian tenha também sido um contribuidor importante, apesar de não ter sido incluído no prêmio. O primeiro exame de RM desenvolvido na América Latina foi no Brasil, no Hospital Albert Einstein em 1986 (HAGE *et al.*, 2009).

Além dessas modalidades, a MN surgiu como uma subespecialidade médica de extrema importância. Utilizando elementos radioativos, a MN fornece imagens funcionais que revelam a atividade metabólica dos tecidos, oferecendo informações valiosas que complementam as imagens anatômicas das outras técnicas. A MN começou a se desenvolver no final da década de 30 com a introdução do iodo-121 para estudos da função da tireoide, em decorrência o primeiro radiofármaco, o iodo-131 foi comercializado na década de 50 (EARLY, 1995; SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2008). Em sequência foi descoberto o elemento número 43, hoje conhecido como Tecnécio, sendo o primeiro elemento a ser produzido artificialmente. Inicialmente, sua meia-vida física de 6 horas parecia inadequada para MN, porém, sua energia gama de 140 keV era excelente para a criação de imagens nas câmeras gama. E em 1957, anunciaram a criação do gerador de tecnécio usando o sistema Mo-99/Tc-99m, desenvolvido por Brookhaven National Laboratory (BNL) (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2008). A partir de 1981, os geradores Mo-99/Tc-99m começaram a ser produzidos no Brasil, pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) (NIETO, 1998).

Desde então, a MN expandiu significativamente, incorporando uma variedade de radionuclídeos e técnicas de imagem. A MN é uma especialidade médica que utiliza radiofármacos para diagnóstico, tratamento e pesquisa em diversas condições clínicas. Os radiofármacos são agentes essenciais na MN, desempenhando papéis importantes tanto no diagnóstico quanto na terapia de patologias diversas. Estes compostos são formulados combinando um radionuclídeo, que emite radiação, com uma molécula específica que visa direcionar o radionuclídeo para um órgão ou tecido-alvo no corpo humano. Essa abordagem permite a obtenção de imagens precisas e funcionais. (CHERRY *et al.*, 2013)

A Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) combinada com CT é uma técnica híbrida e avançada de imagem utilizada na MN para diagnóstico e avaliação de uma variedade de condições médicas. Esta abordagem combina a capacidade do SPECT de fornecer imagens funcionais baseadas na distribuição de radiofármacos no corpo com a precisão anatômica proporcionada pela CT, resultando em uma imagem híbrida que integra informações metabólicas e estruturais em um único exame (O'CONNOR *et al.*, 2006; CHERRY *et al.*, 2013; KOPPULA *et al.*, 2021).

O SPECT utiliza radiofármacos que emitem radiação gama, como o ^{99m}Tc , ligados a moléculas específicas que se acumulam em órgãos ou tecidos-alvo. A detecção da radiação gama permite avaliar a função fisiológica desses órgãos, como a perfusão cardíaca na cintilografia miocárdica ou a função cerebral na perfusão cerebral. Por outro lado, a CT fornece imagens detalhadas da anatomia, permitindo a localização precisa das áreas de captação do radiofármaco (CHERRY *et al.*, 2013).

Na prática clínica, o SPECT-CT tem diversas aplicações. Na cardiologia, por exemplo, é essencial para avaliar a perfusão miocárdica, identificando áreas de isquemia ou infarto, o que orienta a conduta médica e o planejamento cirúrgico. Em oncologia, o SPECT-CT é utilizado para localizar e caracterizar tumores, determinando sua extensão e auxiliando na escolha do melhor tratamento. Além disso, é empregado na avaliação de distúrbios neurológicos, ortopédicos, endócrinos e infecciosos, proporcionando informações relevantes para diagnóstico e monitoramento de resposta ao tratamento (BOSCHI, 2019; DIAS, 2015).

A Tomografia por Emissão de Pósitrons combinada com Tomografia Computadorizada (PET-CT) é uma técnica híbrida que representa uma das tecnologias mais avançadas e impactantes na MN e na imagem médica contemporânea. Esta técnica híbrida combina a capacidade do PET de fornecer imagens moleculares detalhadas com a precisão anatômica proporcionada pela CT, permitindo uma avaliação integrada e abrangente das condições fisiológicas e patológicas do corpo humano (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O PET utiliza radiofármacos marcados com isótopos de vida curta, como o ^{18}F , que emitem pósitrons. Quando um pósitron é emitido, ele interage

com elétrons próximos, resultando na produção de dois fótons de radiação gama. A detecção desses fótons gama permite mapear a distribuição e a atividade metabólica do radiofármaco no corpo, fornecendo informações sobre processos bioquímicos e moleculares em nível celular. Por outro lado, a CT fornece imagens detalhadas da anatomia, permitindo a correlação precisa das áreas de captação do radiofármaco com as estruturas anatômicas (SALMANOGLU *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Na prática clínica, o PET-CT é amplamente utilizado em diversas especialidades médicas. Em oncologia, por exemplo, é essencial para o diagnóstico, estadiamento e monitoramento de resposta ao tratamento de diversos tipos de câncer. A capacidade do PET de detectar áreas de alta atividade metabólica, como tumores, combinada com a precisão da CT na localização anatômica exata, permite uma avaliação abrangente do câncer e facilita a seleção do melhor plano terapêutico (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além disso, o PET-CT é empregado na cardiologia para avaliação de viabilidade miocárdica, na neurologia para estudos de doenças neurodegenerativas, na avaliação de doenças inflamatórias e infecciosas, entre outras aplicações clínicas. A combinação dessas técnicas em um único exame não apenas melhora a precisão diagnóstica, mas também otimiza o tempo e os recursos necessários para a avaliação e o manejo de condições médicas complexas (SATO *et al.*, 2010).

3.2 Radiofármacos

Os radiofármacos são compostos que contêm elementos radioativos, chamados de radioisótopos ou radionuclídeos, fundamentais na MN para diagnóstico e tratamento de diversas condições médicas. Esses compostos são utilizados para estudar a função de órgãos, detectar doenças precocemente e realizar terapias direcionadas. (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os radiofármacos de acordo com sua aplicação clínica e método de preparação. Eles podem ser divididos em diferentes categorias, como produtos radioativos prontos para uso, geradores de radionuclídeos, componentes não radioativos (kits) que exigem

marcação antes do uso e precursores utilizados na preparação de outras substâncias marcadas, como descrito a seguir nas quatro categorias principais (RAKIAS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FARMACOPEIA, 2019).

1. **Produtos radioativos prontos para uso:** São medicamentos que contêm o radionuclídeo pronto para aplicação direta em humanos, já na forma adequada para fins diagnósticos ou terapêuticos.
2. **Geradores de radionuclídeos:** São sistemas em que um radionuclídeo de curta meia-vida física, denominado "filho", é separado de um radionuclídeo "pai" através da eluição ou outro método, e é utilizado na preparação de radiofármacos.
3. **Componentes não radioativos (kits frios):** São frascos contendo componentes não radioativos de uma preparação radiofarmacêutica, esterilizados e prontos para serem reconstituídos ou combinados com um radionuclídeo antes da administração ao paciente.
4. **Precursores:** São substâncias utilizadas na marcação de outras substâncias antes da sua administração, permitindo a preparação personalizada de radiofármacos.

Esses produtos são essenciais na prática médica moderna, sendo necessários que sejam estéreis, livres de pirogênicos e submetidos a rigorosos controles de qualidade conforme as regulamentações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), garantindo a segurança e eficácia durante sua aplicação em pacientes (ANVISA, 2008; ANVISA; 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FARMACOPEIA, 2019; BRASIL, 2019).

3.3 Inflamação e infecção

A inflamação é uma resposta fisiológica essencial do organismo a uma variedade de estímulos nocivos, como lesões físicas, químicas e biológicas. Esse processo atua como uma defesa do organismo, visando neutralizar ou eliminar antígenos, além de iniciar o reparo tecidual (ABBAS *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2010). No entanto, em doenças autoimunes, a inflamação pode se tornar um

sintoma predominante, onde o sistema imunológico ataca os próprios tecidos do corpo, levando a danos contínuos e contribuindo para o desenvolvimento de patologias crônicas como artrite reumatoide, lúpus e esclerose múltipla (COSTA *et al.*, 2019).

A inflamação se manifesta como uma série de eventos bioquímicos e celulares que visam proteger o organismo e promover a homeostasia do órgão/tecido atingido, e em situações de lesão promover a cicatrização. Durante a inflamação, ocorre a dilatação dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular, migração de células de defesa (leucócitos) para o local afetado e liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e citocinas, resultando em sintomas como vermelhidão, calor, inchaço, dor e perda da função do membro acometido (ABBAS *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2010).

Por outro lado, a infecção é caracterizada pela invasão de MO, tais como bactérias, vírus, fungos ou parasitas. Esses MO têm a capacidade de colonizar tecidos e órgãos, e, uma vez dentro do corpo, causam danos aos tecidos e desencadeiam uma resposta imunológica específica para combater o invasor. Os sintomas de uma infecção variam conforme o tipo de agente patogênico e a localização da infecção, podendo incluir febre, dor localizada, inchaço, vermelhidão, secreções purulentas e mal-estar geral (HALL, 2021).

A inflamação e a infecção são processos diferentes embora frequentemente estejam interligados. É de suma importância diferenciar a inflamação estéril de infecção, pois a inflamação pode ocorrer sem a presença de um agente infeccioso, como no caso de lesões traumáticas e doenças autoimunes. Já a infecção sempre implica na presença de um MO que estão se multiplicando ativamente no organismo (HALL, 2021; KUMAR *et al.*, 2010; PALESTRO, 2020).

Se tratando de processos infecciosos, os pacientes imunocomprometidos são de grande preocupação médica. Esses pacientes são indivíduos cujo sistema imunológico está enfraquecido, isso pode ocorrer por diversas razões, incluindo doenças autoimunes, tratamentos como quimioterápicos para o câncer, transplantes de órgãos, uso prolongado de corticosteroides ou imunossupressores, infecção pelo HIV/AIDS, entre outros (MANDEL *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2010).

Devido à fragilidade do sistema imunológico, esses indivíduos possuem maior suscetibilidade a diversas infecções, incluindo as infecções nosocomiais. As infecções nosocomiais, também conhecidas como infecções hospitalares, são aquelas que se manifestam durante ou após a internação de um paciente e estão diretamente relacionadas a procedimentos médicos ou ao ambiente hospitalar. Essas infecções representam um grave problema de saúde global, contribuindo significativamente para a morbidade e mortalidade de pacientes internados. Elas podem ser causadas por uma variedade de agentes patogênicos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas. Os tipos mais comuns incluem infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções cirúrgicas (DIAS, 2015; KUMAR *et al.*, 2010; MANDEL *et al.*, 2010).

Pacientes hospitalizados e imunocomprometidos são particularmente vulneráveis a esses MO oportunistas, que, embora não representem uma ameaça significativa para indivíduos saudáveis, podem causar infecções graves nesses pacientes (MANDEL *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010).

As bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* (incluindo as cepas resistentes à metilina - MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* são as principais causadoras de infecções oportunistas. Essas bactérias podem provocar diversos tipos de infecções, como infecções do trato urinário, respiratórias, de feridas e septicemia, especialmente em pacientes com dispositivos médicos invasivos. Portanto, o diagnóstico precoce dessas condições é fundamental para o tratamento efetivo desses pacientes (MANDEL *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; CHAVES, 2020).

Além das infecções nosocomiais, outras patologias infecciosas e inflamatórias, como FOI, inflamação de origem desconhecida, osteomielite, infecção de próteses vasculares e articulares, pé diabético, endocardite, doença inflamatória intestinal, infecções neurológicas e infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos, também representam desafios diagnósticos (AKTER *et al.*, 2023; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

3.4 Diagnóstico de infecção e inflamação

O diagnóstico laboratorial de infecções envolve técnicas microbiológicas, sorológicas e moleculares, onde amostras biológicas são coletadas e analisadas no laboratório clínico. Métodos tradicionais como culturas microbianas (bactérias e fungos) são demorados, pois dependem do crescimento dos MO em cultura para sua identificação. Após o crescimento das colônias bacterianas, esses MO são isolados e passam por testes, como testes bioquímicos para sua identificação, e após por perfis de resistência aos antibióticos (antibiograma). Alguns MO podem ser detectados intermédio de exames sorologias (detecção de antígeno e anticorpo) e por via de biologia molecular, mas esses exames também possuem suas limitações e podem não oferecer resultados imediatos, carecendo de monitoramento em tempo real para determinar a patologia e ou localização da infecção) (MURRAY et al., 2004; TORTORA *et al.*, 2005 WILSON *et al.*, 2008; VALERO-MARTÍNEZ *et al.*, 2024).

O diagnóstico laboratorial de inflamação é realizado por meio da análise da amostra sanguínea do paciente, como o hemograma pela identificando do aumento de leucócitos (leucocitose), alteração na Velocidade de hemossedimentação (VHS) e pela análise de marcadores bioquímicos séricos anormais, como a proteína C reativa (PCR). Porém, essas alterações também estão presentes na infecção, e bem como não podem determinar o local específico da inflamação e ou infecção (VOLTARELLI, 1994).

O diagnóstico por imagem convencional tem sido grande aliado ao diagnóstico laboratorial na detecção de focos de infecção ou inflamação, que pode ser realizado por técnicas como a CT, RM e ultrassonografia. No entanto, essas técnicas estão baseadas em mudanças anatômicas para definir a lesão e, portanto, não podem ser utilizadas para detectar processos em fase inicial de desenvolvimento porque não ocorrem mudanças substanciais nesse período (DIAS, 2015; VALERO-MARTÍNEZ *et al.*, 2024).

Técnicas avançadas de diagnóstico por imagem molecular como MN podem ser necessárias para localizar e caracterizar lesões inflamatórias e ou infecciosas que não são visíveis em exames convencionais, principalmente em fases iniciais (VAHIDFAR *et al.*, 2024). A MN permite o diagnóstico preciso da

localização e extensão das infecções, superando métodos tradicionais como exame físico, histórico de pacientes e exames laboratoriais (SIGNORE, 2008).

3.5 Medicina nuclear no diagnóstico de infecção e inflamação

A MN oferece uma alternativa superior para o diagnóstico de infecções e processos inflamatórios estéreis. Diferente dos métodos tradicionais, como exame físico, histórico de pacientes e exames laboratoriais, a MN permite uma avaliação precisa da localização e extensão das infecções e inflamação (SIGNORE *et al.*, 2018; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Essa precisão é alcançada através do uso de radiofármacos específicos que podem revelar alterações moleculares e celulares e fornecer detecção sensível de focos inflamatórios e/ou infecciosos em um estágio inicial da doença. Esses avanços na utilização de radiofármacos na MN, e a utilização de equipamentos híbridos na aquisição da imagem, não apenas melhoram a precisão diagnóstica, mas também proporcionam percepções importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A capacidade de detectar infecções em estágios iniciais, monitorar a resposta ao tratamento e personalizar terapias baseadas em dados de imagem funcionais de alta resolução representa um marco importante no diagnóstico de doenças infecciosas e inflamatórias (LUPETTI, 2003; LAVINAS, 2004; VAN DER LAKEN, 2005; GEMEL, 2006; DIAS, 2015).

Diversos radiofármacos são empregados na MN para a detecção de infecções e inflamações, oferecendo uma alternativa avançada e precisa aos métodos diagnósticos convencionais (SIGNORE *et al.*, 2018; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

3.5.1 Radiofármacos marcados com Gálio-67 e Gálio-68

O [67Ga]Ga-citrato é um radiofármaco amplamente utilizado na MN para o diagnóstico de diversas condições, incluindo infecções, inflamações, neoplasias, estadiamento e acompanhamento da resposta terapêutica. O [67Ga]Ga-citrato emprega o radioisótopo ⁶⁷Ga, que possui uma meia-vida física relativamente longa ($T_{1/2} = 78,3$ horas). Essa característica física permite que os

profissionais de saúde obtenham imagens SPECT em diferentes momentos após a administração do radiofármaco nos pacientes, o que pode ser bastante útil no acompanhamento de determinadas patologias (AKTER *et al.*, 2023; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Uma das principais aplicações clínicas desse radiofármaco é na detecção de infecções ativas, como infecções de tecidos moles, osteomielite, na avaliação de infecções em pacientes imunocomprometidos, infecções oportunistas do trato respiratório, FOI e infecções por micobactérias como a tuberculose. O [67Ga]Ga-citrato se acumula nos locais de infecção devido a diversos mecanismos biológicos, como a ligação a lactoferrina e sideróforos bacterianos (HUGHES, 2003; AKTER *et al.*, 2023).

No entanto, apesar de seu uso consolidado na prática clínica, ele apresenta algumas limitações importantes. Ele é um radiofármaco relativamente inespecífico, pois também se acumula em processos inflamatórios e em condições oncológicas. Isso pode dificultar a diferenciação entre infecção e outras condições inflamatórias ou neoplásicas, o que é fundamental para o manejo adequado dos pacientes. Além disso, o [67Ga]Ga-citrato apresenta uma lenta depuração sanguínea, o que requer imagens tardias de 48h podendo chegar de 72-96 horas (SALMANOGLU *et al.*, 2018; SIGNORE *et al.*, 2019).

Em comparação a outros radiofármacos utilizados para imagem de infecção, como os baseados em ^{99m}Tc e ⁶⁸Ga, o [67Ga]Ga-citrato apresenta algumas desvantagens. Esses outros radiofármacos, como o [^{99m}Tc]Tc-HMPAO e o [68Ga]Ga-sideróforos, têm demonstrado maior especificidade para a detecção de infecções, com melhor capacidade de diferenciar processos infecciosos de inflamatórios (AKTER *et al.*, 2023; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

O radioisótopo ⁶⁸Ga possui uma meia-vida física mais curta ($T_{1/2} = 68$ minutos), o que facilita a aquisição de imagens por PET em um intervalo de tempo mais adequado após a administração do radiofármaco (AKTER *et al.*, 2023). Isso resulta em uma menor exposição do paciente à radiação. Um exemplo interessante é o [68Ga]Ga-DFO-B, que utiliza o quelante desferrioxamina-B (DFO-B) para complexar o ⁶⁸Ga. Estudos iniciais têm demonstrado que esse radiofármaco apresenta uma capacidade aprimorada de detecção e diferenciação entre infecção e inflamação, em comparação aos radiofármacos convencionais

(PETRIK M *et al.*, 2021).

3.5.2 Flúor-18-FDG

O diagnóstico utilizando [¹⁸F]FDG também conhecido como FDG-PET, é uma técnica de imagem avançada por PET para detectar infecções e inflamações no corpo humano. O FDG, um análogo da glicose, é absorvido pelas células metabolicamente ativas, incluindo células inflamatórias e infectadas, devido à sua alta taxa de consumo de glicose. Essa característica permite que o FDG-PET visualize e quantifique a atividade metabólica em tecidos anômalos, diferenciando áreas de infecção de inflamação. A técnica é altamente sensível, proporcionando imagens detalhadas que auxiliam no diagnóstico preciso e na avaliação da extensão de diversas condições inflamatórias e infecciosas. Porém, como outras células também possuem alta afinidade à glicose, o FDG-PET pode gerar falsos positivos. E por conta disso não pode ser considerado um método específico. Outras limitações é que FDG-PET é limitado para rastrear inflamações e infecções devido à sua meia-vida física curta ($T_{1/2} = 110$ minutos), alto custo pela da necessidade de possuir um ciclotron para produção ou depender um uma clínica próxima que produza ¹⁸F-FDG (SALMANOGLU *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

3.5.3 Leucócitos marcados

A marcação de leucócitos, também conhecida como marcação de células brancas do sangue (*white blood cells – WBC*), é uma técnica amplamente utilizada na MN para o diagnóstico de infecções e processos inflamatórios. Esse procedimento envolve a extração de leucócitos do paciente, sua marcação com um radioisótopo e posterior reinfusão, permitindo o rastreamento desses leucócitos marcados no organismo (VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Historicamente, a técnica de marcação de leucócitos teve início na década de 1970, com o desenvolvimento do radiofármaco ¹¹¹In oxina ([¹¹¹In]In-oxina). Esse radiofármaco foi amplamente empregado por muitos anos como o padrão-ouro para a marcação de leucócitos devido sua estabilidade e longa meia-vida física ($T_{1/2} = 67,2$ h), que possibilita o monitoramento da migração leucocitária

ao longo de vários dias. Essa característica é especialmente importante em contextos clínicos que requerem observações prolongadas. No entanto, com o passar do tempo, o [^{99m}Tc]Tc-HMPAO ganhou destaque como uma alternativa mais vantajosa. Esse radiofármaco apresenta diversas características favoráveis em comparação ao [^{111}In]In-oxina, como uma melhor qualidade de imagem, menor exposição à radiação, fácil obtenção e maior disponibilidade devido à sua produção a partir de geradores de ^{99m}Tc e o seu baixo custo (BRIGANTI *et al.*, 2020; SIGNORE *et al.*, 2019; DIAS, 2015). Após a marcação, os leucócitos marcados são reinfundidos no paciente e migram para os sítios de infecção ou inflamação, onde podem ser detectados por técnicas de imagem nuclear, como a varredura SPECT. O [^{99m}Tc]Tc-HMPAO possui algumas limitações, a marcação de leucócitos é demorada e deve ocorrer em ambiente estéril, em fluxo laminar (disponibilidade limitada nos serviços de MN) e dependendo do manuseio pode trazer riscos de contaminação para o paciente e para o operador que está efetuando a marcação (SIGNORE *et al.*, 2019; DIAS, 2015; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Uma nova abordagem na marcação de leucócitos envolve o uso do radioisótopo ^{18}F , que possui características físicas atraentes para aplicações em imagem por PET. O desenvolvimento da técnica de marcação de leucócitos com 2- ^{18}F FDG (2-desoxi-2- ^{18}F fluoro-D-glicose) tem sido um foco de pesquisa nos últimos anos, e tem sido empregada no diagnóstico de FOI, HIV e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pé diabético, infecção prostéticas, tuberculose, sarcoidose e osteomielite (KUNG *et al.*, 2019). O 2- ^{18}F FDG é um análogo da glicose marcado com ^{18}F , que é internalizado pelos leucócitos ativados, permitindo o rastreamento desses leucócitos marcados nos sítios de infecção e inflamação (KUNG *et al.*, 2019; CHAVES, 2020; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Em comparação à marcação de leucócitos com radioisótopos de ^{99m}Tc e ^{111}In , o 2- ^{18}F FDG-WBC oferece algumas vantagens potenciais, como maior resolução espacial, maior especificidade na diferenciação entre infecção e inflamação e redução da exposição à radiação. No entanto, a técnica de marcação de leucócitos com 2- ^{18}F FDG também enfrenta limitações, como a complexidade do procedimento, meia-vida física curta do ^{18}F , maior risco de exposição radiológica para o operador que está realizando a marcação, o custo elevado e a

disponibilidade limitada em alguns serviços de MN (SIGNORE *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2019; VAHIDFAR *et al.*, 2024; CHAVES, 2020).

3.5.4 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm se destacado na pesquisa de novos radiofármacos, especialmente marcados com ^{99m}Tc , como a Ubiquidina (UBI) [29-41], [^{99m}Tc]Tc-UBI-29–41, para diagnóstico de infecções e diferenciação de processos inflamatórios. Apesar de compostos radiomarcados como imunoglobulinas e antibióticos terem limitações, os peptídeos antimicrobianos são promissores devido à sua capacidade de distinção entre infecção e inflamação e à sua resistência antimicrobiana. Estes peptídeos, de 5-7 kDa, produzidos por várias células do sistema imunológico, possuem uma carga positiva que interage eletrostaticamente com a superfície negativa das bactérias, formando poros nas membranas e levando a lise bacteriana (DIAS, 2015; EBENHAN *et al.*, 2014; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

Em estudos em modelo animal o [^{99m}Tc]Tc-UBI-29–41 mostrou potencial na detecção de infecção por *Staphylococcus aureus* realizados em camundongos com miosite. Em um pequeno estudo clínico subsequente, em pacientes com suspeita de infecções ósseas, de tecidos moles ou de próteses, foi possível localizar os focos infecciosos, com uma visualização otimizada após 30 minutos (EBENHAN *et al.*, 2018; AKTER *et al.*, 2023).

Além do ^{99m}Tc , esse PAM promissor foi também marcado com ^{68}Ga , utilizando dois quelantes bastante conhecidos, o NOTA e o DOTA. Nos testes pré-clínicos, ele manteve sua capacidade de identificar infecções. Um estudo piloto em pacientes com doenças como pé diabético, celulite e fraturas foi realizado para avaliar a eficácia do marcador [^{68}Ga]Ga-DOTA-UBI na localização das infecções. Apesar dos resultados iniciais positivos, o marcador não conseguiu detectar infecções em alguns pacientes que tinham culturas positivas (BHUSARI *et al.*, 2019; AKTER *et al.*, 2023).

A pesquisa com PAMs radiomarcados continua a avançar, na esperança de desenvolver novas ferramentas que possam ser usadas na prática clínica para detectar infecções com precisão, especialmente em situações em que

os métodos tradicionais falham. A capacidade desses peptídeos de se ligarem especificamente aos patógenos, combinada com a possibilidade de serem marcados com radionuclídeos, abre caminho para um diagnóstico mais rápido e preciso, ajudando a localizar as infecções em tempo real (DIAS, 2015; EBENHAN *et al.*, 2014; VAHIDFAR *et al.*, 2024).

3.5.5 Anticorpos marcados com ^{99m}Tc

Os anticorpos monoclonais (mAbs) específicos para antígenos de superfície de granulócitos, têm sido amplamente utilizados na detecção de focos infecciosos e inflamatórios pela marcação com isótopos radioativos. Entre as categorias mais evidenciadas estão a imunoglobulina G (IgG) anti - antígeno carcinoembrionário não específico (NCA) 95 (NCA-95), o fragmento Fab anti-NCA-90 e o anti-CD15. Esses mAbs são radiomarcados, frequentemente com o ^{99m}Tc , e tem demonstrado alta sensibilidade na identificação de áreas inflamadas ou infectadas, o que é crucial para o diagnóstico preciso. No entanto, algumas limitações foram observadas, como a baixa ligação dos mAbs aos granulócitos, a penetração tecidual limitada e a depuração lenta, requerendo imagens tardias (VAHIDFAR *et al.*, 2024; MELLER *et al.*, 2010).

Apesar das suas limitações, os mAbs marcados com ^{99m}Tc continuam sendo opções úteis no diagnóstico de inflamação e infecção. O BW 250/183 é um mAbs murino IgG1 radiomarcado com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -besilesomab), que se liga ao antígeno NCA-95, uma glicoproteína de superfície expressa em células do sistema imune, como os neutrófilos maduros e precursores mieloides (MELLER *et al.*, 2010).

A molécula de besilesomab tem um peso molecular de aproximadamente 150 kDa, o que lhe permite interagir especificamente com os granulócitos. A capacidade do ^{99m}Tc -besilesomab de se ligar aos granulócitos ativados e sua migração para os focos infecciosos tornam-no uma ferramenta valiosa na MN, e em 2010 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou a sua comercialização sob o nome comercial Scintimun®, sendo um radiofármaco para o diagnóstico de inflamações e infecções ósseas, como osteomielite. Além da osteomielite, esse radiofármaco pode possuir outras aplicações diagnósticas

como a FOI, endocardite infecciosa, enxertos vasculares e artrite reumatoide, mas são necessários mais estudos para avaliação da eficácia diagnóstica nessas patologias (RICHTER *et al.*, 201; MELLER *et al.*, 2010; BECKER *et al.*, 1989; BECKER *et al.*, 1994).

Como citado anteriormente, apesar das suas vantagens o uso do ^{99m}Tc -besilesomab apresenta alguns desafios, a porcentagem de anticorpos que permanece livre na circulação e no local da infecção por interações não específicas é superior a porcentagem que se liga aos neutrófilos circulantes (10%) (MELLER *et al.*, 2010; BECKER *et al.*, 1989; BECKER *et al.*, 1994).

3.5.6 Antibióticos marcados com ^{99m}Tc

Os antibióticos marcados têm sido amplamente investigados como uma estratégia para o desenvolvimento de radiofármacos capazes de detectar e localizar infecções microbianas de maneira mais específica. Essa abordagem se baseia na capacidade dos antibióticos de se acumularem seletivamente em sítios de infecção, o que poderia ser explorado para fins de imagem diagnóstica em MN (VALERO-MARTÍNEZ *et al.*, 2024).

Essas moléculas oferecem vantagens como marcação simples, sem manipulação de material biológico contaminante, e capacidade de localizar focos infecciosos precocemente. Assim, os antibióticos radiomarcados surgem como uma promissora alternativa no diagnóstico de processos infecciosos, superando limitações dos radiofármacos convencionais. Contudo, são necessários estudos adicionais para consolidar sua aplicação clínica e aprimorar sua especificidade diagnóstica (AULETTA *et al.*, 2016; PALESTRO, 2020; JIANG *et al.*, 2023).

Um dos antibióticos mais estudados para a marcação é a ciprofloxacina com ^{99m}Tc (^{99m}Tc]Tc-ciprofloxacina). Estudos avaliaram o desempenho desse radiofármaco na detecção de infecções, com resultados mistos. Algumas limitações observadas incluíram a formação de diferentes espécies radiomarcadas com biodistribuição variada, o que pode comprometer a especificidade promovendo uma captação inespecífica em processos inflamatórios estéreis (VALERO-MARTÍNEZ *et al.*, 2024). Como no estudo clínico que demonstrou a inabilidade desse radiofármaco em diferenciar entre pacientes sintomáticos com

doenças osteoarticulares infectadas e assépticas (SARDA *et al.*, 2003).

Recentemente, novas classes de antibióticos estão sendo estudadas e testadas com marcação por ^{99m}Tc , como fluconazol, anfotericina B e norfloxacino e Doxiciclina (DOX) (CHAVES, 2020; JIANG *et al.*, 2023; İLEM-OZDEMIR *et al.*, 2013).

O [^{99m}Tc]Tc-anfotericina B ([^{99m}Tc]Tc-AMB), utilizando o antifúngico anfotericina B marcado com ^{99m}Tc , demonstrou captação tanto em infecções por *Staphylococcus aureus* quanto por *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente, um estudo *in vitro* reavaliou esse radiofármaco, bem como seu análogo marcado com ^{68}Ga , identificando captação em *A. fumigatus* e *Rhizopus arrhizus*. Por outro lado, o [^{99m}Tc]Tc-fluconazol, empregando o antifúngico fluconazol marcado com ^{99m}Tc , conseguiu detectar infecções por *Candida albicans*, mas não por *Aspergillus fumigatus* (AKTER *et al.*, 2023).

Em relação aos antibióticos para infecções bacterianas, o derivado de norfloxacino com HYNIC (ácido hidrazinonicotínico), marcado com ^{99m}Tc ([^{99m}Tc]Tc-EDDA-HYNICNF), demonstrou, em estudos *in vivo* utilizando um modelo animal de infecção bacteriana, uma captação significativamente maior no abscesso bacteriano induzido por *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) quando comparado a outros radiofármacos, como [^{99m}Tc]Tc-ciprofloxacina e [^{99m}Tc]Tc-norfloxacina. Além disso, este composto foi capaz de diferenciar de forma eficaz os focos de infecção bacteriana dos focos de inflamação estéril. No entanto, é necessário o desenvolvimento de mais estudos envolvendo outras cepas bacterianas para confirmar a eficácia e a especificidade desse radiofármaco (JIANG *et al.*, 2023).

A DOX é um antibiótico barato e de amplo espectro com uma atividade bacteriostática contra uma variedade de MO, dentre eles bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse antibiótico também vem sendo testado e marcado com ^{99m}Tc para obtenção de [^{99m}Tc]Tc-DOX, demonstrando nos estudos uma alta pureza radioquímica e uma boa captação de imagem de infecção em modelo animal, possuindo resultados promissores para diagnóstico de infecção e inflamação (İLEM-OZDEMIR *et al.*, 2013; İLEM-OZDEMIR *et al.*, 2014).

3.6 Antibióticos

Os antibióticos são compostos químicos que podem ser produzidos por MO (de origem natural), semissintéticos (derivados de antibióticos de origem natural) ou sintetizados em laboratório. Eles possuem a capacidade de inibir o crescimento de outros MO (bacteriostáticos) ou destruí-los (bacteriolíticos), desempenhando um papel fundamental no tratamento de infecções bacterianas. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, marcou o início de uma revolução na medicina, proporcionando uma forma eficaz de tratar diversas doenças infecciosas que, até então, resultavam em altas taxas de mortalidade (FLEMING, 1929; POUPARD, 2015; LEEKHA *et al.*, 2011).

Existem várias classes de antibióticos, cada uma com suas características específicas. Cada classe possui um mecanismo de ação distinto, um espectro de atividade variado e perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos próprios. Por exemplo, enquanto as penicilinas atuam interferindo na síntese da parede celular bacteriana, as tetraciclina impedem a síntese proteica nas bactérias (BRUNTON, *et al* 2018; LEEKHA *et al.*, 2011).

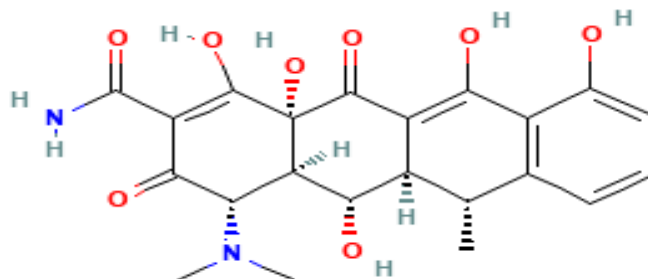
Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas e dentre outros). Além disso, existem os antibióticos de origem sintética, que são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES *et al.*, 2010; PUPO *et al.*, 2006; LEEKHA *et al.*, 2011).

3.6.1 Doxiciclina

O Hiclato de Doxiciclina, de fórmula molecular $C_{22}H_{26}N_2O_9$, é uma tetraciclina de segunda geração que foi obtido a partir da modificação da molécula de oxitetraciclina. A DOX possui o nome químico: 4- (dimetilamino)- 1,4,4^a,5,5^a,6,11,12^a-octaidro-3,5,10,12,12^a-pentaidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboximidaetanolado hidratado, e estrutura química conforme

representado na Figura 1 (PUBCHEM, 2004; REYNOLDS, 2007).

Figura1 - Estrutura química da DOX.



Fonte: PUBCHEM, 2004

A DOX é lipossolúvel, o que significa que ela possui afinidade por membranas celulares e tecidos lipídicos. Essa propriedade facilita significativamente sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e penetrar em diferentes compartimentos do organismo. Essa característica a permite distribuir-se amplamente nos tecidos, incluindo áreas de inflamação e fluidos corporais, onde as concentrações do fármaco podem ser essenciais para o tratamento eficaz de infecções localizadas (GRIFFIN *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação da DOX envolve a inibição da síntese proteica bacteriana. Ela se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a ligação do RNA mensageiro (mRNA) ao ribossomo e, conseqüentemente, a adição de novos aminoácidos à cadeia polipeptídica em formação. Essa interrupção da tradução do mRNA é essencial para a produção de proteínas bacterianas, resultando na inibição do crescimento e da replicação das bactérias. Devido a esse mecanismo, a DOX é considerada bacteriostática, ou seja, impede a multiplicação das bactérias, permitindo que o sistema imunológico do hospedeiro as elimine. (PUBCHEM, 2004; GRIFFIN *et al.*, 2010; LEEKHA *et al.*, 2011).

Por conta das suas características e baixo custo a DOX é indicada para o tratamento de diversas infecções bacterianas e entre outros MO devido à sua eficácia e ao seu espectro de atividade. Entre as principais indicações estão infecções respiratórias, como sinusite, bronquite e pneumonia atípica; infecções geniturinárias, como uretrite e cervicite causadas por *Chlamydia trachomatis*; e

infecções dermatológicas, como acne vulgar e rosácea. Além disso, é eficaz no tratamento de doenças transmitidas por vetores, como a doença de Lyme, e outras infecções associadas a MO sensíveis à tetraciclina (FUOCO, 2012; TARIQ, 2018; GRIFFIN *et al.*, 2010).

A DOX é eficaz contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra MO intracelulares e algumas espécies de protozoários (BRUNTON *et al.*, 2018; LEEKHA *et al.*, 2011).

Sendo esses os principais MO:

1. Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*.
2. Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae*.
3. Microrganismos intracelulares: *Chlamydia trachomatis*, *Rickettsia spp.* (incluindo *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa das Montanhas Rochosas).
4. Outros microrganismos: *Borrelia burgdorferi* (causadora da doença de Lyme transmitida por carrapatos) e *Mycoplasma pneumoniae*.

Essa ampla cobertura antimicrobiana faz da DOX um antibiótico versátil e amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por diversos patógenos (PFIZER BRASIL LTDM., 2024)

3.7 Tecnécio-99m

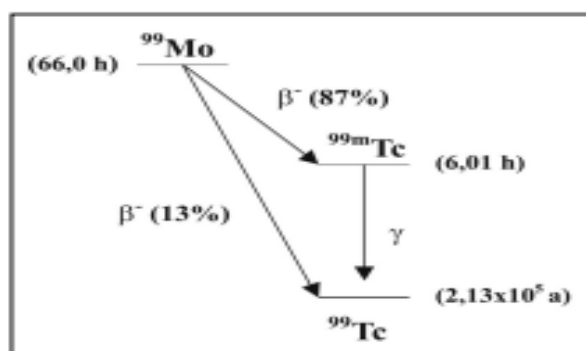
O ^{99m}Tc é um isótopo radioativo utilizado rotineiramente na MN para diagnóstico de uma ampla variedade de patologias. Sua utilização é baseada na sua fácil obtenção pelos geradores, baixo custo e pelas suas propriedades físicas e nucleares específicas que o tornam ideal para exames de imagem, e quando ligados a moléculas específicas que carregam permitindo a visualização de órgãos e tecidos específicos (BOSCHI, 2019; MARQUES *et al.*, 2001).

O ^{99m}Tc caracteriza-se pela emissão de um fóton único, radiação gama com energia pura de 140 keV e uma meia-vida física de curta duração, com uma meia-vida física de cerca de 6 horas ($T_{1/2} = 6.01$ h), isso significa que sua

atividade radioativa diminui pela metade a cada 6 horas, como demonstra a Figura 2. Essa característica física é o que torna possível administrá-lo com segurança nos pacientes e o que o torna ideal para exames de cintilografia e SPECT-CT. Após algumas horas, a radiação emitida pelo ^{99m}Tc se torna insignificante, minimizando os riscos associados à exposição à radiação (BOSCHI, 2019; CHERRY et al., 2013; BRIGANTI et al., 2020).

A menor captação fisiológica hepática e intestinal do ^{99m}Tc reduz a interferência de fundo nas imagens, melhorando a sensibilidade e especificidade na detecção de infecções. Além disso, a carga de radiação menor do ^{99m}Tc permite doses mais altas serem administradas com segurança, o que resulta em imagens de melhor qualidade e menor risco para o paciente (BRIGANTI et al., 2020).

Figura 2 - Diagrama de decaimento de ^{99}Mo para ^{99m}Tc



Fonte: MARQUES *et al.*, 2001

A produção do ^{99m}Tc é realizada a partir do decaimento do ^{99}Mo com uma meia-vida física de ($T_{1/2} = 66$ horas), que é gerado em reatores nucleares. O ^{99}Mo é obtido a partir do bombardeamento de barras de urânio enriquecido com nêutrons, resultando na produção de isótopos que incluem o ^{99}Mo . Após o processo de bombardeamento, o ^{99}Mo é extraído das barras de urânio e passa por um processo de purificação para garantir sua alta pureza e qualidade (MARQUES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Uma vez obtido o ^{99}Mo , ele é utilizado como fonte para a produção do ^{99m}Tc . No Brasil, esse dispositivo é produzido no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN), como demonstra a Figura 3. O Gerador-Ipen-Tec

é composto por uma coluna cromatográfica que contém alumina (Al_2O_3) como suporte, na qual o ^{99}Mo é adsorvido. O ^{99}Mo , por sua vez, decai para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

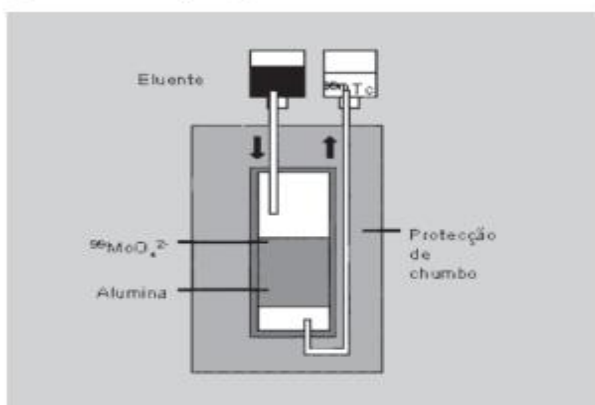
Figura 3 - Gerador-IPEN-TEC[®]. Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$



Fonte: CNEN, 2015

A afinidade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pela alumina é baixa, o que permite que ele seja facilmente eluído da coluna por meio da passagem de uma solução de cloreto de sódio 0,9% estéril, fornecendo o pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$). Esse gerador é equipado com agulhas de aço inoxidável para entrada e saída do líquido eluente, que é direcionado ao frasco coletor, como ilustrado na Figura 4. O $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ é então extraído do gerador, purificado e utilizado para a preparação de radiofármacos que serão administrados nos pacientes durante os exames de MN. (MARQUES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Figura 4 - Desenho representativo do Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2006

3.8 Marcação com $^{99m}\text{TcO}_4^-$

Os procedimentos de marcação são realizados em condições assépticas, seguindo as normas de boas práticas de fabricação (BPF). O ^{99m}Tc é um radionuclídeo utilizado em quase 80% dos exames de imagem por MN. Isso ocorre pela possibilidade de ele atingir vários estados de oxidação e de coordenação dando origem a diferentes radiofármacos, a partir da simples reconstituição de conjuntos liofilizados (OLIVEIRA *et al.*, 2006; DIAS, 2015).

A preparação do radiofármaco contendo ^{99m}Tc varia de acordo com o tipo de exame a ser realizado. Em geral, o ^{99m}Tc é ligado a uma molécula específica, chamada de ligante, que tem afinidade por um órgão ou tecido específico. O ^{99m}Tc se liga a ligantes por meio de reações de complexação, porém, na forma $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, o ^{99m}Tc apresenta um estado de oxidação 7+ que é bastante estável em solução aquosa, e nesse estado de oxidação o ^{99m}Tc não pode se ligar nos ligantes para constituir os radiofármacos de interesse. Tornando-se necessário à sua redução para estados oxidação mais baixos (3+, 4+ ou 5+) com a utilização do cloreto estânico (SnCl_2) na solução, e assim realizar a marcação com o ligante de interesse (MARQUES *et al.*, 2001).

Por conta desse motivo, a maioria dos kits frios para marcação com ^{99m}Tc são compostos com o ligante em conjunto com SnCl_2 , também são acrescentados outros aditivos como os antioxidantes para inibir a autoradiólise, evitando a sua degradação e aumentando a estabilidade do produto marcado (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.8.1 Marcação direta

Na marcação direta, o radionuclídeo ^{99m}Tc é ligado diretamente à molécula alvo sem a necessidade de um intermediário ou quelante. Este método é simples e rápido, envolvendo reações químicas que permitem a incorporação direta do tecnécio à molécula. O ^{99m}Tc é obtido na forma de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ precisa ser reduzido a um estado de oxidação menor (geralmente Tc^{4+} ou Tc^{5+}) para se complexar diretamente à molécula alvo. Como já descrito, a redução é frequentemente realizada utilizando um agente redutor, como o SnCl_2 . Após a redução, o ^{99m}Tc interage diretamente com grupos funcionais presentes na

molécula alvo (moléculas, peptídeos, anticorpos), formando um complexo estável (JURISSON *et al.*, 1993; RAKIAS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

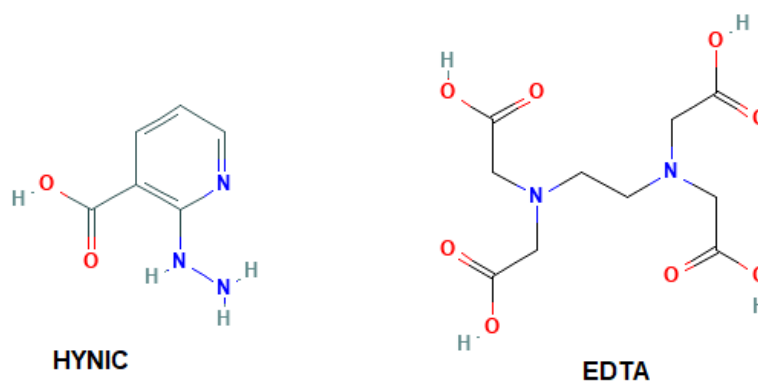
3.8.2 Marcação indireta

Na marcação indireta, após a redução o ^{99m}Tc é primeiro ligado a um agente quelante ou intermediário, como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e HYNIC, que posteriormente se liga à molécula alvo (JIANG *et al.*, 2023; MESZAROS *et al.*, 2010).

O EDTA de fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, conforme mostra a figura 5, é um agente quelante comum e facilmente obtido, que atua como um quelante bifuncional, permitindo a ligação do ^{99m}Tc na molécula formando um complexo. Segundo Qi *et al.* (2015), a propriedade do EDTA de se ligar tanto ao ^{99m}Tc quanto ao metronidazol foi crucial, pois possibilitou a marcação do radioisótopo ao composto alvo, criando um radiofármaco promissor [^{99m}Tc]Tc-EDTA-MN para o imageamento de regiões tumorais hipóxicas.

O HYNIC de fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, conforme demonstra a figura 5, é um importante quelante bifuncional utilizado para marcação de moléculas com ^{99m}Tc . Sua estrutura consiste em um anel de piridina ligado a um grupo hidrazina, que confere reatividade química para conjugação com biomoléculas como proteínas e peptídeos (MESZAROS *et al.*, 2010).

Figura 5 - Estrutura do HYNIC e EDTA.



Fonte: PUBCHEM, 2004

O mecanismo de ação do HYNIC envolve a formação de um complexo

de coordenação com o ^{99m}Tc . O grupo hidrazina do HYNIC pode se ligar a um átomo de tecnécio, porém este não é capaz de preencher completamente a esfera de coordenação do metal. Portanto, são necessários co-ligantes adicionais, como a tricina, TPPTS (trifenilfosfina trissulfonada) e ácido nicotínico, para completar a esfera de coordenação e estabilizar o complexo (MESZAROS *et al.*, 2010).

Um dos co-ligantes frequentemente utilizados é o EDDA (ácido etilenodiamino diacético), um quelante similar ao EDTA. O EDDA também se liga ao ^{99m}Tc , formando um complexo ternário com o HYNIC. Essa estratégia permite obter complexos de ^{99m}Tc com HYNIC mais estáveis e homogêneos em termos estruturais, melhorando as propriedades *in vivo* dos radiofármacos (JIANG *et al.*, 2023).

A utilização de co-ligantes é relevante para otimizar as características dos complexos de ^{99m}Tc com HYNIC, tais como a eficiência de marcação, a estabilidade *in vivo* e a biodistribuição adequada para aplicações de imagem molecular. Dessa forma, o HYNIC associado a co-ligantes selecionados representa uma abordagem versátil e eficiente para a radiomarcagem de biomoléculas com ^{99m}Tc (JIANG *et al.*, 2023; MESZAROS *et al.*, 2010).

Um exemplo da aplicação da marcação indireta utilizando o co-ligante EDDA é o [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-PSMA, que recentemente foi testado em quase 150 pacientes com recidiva bioquímica após prostatectomia radical e demonstrou altas taxas na captação e detecção do câncer de próstata (LI BO *et al.*, 2022).

Jiang *et al.* (2023) afirmam que a escolha do co-ligante EDDA no radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-EDDA-HYNICNF, permitiu obter um complexo com melhor perfil farmacocinético e capacidade de diferenciar infecção bacteriana de inflamação, em comparação a outros co-ligantes avaliados.

3.9 Controle de qualidade

A realização de um controle de qualidade rigoroso é essencial para assegurar a qualidade e a segurança dos radiofármacos empregados na MN, promovendo diagnósticos e tratamentos adequados para os pacientes. O controle de qualidade inclui testes físico-químicos, que avaliam impurezas radionuclídicas e radioquímicas, pH, força iônica, osmolaridade e testes biológicos, que verificam

a esterilidade, apirogenicidade, toxicidade e biodistribuição, como os exemplos descritos a seguir (MARQUES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FARMACOPEIA, 2019):

3.9.1 Controle de qualidade físico-químico

- Medida de pH: Verifica-se o nível de acidez ou alcalinidade da solução, importante para a estabilidade e segurança do produto.
- Pureza Radionuclídica: Verifica-se a presença de radionuclídeos indesejados que podem ter surgido durante a produção, acarretando a exposição do paciente a radiações indesejadas, toxicidade e imagens de baixa qualidade.
- Pureza Química: Avalia-se a presença de contaminantes químicos que podem interferir na segurança e eficácia do produto, como a presença de Al^{+3} no eluato de ^{99m}Tc .
- Pureza Radioquímica: Confirma-se que o radionuclídeo está na forma química correta e desejada, evitando formas indesejadas como coloides e formas livres do radionuclídeo que possam reduzir a eficácia do radiofármaco e causar a baixa qualidade da imagem.
- Estabilidade: Testa-se a durabilidade do radiofármaco ao longo do tempo, garantindo que ele mantenha suas propriedades até o momento do uso (OWUNWANNE *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FARMACOPEIA, 2019; BRASIL, 2019).

3.9.2 Controle de qualidade biológico

- Esterilidade: Realizam-se testes microbiológicos para se assegurar que o radiofármaco esteja livre de MO viáveis que possam causar infecções aos pacientes.
- Apirogenicidade: Verifica-se a ausência de substâncias pirogênicas, que poderiam causar febre e outras reações adversas.
- Biodistribuição: Estuda-se como o radiofármaco se distribui pelo corpo de pequenos animais de experimentação, assegurando que uma porcentagem se acumule nos locais desejados e não vá para tecidos indesejados.

- Toxicidade: Avalia se o radiofármaco provoca efeitos tóxicos, garantindo que ele seja seguro para administração em humanos (MARQUES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FARMACOPEIA, 2019; ANVISA, 2022; BRASIL, 2019).

3.9.3 Cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada para ^{99m}Tc

A cromatografia em papel (CP) e a cromatografia em camada delgada (CCD) que utiliza uma camada fina de fase estacionária (normalmente sílica gel ou alumina) sobre uma placa de suporte, são técnicas fundamentais no controle radioquímico de radiofármacos, utilizadas para analisar a pureza radioquímica. A CP e CCD baseiam-se na diferença na velocidade de migração dos componentes da marcação através de uma fase estacionária (papel) imersa em uma fase móvel (solvente). O procedimento começa com a preparação da fita cromatográfica, em comprimento adequado. Em seguida, o radiofármaco é aplicado em pequena quantidade como uma mancha na linha de origem da corrida cromatográfica. A fita é então colocada em um recipiente contendo o solvente, que sobe por capilaridade. Após o desenvolvimento, o papel é seco e cortado em pedaços de tamanho adequado, e a contagem da radioatividade (contagem por minuto, CPM) é efetuada em um contador Gama, e em seguida são realizados cálculos para determinar a porcentagem de pureza radioquímica (DEGANI *et al.*, 1998; SCOTT, 2003; SAHA *et al.*, 2004).

No controle radioquímico, CP e CCD são usados para separar diferentes componentes, identificando formas químicas de ^{99m}Tc , como o tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$), $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o produto marcado. Além disso, facilita a avaliação da pureza radioquímica (DIAS, 2015; MARQUES *et al.*, 2001).

As impurezas radionuclídicas, por exemplo, podem surgir durante a produção do radionuclídeo, enquanto as impurezas radioquímicas resultam da decomposição do radiofármaco devido a fatores como solventes, temperatura, pH, luz, e agentes oxidantes ou redutores. A técnica cromatográfica é comumente utilizada para detectar essas impurezas (OWUNWANNE *et al.*, 1995; SAHA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Ao se realizar o exame diagnóstico, por exemplo, o resultado almejado

é o produto marcado com alta pureza radioquímica (>90%), que após a injeção no paciente tem um rápido clareamento sanguíneo, biodistribuição, chegando no tecido/órgão de interesse promovendo uma boa captação e imagem. Quando ocorre a formação de impurezas, estas podem causar efeitos adversos no paciente. A presença de tecnécio livre no radiofármaco tem afinidade por órgãos como a tireoide e as glândulas salivares, já o tecnécio reduzido hidrolisado tem afinidade por órgãos de sistema digestório (METTLER *et al.*, 2012; DEGANI *et al.*, 1998; SCOTT, 2003; SAHA *et al.*, 2004).

Portanto, o controle de qualidade radioquímico dos radiofármacos, é fundamental para garantir que esses produtos resultem diagnósticos precisos e tratamentos seguros e eficazes para os pacientes (ANVISA; 2022; MARQUES *et al.*, 2001).

3.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês High Performance Liquid Chromatography, HPLC) é uma técnica de separação utilizada no controle de qualidade de radiofármacos e outros compostos, baseada na separação dos componentes de uma amostra através de uma coluna preenchida com uma fase estacionária e a utilização de uma fase móvel líquida que flui sob alta pressão (ALMEIDA, 2009; SCOTT, 2003; RAMOS, 2014).

O processo de controle de qualidade com HPLC envolve várias etapas. Primeiro, a amostra do radiofármaco normalmente é diluída para adequar-se às condições da análise por HPLC. A fase móvel (solvente ou mistura de solventes) e a fase estacionária (coluna de HPLC) são selecionadas de acordo com as propriedades químicas do produto e das impurezas esperadas. À medida que a amostra passa pela coluna, os diferentes componentes se separam com base em suas interações com a fase estacionária e a fase móvel. Componentes com diferentes polaridades, tamanhos ou afinidades químicas serão eluídos da coluna em diferentes tempos (tempos de retenção). Os componentes separados são detectados por um detector adequado, como um detector radioativo, UV-VIS ou de fluorescência, dependendo do tipo de molécula que compõe o radiofármaco. O detector gera um cromatograma, um gráfico que mostra os picos correspondentes

aos diferentes componentes. Os tempos de retenção dos picos são comparados com padrões conhecidos para identificar os componentes, e a área sob cada pico é usada para quantificar a quantidade de cada componente presente na amostra (ALMEIDA, 2009; CASS *et al.*, 2001; HARRIS, 1995; COLLINS; 1997; RAMOS, 2014).

A pureza radioquímica do radiofármaco é determinada pela proporção de área ou de altura do pico correspondente ao composto desejado em relação ao total de picos no cromatograma. A presença de impurezas ou tecnécio livre é avaliada. A importância do controle de qualidade por HPLC é múltipla, podendo separar composto marcados de massa e composição próximas, resultante da degradação do radiofármaco que não poderia ser avaliado por CP ou CCD. Em contrapartida, compostos de baixa afinidade com a coluna C18, como $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou $^{99m}\text{TcO}_2$ são mais bem quantificados por técnicas como CP e CCD (MARQUES *et al.*, 2001; CASS *et al.*, 2001; HARRIS, 1995; COLLINS; 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O IPEN, através do Centro de Radiofarmácia, possui a infraestrutura e os recursos financeiros necessários para a condução segura dos experimentos e controles de qualidade previstos neste estudo, com pessoal, equipamentos e instalações adequados.

4.1.2 Equipamentos e materiais

1. Contador Gama Hidex com detector de iodeto de sódio;
2. HPLC Shimadzu modelo LC-20A;
 - Software Laura;
 - Detector UV;
 - Detector Lablogic de iodeto de sódio para radiação gama;
 - Coluna de fase reversa C18 Symmetry de 250 mm x 4,0 mm, tamanho de partícula 5 µm (Waters, EUA);
3. Equipamento de microSPECT/CT para aquisição de imagens;
4. Gerador de tecnécio-99m (Gerador-IPEN-TEC®);
5. Espectrofotômetro IR Tracer-100 (Shimadzu);
6. Suspensão padronizada na escala 0,5 de McFarland (Interlab);
7. Fluxo laminar;
8. Balança analítica;
9. Centrífuga refrigerada;
10. Estufa;
11. Banho-maria;
12. Pipetadores;
13. Tubos tipo Eppendorf;
14. Ponteiras de 10-200 e 100 a 1000 µL (Eppendorf, Alemanha);
15. Vidrarias diversas (provetas, Erlenmeyer, béquer.);
16. Geladeira;
17. Freezer;
18. Seringas plásticas descartáveis de 1, 3 e 5 mL;

19. Frascos de vidro tipo penicilina com capacidade para 10 mL (Schott, Brasil);
20. Fita de papel para medição de pH;
21. Sistema de purificação de água;
22. Cubas de vidro para controle radioquímico;
23. Fita de papel Whatman n° 1 MM (Merck, Alemanha);
24. Fita CCD (tipo ITLC-SG) (Merck, Alemanha);

4.1.3 Lista de reagentes

1. Solução tampão fosfato [tampão fosfato] = 0,25 M, pH 7 em NaCl 0,9%;
2. Doxiciclina (DOX) preparada em duas condições:
 - [DOX] = 1 mg/mL em NaCl 0,9%
 - [DOX] = 1 mg/mL em tampão fosfato 0,25 M
3. Cloreto estanoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):
 - [$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] = 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em HCl 0,1 M
4. EDTA:
 - [EDTA] = 1 mg/mL em tampão fosfato 0,25 M
5. HYNIC:
 - [HYNIC] = 1 mg/mL em tampão fosfato 0,25 M
6. Acetona;
7. Acetonitrila;
8. Ácido trifluoroacético (TFA);
9. Água purificada;
10. Solução salina (NaCl 0,9%);
11. Meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar);
12. Caldo de TBS (Tryptic Soy Broth);
13. Cepa de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538;
14. Isoflurano (anestésico inalatório);

4.2 Métodos

4.2.1 Espectro de Infravermelho por transformada de Fourier da DOX

Foi obtido o espectro da molécula da DOX via espectrofotômetro de

Infravermelho (IV) no equipamento IR Tracer-100 (Shimadzu).

4.2.2 Preparo prévio de soluções e reagentes para marcação de [^{99m}Tc]Tc-DOX

- Solução tampão fosfato: [tampão fosfato] = 0,25 M, pH 7 em NaCl 0,9%.
- A DOX foi preparada em duas condições: 1) [DOX] = 1mg/mL em NaCl 0,9% utilizada em marcação direta e 2) [DOX] = 1mg/mL em tampão fosfato 0,25 M utilizada em marcação indireta;
- O SnCl₂ 2H₂O (cloreto estanoso dihidratado): [SnCl₂ 2H₂O] = 1,5 µg/ µL em HCl 0,1 M. Solução de HCl 0,1 M foi nitrogenada por cerca de 10 minutos, antes da adição de 15 mg de SnCl₂.2H₂O em 10 mL de HCl 0,1 M.
- O EDTA: [EDTA] = 1mg/mL. O EDTA foi dissolvido em tampão fosfato 0,25 M;
- O HYNIC: [HYNIC] = 1mg/mL. O HYNIC foi dissolvido em tampão fosfato 0,25 M.

4.2.3 Determinação das marcações de DOX com [^{99m}Tc] TcO₄⁻

Para as marcações realizadas, foram avaliadas mudanças no pH da reação, variações na quantidade de SnCl₂ 2H₂O e de DOX (conforme indicado na Tabela 1), além de alterações na ordem de adição dos reagentes e na aplicação de aquecimento (destacado em verde na Tabela 1) após a adição dos reagentes. As quantidades e a ordem de adição de cada reagente seguiram as especificações da Tabela 1. A marcação foi considerada direta quando apenas DOX, SnCl₂.2H₂O e ^{99m}TcO₄⁻ participaram da reação, incluindo o procedimento descrito por İLEM-OZDEMİR *et al.* (2013). Quando EDTA e HYNIC foram adicionados à reação, a marcação foi classificada como indireta.

Tanto as marcações diretas quanto as indiretas foram realizadas em tubos tipo Eppendorf. Após a adição de todos os reagentes, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente, e para as marcações aquecidas em uma temperatura de 40°C. Todas as marcações permaneceram por 15 minutos para permitir a reação, e o pH da solução foi medido com tiras de papel pH antes da realização da cromatografia. No caso da marcação 1c e 2c, seguiu-se uma ordem específica de adição dos reagentes, sendo 1c: DOX, ^{99m}TcO₄⁻ e SnCl₂.2H₂O e 2c:

EDTA, HYNIC, DOX, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conforme as concentrações indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições experimentais das principais marcações diretas e indiretas de DOX com $^{99m}\text{TcO}_4^-$. n* (quantidade de marcações).

	Nº da marcação	DOX dissolvido em NaCl 0,9%	DOX dissolvido em NaCl 0,9% tamponado (Tampão fosfato)	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0 µg	EDTA	HYNIC	Atividade de [^{99m}Tc] TcO_4^-	Ph final	Volume final da marcação	n*
Marcação direta	Marcação de referência ^{99m}Tc -DOX		1 mg	30 µg			1 mCi	5	2 ml	6
	1a	20 µg		30 µg			5 mCi	3	1 ml	6
	1b	20 µg		15 µg			5 mCi	3	1 ml	6
	1c	20 µg		15 µg			5 mCi	3	1 ml	6
	1d		20 µg	50 µg			5 mCi	6	1 ml	3
	1e		20 µg	30 µg			10 mCi	6	1 ml	3
	1f		20 µg	15 µg			5 mCi	8	1 ml	3
	1g		20 µg	15 µg			5 mCi	10	1 ml	3
	1h		20 µg	15 µg			5 mCi	12	1 ml	3
	1i	20 µg		0,5 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1j	20 µg		1 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1k	20 µg		2 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1l	20 µg		3 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1m	20 µg		6 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1n	400 µg		0,9 µg			5 mCi	3	1 ml	3
	1o	400 µg		0,9 µg			8 mCi	3	1 ml	3
	1p	300 µg		0,9 µg			1 mCi	3	1 ml	3
	1q	300 µg		0,9 µg			10 mCi	3	1 ml	3
	1r	300 µg		0,9 µg			5 mCi	3	1 ml	8
	1s		300 µg	0,9 µg			5 mCi	5	1 ml	3
	1t		300 µg	0,9 µg			5 mCi	6,5	1 ml	3
	1u		300 µg	0,9 µg			5 mCi	7	1 ml	3
	1v		300 µg	0,9 µg			5 mCi	8	1 ml	3
	1w		300 µg	0,9 µg			5 mCi	10	1 ml	3
1x		300 µg	1,5 µg			5 mCi	3	1 ml	3	
1y		300 µg	1,8 µg			5 mCi	3	1 ml	3	
1z		300 µg	2 µg			5 mCi	3	1 ml	3	
1.1a		300 µg	3 µg			5 mCi	3	1 ml	3	
1.1b		300 µg	6 µg			5 mCi	3	1 ml	3	
Marcação indireta	2a		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	6	1 ml	3
	2b		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	6	1 ml	6
	2c		20 µg	15 µg	1 mg	20 µg	5 mCi	6	1 ml	6
	2d		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	8	1 ml	3
	2e		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	8	1 ml	6
	2f		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	6	1 ml	3
	2g		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	6	1 ml	6
^{99m}Tc-EDTA	3a				1 mg		5 mCi	6	1 ml	3

Fonte: Autor da dissertação.

4.2.4 Marcação para o estudo de estabilidade

Para a marcação direta 1r, que obteve uma pureza radioquímica média superior a 90%, foi realizado um estudo de estabilidade do produto utilizando as mesmas concentrações de reagentes. Após identificar a marcação com o melhor rendimento e pureza radioquímica (marcação 2c), foi empregada uma atividade maior de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (15 mCi) para conduzir o estudo de estabilidade de 24 horas. Devido a esse aumento na atividade, foi necessário calcular a relação molar entre os componentes da marcação para determinar com precisão as concentrações de cada reagente, conforme descrito na Tabela 2.

Seguindo o protocolo da marcação 2c, a sequência de adição dos reagentes foi a seguinte: EDTA, HYNIC, DOX, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. As marcações foram conduzidas em tubos tipo Eppendorf e, após a adição de todos os reagentes, os tubos foram mantidos em reação à temperatura ambiente por 15 minutos. Antes da cromatografia, o pH da solução foi medido utilizando tiras de papel pH.

Tabela 2 - Condições experimentais da marcação 4a para o estudo de estabilidade.

	Nº da marcação	DOX dissolvido em NaCl 0,9% tamponado (Tampão fosfato)	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	EDTA	HYNIC	Atividade de $^{99m}\text{Tc} \text{ Tco}_4^-$	Ph final	Volume final da marcação	n°
Marcação indireta	4a	60 µg	45 µg	3 mg	60 µg	15 mCi	6	1 ml	3

Fonte: Autor da dissertação.

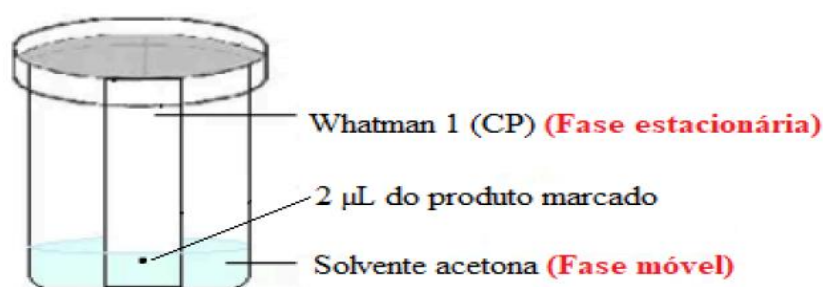
4.3 Pureza radioquímica das marcações diretas e indiretas

O controle radioquímico foi realizado baseado no estudo İLEM-OZDEMİR et al. (2013), utilizando CP, CCD (tipo ITLC-SG) e HPLC conforme protocolos descritos na literatura.

4.3.1 Sistema cromatográfico para determinação de $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$

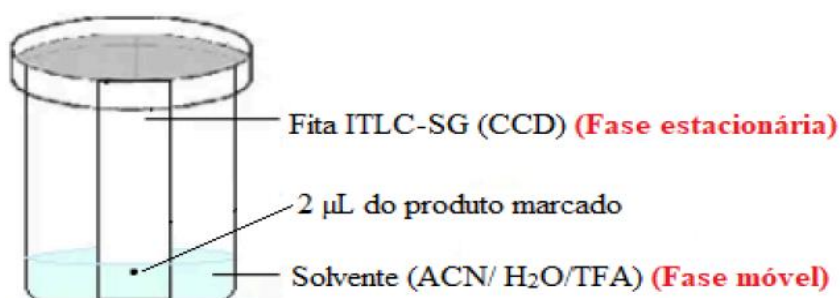
Cerca de 2 μL do produto marcado foram aplicados nas fitas cromatográficas (triplicata) (1,0 x 12,5 cm) em dois sistemas cromatográficos. Sistema 1: Whatman 1 e acetona para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e sistema 2 ITLC-SG e mistura de solventes acetonitrila/água/ácido trifluoroacético (ACN/ H_2O /TFA) (50/25/1,5 (v/v/v)) para $^{99m}\text{TcO}_2$, como ilustrado na Figura 6 e 7 conforme otimização da literatura (İLEM-OZDEMIR *et al.*, 2013):

Figura 6 - Representação do sistema 1: Whatman 1 e acetona para $^{99m}\text{TcO}_4^-$



Fonte: Adaptado de PREPARA ENEM, 2024.

Figura 7 - Representação do sistema 2: ITLC-SG e mistura de solventes acetonitrila/água/ácido trifluoroacético (ACN/ H_2O /TFA) (50/25/1,5 (v/v/v)) para $^{99m}\text{TcO}_2$



Fonte: Adaptado de PREPARA ENEM, 2024.

Após a corrida cromatográfica, as tiras foram secas, cortadas em 1 cm e colocadas para contagem (cpm) em contador Gama Hidex com detector de iodeto de sódio. A contagem (cpm) em cada um dos segmentos das fitas cromatográficas foi obtido e as porcentagens % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e % $^{99m}\text{TcO}_2$ foram calculadas de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente, e a pureza radioquímica com a Equação 3.

$${}^{99m}\text{TcO}_4^- (\%) = \frac{\text{Radioatividade } R_{f, 1, 0}}{\text{Radioatividade total}} \quad (1)$$

$${}^{99m}\text{TcO}_2 (\%) = \frac{\text{Radioatividade } R_{f, 0, 0}}{\text{Radioatividade total}} \quad (2)$$

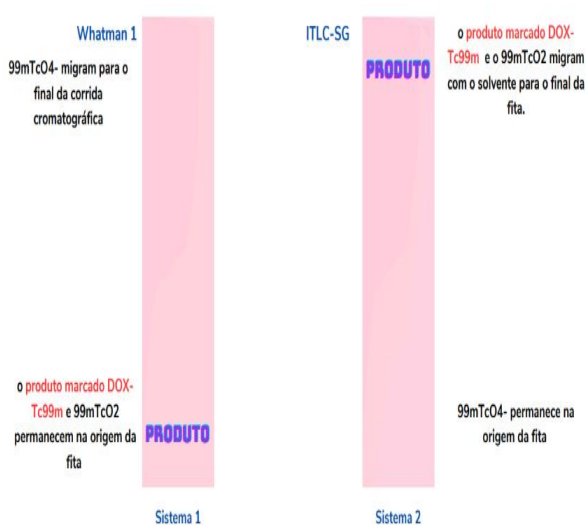
A PRq foi obtida através da Equação 3.

$$\% \text{ PRq} = 100 - (\% {}^{99m}\text{TcO}_4^-) - (\% {}^{99m}\text{TcO}_2) \quad (3)$$

As equações para a determinação da pureza radioquímica são fundamentais no controle de qualidade dos radiofármacos. A Equação 1 determina a porcentagem de tecnécio na forma de ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ enquanto a Equação 2 calcula a porcentagem de ${}^{99m}\text{TcO}_2$. A pureza radioquímica é então dada pela Equação 3, que é a diferença entre 100% e a soma das porcentagens de ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ (METTLER, et al 2012).

Segundo İLEM-OZDEMİR et al. (2013) e İLEM-OZDEMİR et al. (2014), no sistema cromatográfico CP (Sistema 1), o produto marcado [${}^{99m}\text{Tc}$]Tc-DOX e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ permanecem na origem da fita e ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ migram para o final da corrida cromatográfica. No sistema CCD ITLC-SG (Sistema 2), ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ permanece na origem da fita e o produto marcado e o ${}^{99m}\text{TcO}_2$ migram com o solvente para o final da fita, como demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Esquema do arranjo experimental e a posição (R_f das espécies radioquímicas) no sistema cromatográfico.



Fonte: Autor da dissertação.

4.3.2 Sistema cromatográfico por HPLC para determinação da % PRq produto marcado DOX-^{99m}Tc

Foi utilizado o equipamento HPLC Shimadzu modelo LC-20A, software Laura, equipado com detector UV e detector Lablogic de iodeto de sódio para radiação gama, coluna de fase reversa C18 Symmetry de 250 mm x 4,0 mm, tamanho de partícula 5 µm (Waters, USA), fluxo de 1,0 mL/minuto e fase móvel composta por H₂O:TFA (1% v/v) (solução A) e ACN:TFA (1% v/v) (solução B), sendo o gradiente formado por 3 minutos de Solução A (100%), rampa de 15 minutos até 50 % de Solução B, 15 minutos em 50 % de Solução B e 4 minutos para retornar à 100% Solução A. Utilizou-se 20 µl de volume da amostra em concentração radioativa de 1 mCi/mL. O comprimento de onda monitorado no espectro UV foi de 280 nm.

4.3.3 Estudo de estabilidade

Para a marcação 1r foi realizado um estudo de estabilidade com 1 hora e 6 horas de marcação por CP e CCD para o controle radioquímico. Para marcação 4a foi realizado um estudo de estabilidade com 1 hora e 24 horas de marcação por CP e CCD e pelo método do HPLC para estabelecer o prazo de validade do produto marcado.

4.4 Estudo *in vitro*

4.4.1 Preparo de bactérias de *S. aureus* para ensaio de ligação

Baseado no estudo da Diniz *et al*, (1999) as Cepa de *S. aureus* (ATCC 6538) foi padronizada na escala 0,5 de densidade bacteriana McFarland para obter $1,5 \times 10^8$ células/mL. Foi utilizada alça bacteriológica para transferência do MO para meio de cultura TSA e este foi mantido por 18 horas a 33 °C.

Após 18 horas, uma alça da colônia foi coletada e semeada em 9 mL de caldo de TBS e este foi incubado por cerca de 4 horas a 33 °C. 100 µL do caldo foram transferidos para cada um dos 3 tubos eppendorf. Os tubos foram centrifugados a 4 °C, 3000g, por 25 minutos, e o *pellet* (depósito no fundo do tubo) foi lavado com solução NaCl 0,9% por mais 3 vezes

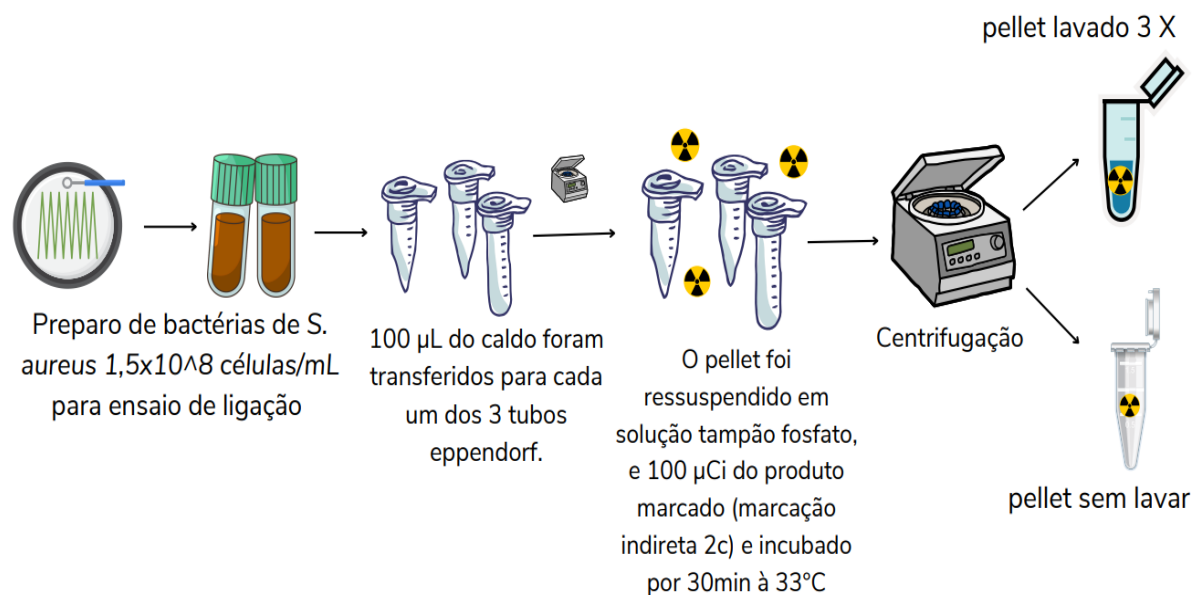
4.4.2 Ensaio de ligação de [^{99m}Tc]Tc-DOX a *S. aureus*

Baseado no estudo da Diniz et al, (1999), após a última lavagem o *pellet* foi ressuspensionado em solução tampão fosfato 0,25 M, e 100 μCi do produto marcado (marcação indireta 2c) foram transferidos para cada um de 3 tubos (triplicata), os tubos foram incubados por 30 minutos a 33 °C.

Após os tubos foram centrifugados a 3000 g por 25 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micropipeta, e transferido para tubo eppendorf. Os *pellets* foram lavados com solução salina, e novamente os tubos foram centrifugados por 3000 g por 25 minutos a 4 °C. Os *pellets* foram lavados (ou não) com solução salina por 3 vezes.

As atividades dos *pellets*, sobrenadantes das lavagens, ponteiros e tubos foram medidas no calibrador de doses em μCi , como exemplifica o diagrama da Figura 9.

Figura 9 - Diagrama do experimento de ensaio de ligação da marcação 2c com as cepas de *S. aureus*. n = 3



Fonte: Autor da dissertação.

A porcentagem (taxa) de ligação bacteriana de $\text{DOX-}^{99m}\text{Tc}$ aos *pellets* foram calculadas usando a Equação 4. Foi avaliada a influência da lavagem dos *pellets* após a etapa de ligação do produto marcado aos *pellets* de *S. aureus*:

Equação 4:

$$\text{Taxa de ligação bacteriana (\%)} = \frac{\text{atividade (pellet)}}{\text{atividade (pellet + ponteira + sobrenadante + tubo)}} \cdot 100$$

4.5 Estudo *in vivo*

4.5.1 Modelo animal de infecção

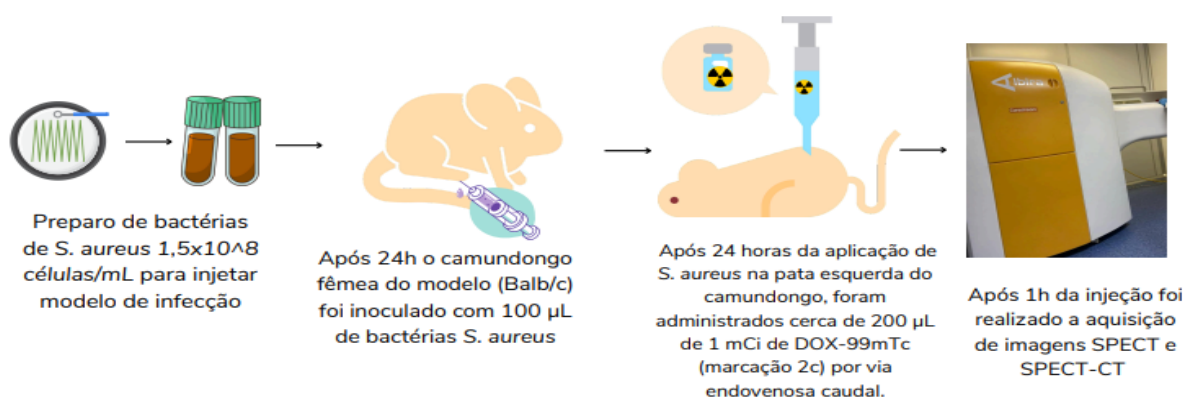
O estudo com animais de experimentação (camundongos e ratos) foi aprovado pelo comitê de ética CEUA-IPEN com o nº 37/22.

No modelo animal de infecção, a pata esquerda de um camundongo fêmea do modelo (Balb/c) pesando entre 18-35 g foi inoculado com 100 µL contendo 10^8 unidades de bactérias *S. aureus*, e aguardou-se cerca de 24 horas para a aquisição da imagem no equipamento micro SPECT-CT.

4.5.2 Aquisição da imagem

Após 24 horas da aplicação de *S. aureus* na pata esquerda do camundongo, foram administrados cerca de 200 µL de 1 mCi de [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA (marcação 2c) por via endovenosa caudal. Após 1 hora de biodistribuição, o animal foi anestesiado por via respiratória com isoflurano, colocado no equipamento de microSPECT/CT para aquisição de imagens durante 30 minutos, como especificado no diagrama da Figura 10. Após, o animal foi eutanasiado via respiratória com isoflurano.

Figura 10 - Esquema do experimento com modelo animal para aquisição de imagens SPECT e SPECT-CT. n = 3



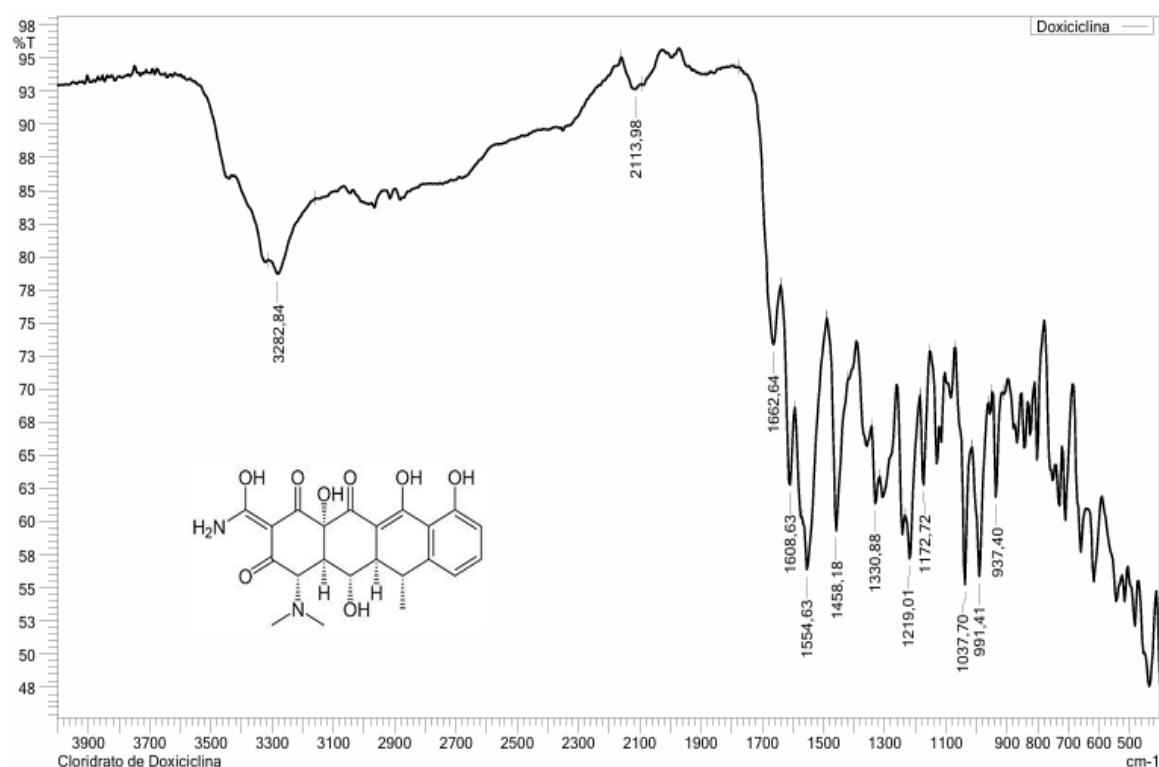
Fonte: Autor da dissertação.

5 RESULTADOS

5.1 Espectro de infravermelho por transformada de Fourier da DOX

O espectro de IV da DOX foi obtido utilizando um espectrofotômetro da Shimadzu modelo IR-Tracer 100 (Figura 11) apresentou absorções características de acordo com o espectro de referência disponível no certificado de análise do produto (LGC GMBH, 2019).

Figura 11- Espectro de IV da DOX



Fonte: Autor da dissertação.

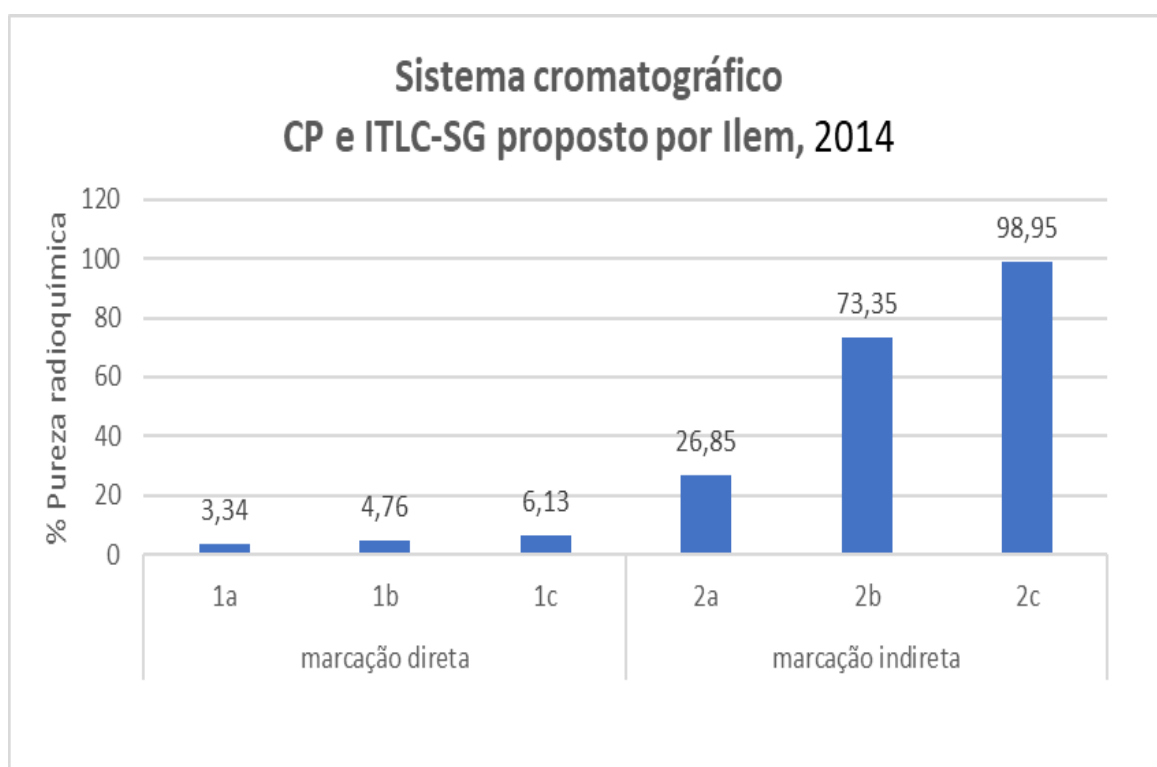
5.2 Pureza radioquímica do produto marcado com sistema cromatográfico CCD e CP.

A marcação de referência do [^{99m}Tc]Tc-DOX, realizada conforme o procedimento proposto por İLEM-OZDEMİR et al. (2013), resultou em uma pureza radioquímica média de no máximo 20% (Tabela 1), apresentando falta de reprodutibilidade nos resultados dos controles radioquímicos. Em contraste, a

marcação direta 1r demonstrou uma pureza radioquímica média superior a 90% (90,19%), conforme demonstra a Tabela 3, e a marcação indireta 2c alcançou uma pureza radioquímica média de 98,95% (Figura 12 e Tabela 3). Na marcação 3a, uma porcentagem do produto EDTA marcado com ^{99m}Tc migrou com o solvente até o final da fita, resultando em uma pureza radioquímica de 70,14% para ^{99m}Tc]Tc-EDTA, conforme indicado na Figura 12.

Os resultados de pureza radioquímica para as marcações 1a, 1b, 1c, 2a, 2b e 2c estão apresentados na Figura 12, enquanto as médias de pureza radioquímica das demais marcações estão descritas na Tabela 3

Figura 12 - Pureza radioquímica (%) das marcações diretas (1a, 1b e 1c) e indiretas (2a, 2b e 2c).



Fonte: Autor da dissertação.

Tabela 3 - Resultado das principais condições experimentais das marcações diretas e indiretas de DOX com $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

	Nº da marcação	DOX dissolvido em NaCl 0,9%	DOX dissolvido em NaCl 0,9% tamponado (Tampão fosfato)	SnCl ₂ .2H ₂ O µg	EDTA	HYNIC	Atividade de [^{99m}Tc] Tco ₄ ⁻	Ph final	Volume final da marcação	n [*]	Média da pureza radioquímica (%)
Marcação direta	Marcação de referência ^{99m}Tc -DOX		1 mg	30 µg			1 mCi	5	2 ml	6	19,54
	1a	20 µg		30 µg			5 mCi	3	1 ml	6	3,34
	1b	20 µg		15 µg			5 mCi	3	1 ml	6	4,76
	1c	20 µg		15 µg			5 mCi	3	1 ml	6	6,13
	1d		20 µg	50 µg			5 mCi	6	1 ml	3	4,3
	1e		20 µg	30 µg			10 mCi	6	1 ml	3	2,3
	1f		20 µg	15 µg			5 mCi	8	1 ml	3	7,8
	1g		20 µg	15 µg			5 mCi	10	1 ml	3	2,9
	1h		20 µg	15 µg			5 mCi	12	1 ml	3	0,89
	1i	20 µg		0,5 µg			5 mCi	3	1 ml	3	30,23
	1j	20 µg		1 µg			5 mCi	3	1 ml	3	35,78
	1k	20 µg		2 µg			5 mCi	3	1 ml	3	35,78
	1l	20 µg		3 µg			5 mCi	3	1 ml	3	38,16
	1m	20 µg		6 µg			5 mCi	3	1 ml	3	50,55
	1n	400 µg		0,9 µg			5 mCi	3	1 ml	3	86,53
	1o	400 µg		0,9 µg			8 mCi	3	1 ml	3	80,18
	1p	300 µg		0,9 µg			1 mCi	3	1 ml	3	73,63
	1q	300 µg		0,9 µg			10 mCi	3	1 ml	3	82,64
	1r	300 µg		0,9 µg			5 mCi	3	1 ml	8	90,19
	1s		300 µg	0,9 µg			5 mCi	5	1 ml	3	87,38
	1t		300 µg	0,9 µg			5 mCi	6,5	1 ml	3	83,45
	1u		300 µg	0,9 µg			5 mCi	7	1 ml	3	82,3
	1v		300 µg	0,9 µg			5 mCi	8	1 ml	3	79,1
	1w		300 µg	0,9 µg			5 mCi	10	1 ml	3	22,79
1x		300 µg	1,5 µg			5 mCi	3	1 ml	3	11,07	
1y		300 µg	1,8 µg			5 mCi	3	1 ml	3	14,8	
1z		300 µg	2 µg			5 mCi	3	1 ml	3	40,49	
1.1a		300 µg	3 µg			5 mCi	3	1 ml	3	67,27	
1.1b		300 µg	6 µg			5 mCi	3	1 ml	3	46,99	
Marcação indireta	2a		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	6	1 ml	3	28,85
	2b		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	6	1 ml	6	73,35
	2c		20 µg	15 µg	1 mg	20 µg	5 mCi	6	1 ml	6	98,95
	2d		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	8	1 ml	3	14,4
	2e		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	8	1 ml	6	10,16
	2f		20 µg	15 µg		20 µg	5 mCi	6	1 ml	3	8,97
	2g		20 µg	15 µg	1 mg		5 mCi	6	1 ml	6	4,91
^{99m}Tc -EDTA	3a				1 mg		5 mCi	6	1 ml	3	70,14

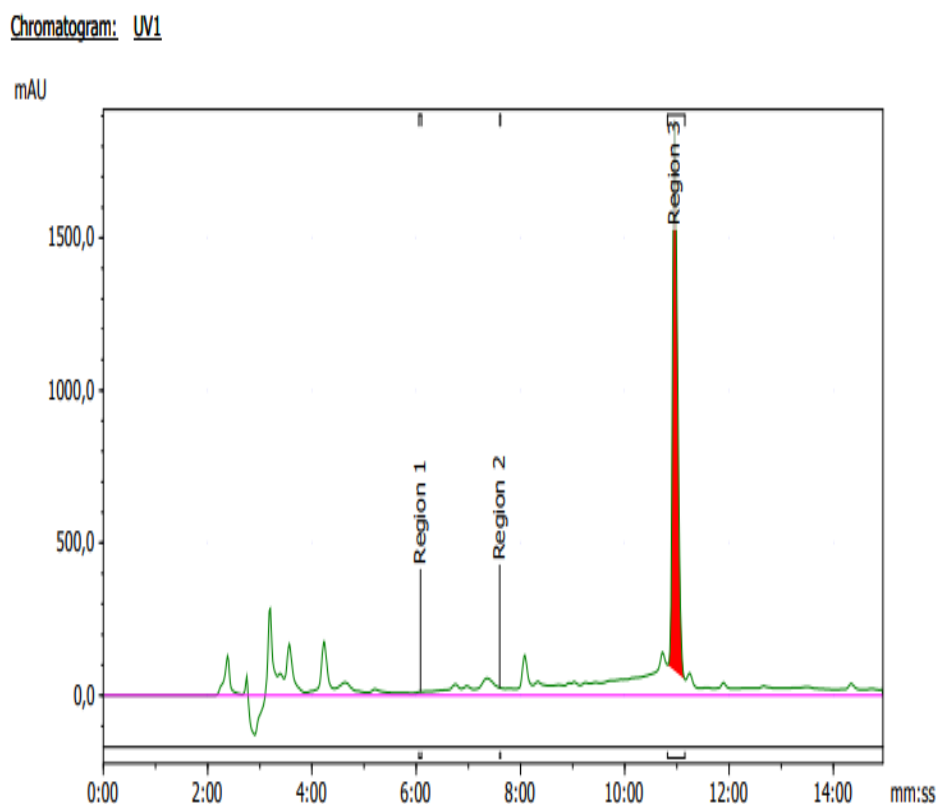
Fonte: Autor da dissertação.

5.3 Pureza radioquímica do produto marcado com HPLC

Apesar do sistema cromatográfico por CP e CCD proposto por İLEM-OZDEMİR et al. (2014) mostrarem produto marcado, o autor não mostrou os cromatogramas da análise por HPLC. As tentativas de marcação segundo o procedimento de İLEM-OZDEMİR et al. (2014), resultaram em cromatogramas sem indicar a presença de pico em tempo de retenção compatível com o tempo de retenção no cromatograma de UV-VIS.

Os cromatogramas DOX medidos no comprimento de onda (Figura 13), HYNIC (Figura 14), EDTA (Figura 15) e marcações [^{99m}Tc]Tc-EDTA (Figura 16), [^{99m}Tc]Tc-DOX-EDTA (Figura 17) e [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA, marcação 2c (Figura 18) estão apresentados a seguir:

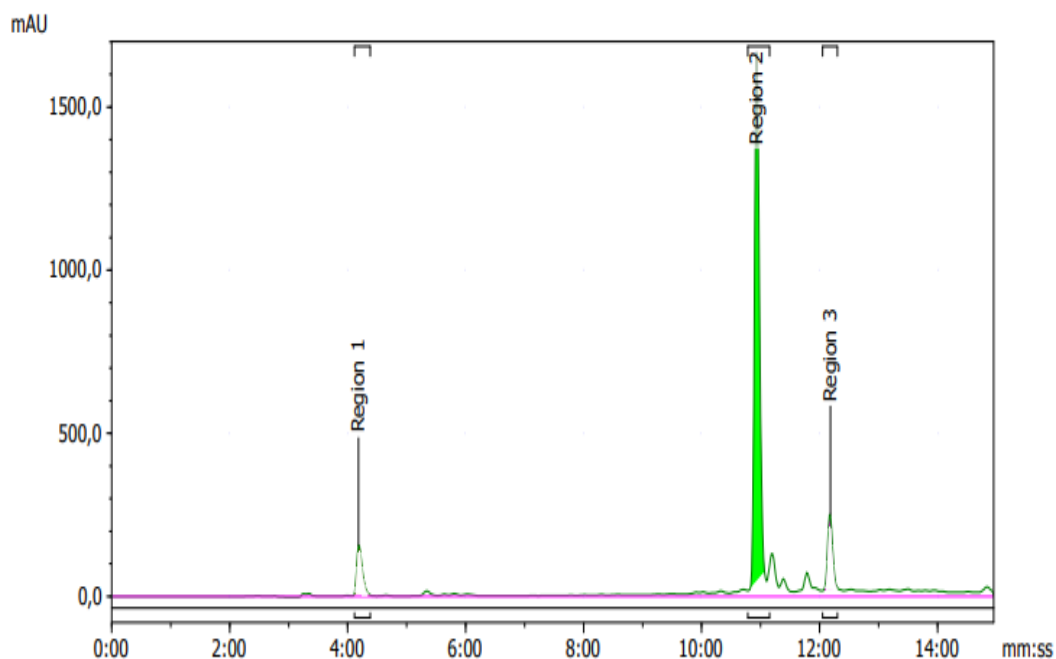
Figura 13 - Cromatograma de DOX na região UV-VIS ($\lambda=280$ nm); DOX está representado pelo pico com tempo de retenção em 11 minutos. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.



Fonte: Autor da dissertação.

Figura 14 - Cromatograma de HYNIC na região UV-VIS ($\lambda=280$ nm); HYNIC está representado pelo pico com tempo de retenção em 11 minutos. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.

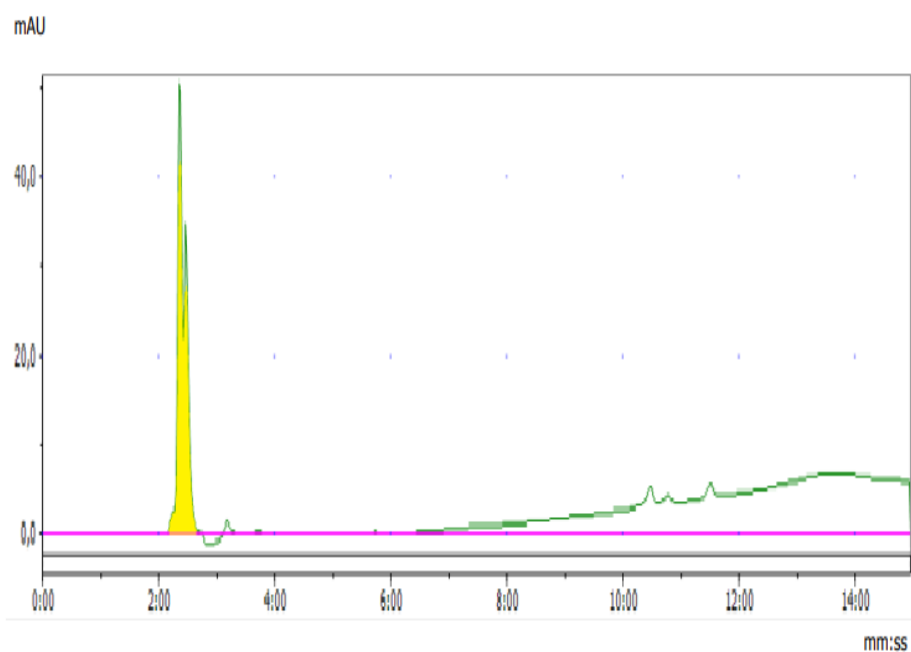
Chromatogram: UV1



Fonte: Autor da dissertação.

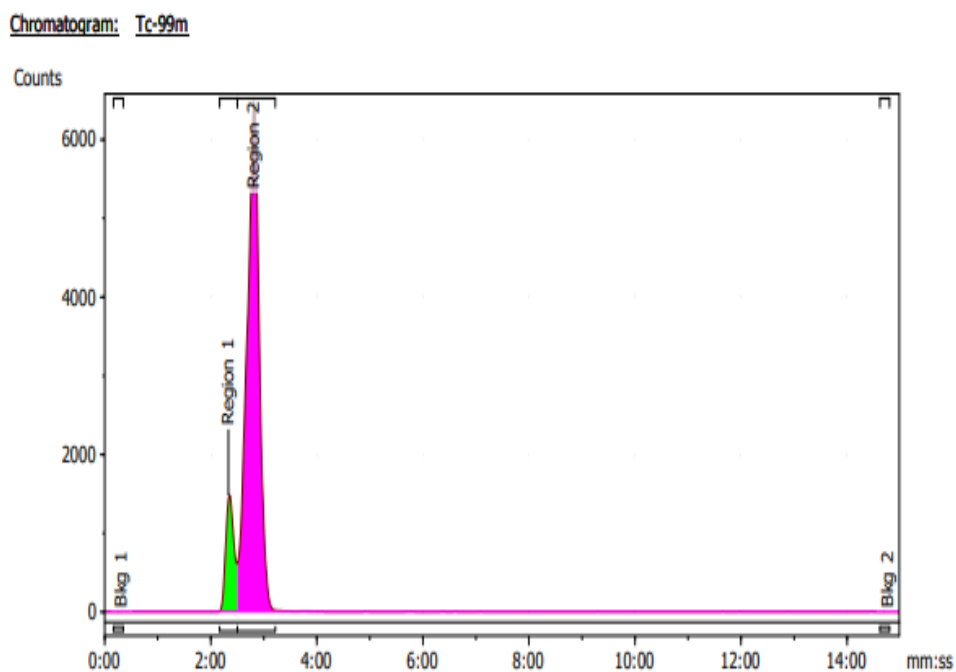
Figura 15 - Cromatograma de EDTA na região UV-VIS ($\lambda=280$ nm); representado pelo pico com tempo de retenção em 2:11 min. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.

Chromatogram: UV1



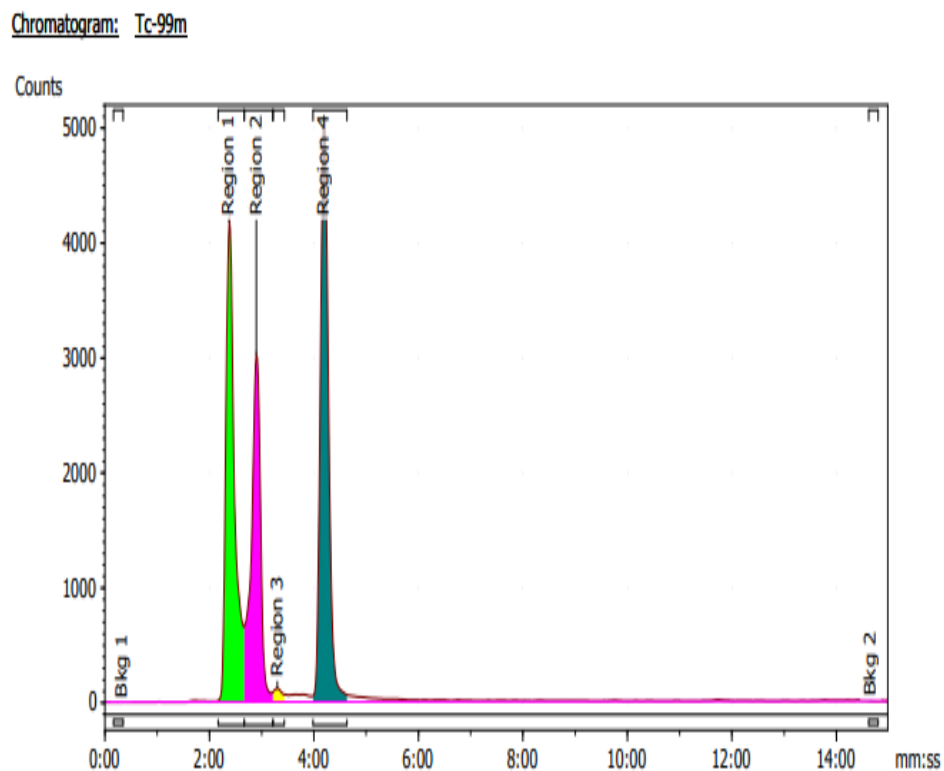
Fonte: Autor da dissertação.

Figura 16 - Cromatograma de [^{99m}Tc]Tc-EDTA na região do detector de radiação. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.



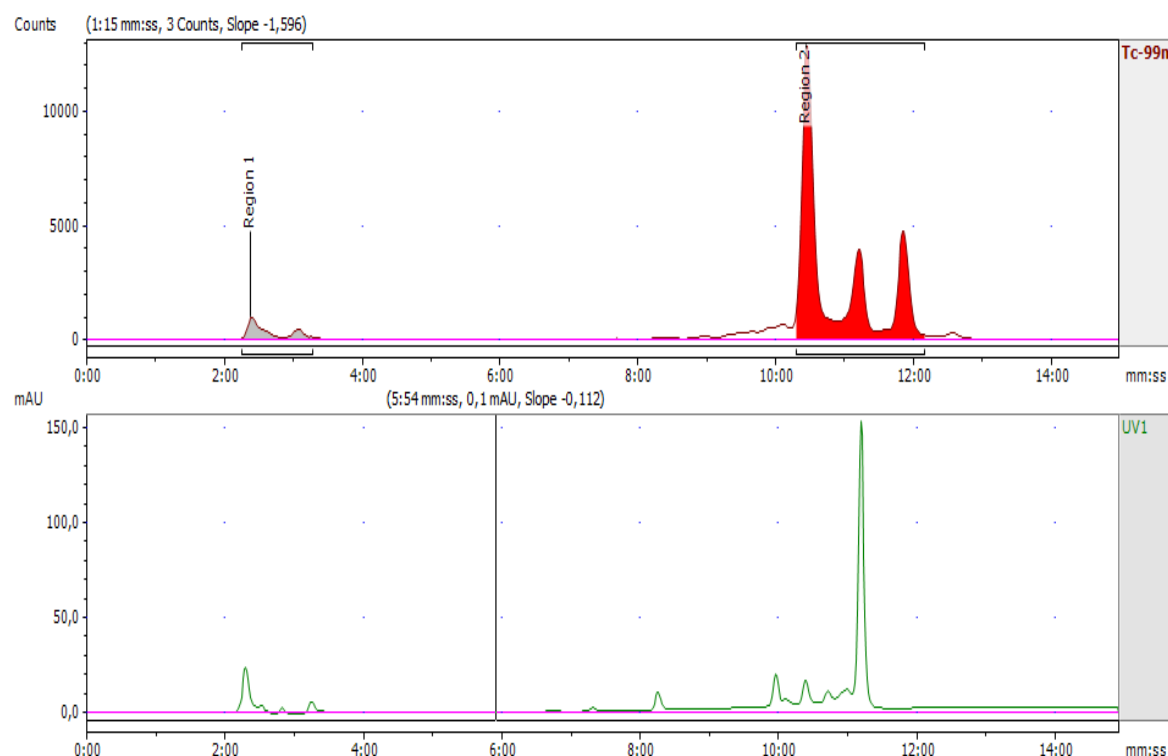
Fonte: Autor da dissertação.

Figura 17 - Cromatograma da reação de DOX, EDTA e ^{99m}Tc na região do detector de radiação. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.



Fonte: Autor da dissertação.

Figura 18 - Cromatograma da marcação indireta 2c de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-DOX-HYNIC-EDTA}$ imediatamente após a marcação, resultando em pureza radioquímica de 92,6 %. Condições experimentais descritas no item 4.2.3.



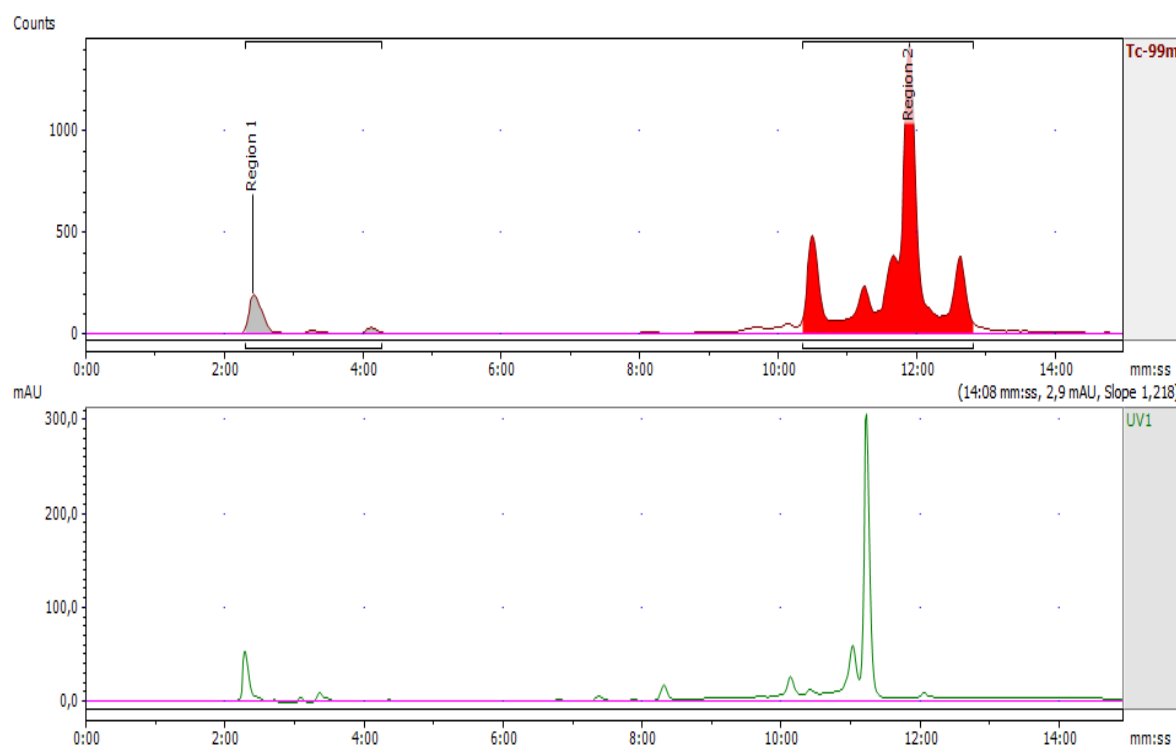
Fonte: Autor da dissertação.

5.4 Estudos de estabilidade

A média da pureza radioquímica das replicatas da marcação 1r, determinada pelo sistema cromatográfico de CP e CCD, foi de 90,19%, conforme mostra a Tabela 3. No entanto, no estudo de estabilidade, de pureza radioquímica após 1 hora e 6 horas foram de 80,10% e 44,87%, respectivamente. Em comparação, para a marcação 4a (baseado na marcação 2c) no mesmo sistema, as médias de pureza radioquímica das replicatas das marcações após 1 hora e 24 horas foram significativamente superiores, alcançando 97,53% e 93,23%, respectivamente.

A marcação 4a $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-DOX-HYNIC-EDTA}$ também foi avaliada a estabilidade pelo método do HPLC. O cromatograma obtido após 24 horas de marcação está representado na Figura 19.

Figura 19 - Cromatograma obtido após 24 horas da marcação indireta 4a de [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA, resultando em pureza radioquímica de 91,7 %. Condições experimentais descritas no item 4.2.4.



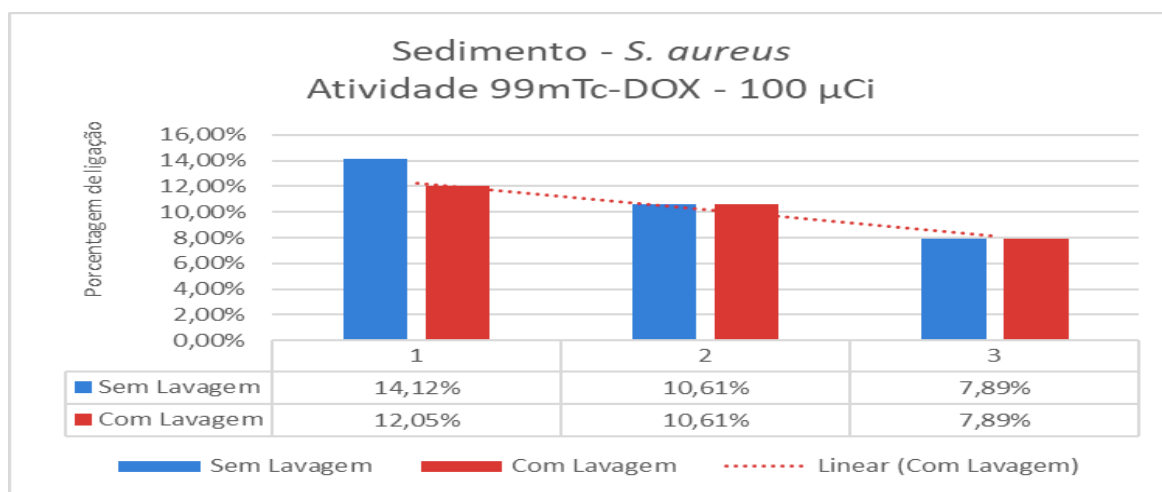
Fonte: Autor da dissertação.

5.5 Ensaio de ligação

Foi realizado estudo de ligação com o produto resultante da marcação indireta 2c [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA, após realizar pureza radioquímica por CP, CCD, HPLC.

Foi determinada a taxa de ligação do produto marcado no *pellet* de *S. aureus*, com relação à atividade total de sobrenadantes (lavagens), ponteiras e tubos, que mantiveram contato com o produto marcado, e os resultados estão representados na Figura 20. Foi avaliada a influência da lavagem após ensaio de ligação dos *pellets* de *S. aureus* com produto marcação indireta 2c.

Figura 20 - Influência da lavagem no ensaio de ligação de *pellets* de *S. aureus* com produto marcação indireta 2c. Atividade inicial do produto marcado: 100 μ Ci. (n=3)



Fonte: Autor da dissertação.

A taxa de ligação máxima do produto marcado (2c) a *S. aureus* foi de 10,5% e o desvio padrão dos resultados (%) foi de 1,9, considerando-se os 6 ensaios.

5.6 Estudo em modelo animal de infecção com *S. aureus*

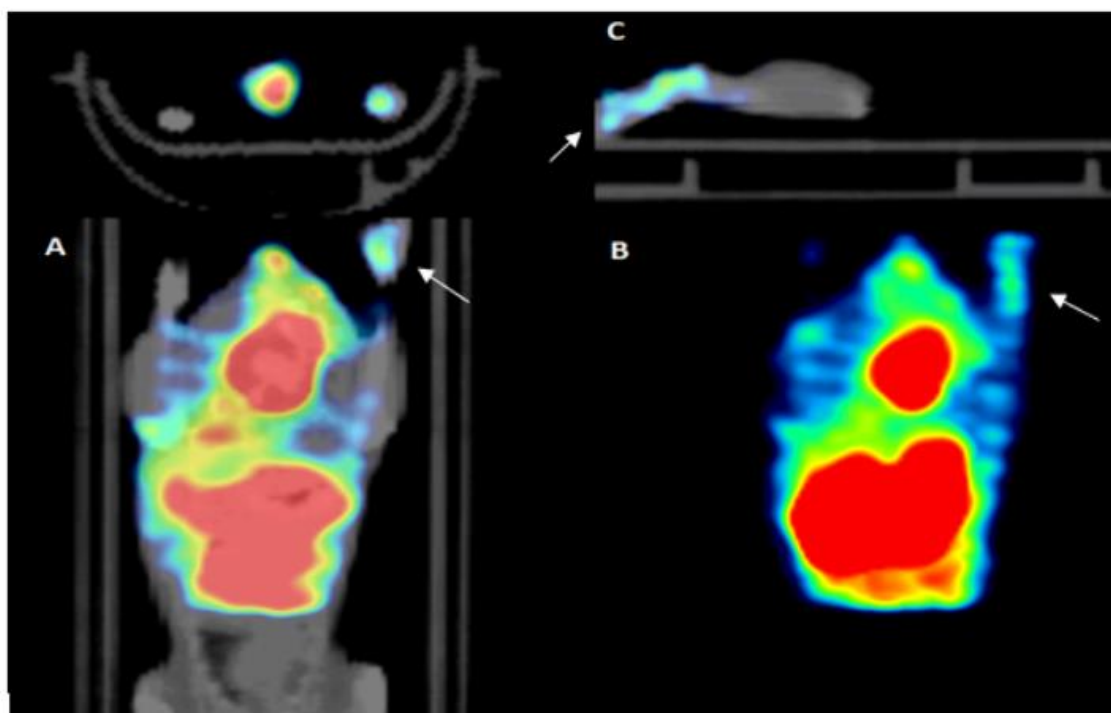
Após 24 horas de inoculação de *S. aureus* na pata esquerda do camundongo, foi observado um intenso processo infeccioso e inflamatório no local, como: edema, vermelhidão, falta de mobilidade na pata inoculada e a presença de pústulas.

5.6.1 Aquisição de imagem

O potencial do produto resultante da marcação indireta 2c [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA em detectar os focos de infecção bacteriana *in vivo* foi avaliado em um estudo preliminar com o modelo animal de infecção. A imagem SPECT-CT foi adquirida após 1 hora da administração do produto marcado no camundongo com infecção bacteriana na pata esquerda. A Figura 21 mostra imagens SPECT-CT da parte traseira do camundongo, e a seta indica a pata traseira esquerda infectada com alta captação comparada à pata traseira direita

não infectada. A taxa de captação da pata infectada foi de $0,58 \pm 0,03$ % ID/g (porcentagem de dose injetada por grama de tecido).

Figura 21 - Imagem SPECT-CT do camundongo (Balb/c) modelo de infecção bacteriana após 1 hora da administração do produto marcado. A) Imagem SPECT-CT mostra captação diferencial entre a pata traseira infectada (indicada pela seta) e não infectada (visão superior). B) Imagem SPECT mostrando captação diferencial entre a pata traseira infectada (indicada pela seta) e não infectada (visão superior). C) Imagem SPECT-CT captação somente da pata traseira infectada (indicada pela seta) (visão lateral). n = 1



Fonte: Autor da dissertação.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A marcação direta baseada no procedimento publicado por İLEM-OZDEMİR et al. (2013) resultou em pureza radioquímica por CP e CCD máxima de 20% sem reprodutibilidade entre as marcações, diferente dos valores apresentados na literatura. Foram avaliadas mudanças de pH de reação, variação de massa de cloreto estanoso, DOX, conforme descrito na Tabela 1. Também foi realizado mudança de ordem de adição de reagentes, uso de aquecimento após a adição de reagentes, e não resultaram em pureza radioquímica comparável à reportada pela literatura.

A análise por HPLC das variações das condições de marcação direta não mostrou pico de produto marcado (tempo de retenção cerca de 11 minutos) compatível ao tempo de retenção da DOX (cromatograma na região UV-VIS, (Figura 13).

A marcação direta 1r demonstrou uma pureza radioquímica acima dos 90% após a marcação, mas, a sua estabilidade é muito baixa, com uma redução da média % pureza radioquímica após 1 hora e 6 horas de 80,10% e 44,87%, respectivamente de pureza radioquímica pelo método CP e CCD. Por outro lado, a marcação indireta 2c de DOX com ^{99m}Tc , utilizando EDTA e HYNIC como agentes quelantes (^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA), resultou em uma pureza radioquímica de 98,85%, por CP e CCD (Tabela 3 e Figura 12), e 92,21% de pureza radioquímica determinado por HPLC (Figura 18).

Considerando que o tempo de retenção do pico de DOX (cromatograma na região UV-VIS, (Figura 13) está na mesma região que HYNIC (cromatograma na região UV-VIS, (Figura 14) nas condições experimentais de análise por HPLC utilizadas neste trabalho, foi feita a marcação de ^{99m}Tc]Tc-HYNIC, EDTA/ ^{99m}Tc e ^{99m}Tc]Tc-HYNIC/EDTA nas mesmas condições experimentais descritas na marcação indireta 2c. Nos cromatogramas de ^{99m}Tc]Tc-HYNIC e ^{99m}Tc]Tc-HYNIC/EDTA não se observou produto marcado.

A marcação indireta 3a resultou em um pico com tempo de retenção de 2:11 minutos na região UV-VIS correspondente ao EDTA (Figura 15). Na Figura 16, o cromatograma da região radioativa correspondente mostrou 12,9% de ^{99m}Tc]Tc-EDTA e um pico maior, com tempo de retenção de 2:54 minutos

referente a $^{99m}\text{TcO}_2$. Este experimento indicou que $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ é uma espécie hidrofílica e não é retida na coluna C18 de HPLC e por isso é eluída em tempo de retenção baixo (2:11 minutos). Na Figura 17, o cromatograma da região radioativa da marcação direta 2b indicou que não houve formação de $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-DOX-EDTA}$ e que a reação resultou em $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ em tempo de retenção de 2:11 minutos, $^{99m}\text{TcO}_2$ em 2:54 minutos e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em 4:11 minutos.

Nos sistemas cromatográficos propostos por İLEM-OZDEMİR et al. (2014) como mostra a Figura 12, o $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ formado na marcação direta 3a, permaneceu nos mesmos referenciais que a marcação 2c, indicando não ser apropriado para quantificar $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$. Mediante esses resultados, as marcações passaram a ser analisadas pelo método HPLC.

Os cromatogramas da marcação indireta 2c na Figura 18 mostra que picos com tempo de retenção em entre 10:50 e 12:54 minutos não são $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC}$ ou $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ ou $^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC/EDTA}$. Não se pode afirmar a identidade do produto marcado, porém indicam que DOX-HYNIC-EDTA- ^{99m}Tc estão presentes.

No ensaio de estabilidade, análise por HPLC da marcação indireta 4a após 24 horas, mostra cromatograma no detector na fase radioativa um aumento do pico com tempo de retenção em 12 minutos e diminuição do pico de 11 minutos (Figura 19), variação que não ocorre no cromatograma da região do UV-VIS.

Em relação aos estudos *in vitro*, a taxa de ligação ao produto da marcação indireta 2c foi determinada com Gram positiva de *S. aureus*. A avaliação do efeito da lavagem na taxa de ligação resultou em baixa variação, mostrando que o produto marcado tem o potencial de se ligar ao MO utilizado, com uma taxa de 10,5% como mostra a Figura 20. Porém, mais testes devem ser realizados. O ensaio de ligação foi feito com incubação dos pellets com o MO durante 30 minutos em temperatura de 33 °C, fato que pode ter contribuído para resultar em taxa de ligação menor que quando se utiliza 1 hora de incubação em temperatura de 37 °C, como o obtido por (AULETTA et al., 2021).

Nos estudos preliminares de aquisição de imagem SPECT-CT pode ser observado alta captação no intestino e bexiga, indicando as principais vias de excreção do produto da marcação indireta 2c. O produto obteve uma captação na

pata infectada de $0,58 \pm 0,03$ % ID/g após 1 hora de biodistribuição, mostrando alta captação em comparação à pata não infectada, como pode ser observado na Figura 21.

No estudo realizado por İLEM-OZDEMİR et al. (2014), os autores não descreveram a % ID/g de captação do membro infectado após 1 hora de injeção, mas o cálculo de razão alvo/não alvo da análise ROI (região de interesse) % ID/g igual a $0,23 \pm 0,06$ % ID/g após 5 horas de injeção, impossibilitando estudo comparativo entre esse estudo e o estudo mencionado.

O HYNIC é um quelante bifuncional amplamente utilizado para a marcação de moléculas com ^{99m}Tc , pois sua estrutura permite a formação de um complexo de coordenação estável com o radionuclídeo. No entanto, o HYNIC sozinho não é capaz de preencher completamente a esfera de coordenação do tecnécio, sendo necessária a adição de co-ligantes, como o EDTA, para estabilizar o complexo final (JIANG et al., 2023; MESZAROS et al., 2010).

O uso do EDTA como co-ligante no método de marcação indireta desenvolvido neste estudo parece ter sido fundamental para a obtenção de um produto marcado com alta pureza radioquímica. Estudos anteriores demonstraram que a escolha adequada do co-ligante, como o EDDA, pode otimizar as características do complexo de ^{99m}Tc]Tc-HYNIC, tais como a eficiência de marcação, a estabilidade *in vivo* e a biodistribuição desejada (JIANG et al., 2023). Portanto, é provável que o EDTA tenha desempenhado um papel importante na formação de um complexo de ^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA estável e com alta pureza.

A análise dos cromatogramas da marcação indireta sugere que o produto formado não é uma simples combinação de DOX, EDTA e ^{99m}Tc , mas provavelmente uma estrutura mais complexa envolvendo esses componentes, como por exemplo, ^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que os tempos de retenção dos picos observados não correspondem aos tempos de retenção individuais de DOX, EDTA ou HYNIC marcado com ^{99m}Tc .

Se tratando dos antibióticos, a DOX é um antibiótico de amplo espectro amplamente utilizado devido ao seu baixo custo. Ela apresenta atividade bacteriostática contra uma ampla variedade de MO, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua eficácia e versatilidade fazem dela uma escolha

popular para o tratamento de diversas infecções bacterianas, tendo um potencial uso na MN para diagnóstico de infecção.

O radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA desenvolvido neste estudo apresenta resultados com alta pureza radioquímica, estabilidade adequada, e nos estudos preliminares em modelo animal de infecção demonstrou captação específica. Esses achados sugerem que esse radiofármaco pode ser uma alternativa viável para o diagnóstico de processos infecciosos por técnicas de MN, possivelmente superando algumas das limitações observadas com outros radiofármacos descritos na literatura.

Estudos adicionais são necessários para avaliar a biodistribuição, a farmacocinética e o desempenho diagnóstico deste radiofármaco em outros modelos de infecção e inflamação, a fim de consolidar seu potencial clínico.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um método de marcação de DOX com ^{99m}Tc e a avaliação do potencial desse radiofármaco para o diagnóstico de processos infecciosos por SPECT-CT.

As marcações diretas de DOX com ^{99m}Tc , baseadas no procedimento publicado na literatura, resultaram em baixa pureza radioquímica, máxima de 20%, diferente dos valores reportados. Diversas tentativas de otimização das condições de marcação direta não foram capazes de alcançar a pureza radioquímica desejada.

Por outro lado, a marcação indireta de DOX com ^{99m}Tc , utilizando o agente quelante HYNIC e o co-ligante EDTA, resultou em uma pureza radioquímica de 98,85%, por CP, CCD e de 92,21% pelo método do HPLC. Os estudos de estabilidade dessa marcação indireta demonstraram que o produto marcado manteve sua pureza radioquímica acima de 90% após 24 horas.

Os ensaios *in vitro* com cepas de *S. aureus* evidenciaram uma taxa de ligação do produto marcado de 10,5%, indicando a capacidade desse radiofármaco de se ligar às bactérias.

Nos estudos preliminares *in vivo* com um modelo animal de infecção por *S. aureus*, o produto da marcação indireta de DOX com ^{99m}Tc demonstrou captação significativamente maior na pata infectada ($0,58 \pm 0,03\%$ ID/g) em comparação à pata não infectada, evidenciando o potencial desse radiofármaco na detecção de focos infecciosos por SPECT-CT.

O método de marcação indireta desenvolvido neste estudo, utilizando HYNIC como agente quelante e EDTA como co-ligante, apresentou resultados promissores, com alta pureza radioquímica e captação em modelo animal de infecção bacteriana. Esses resultados sugerem que o radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-DOX-HYNIC-EDTA pode ser uma alternativa viável para o diagnóstico de processos infecciosos por técnicas de MN. Estudos adicionais são necessários para avaliar a biodistribuição e desempenho diagnóstico deste radiofármaco em outros modelos de infecção e inflamação.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2017. p. 325-330.

AKTER, Asma et al. Radiometal chelators for infection diagnostics. **Frontiers in Nuclear Medicine**, v. 2, p. 1058388, 2023.

ALMEIDA, Érika Vieira de. **Desenvolvimento e validação de metodologia para radiofármacos de Tecnécio-99m empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Resolução de Diretoria Colegiada nº 38 de 04 de junho de 2008".

ARAÚJO, Priscila Lopes et al. Prevalência de infecção relacionada à assistência à saúde em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Enfermería Global**, v. 17, n. 4, p. 278-315, 2018.

ARRUDA, Walter Oleschko. Wilhelm Conrad Röntgen: 100 anos da descoberta dos raios X. **Arq. neuropsiquiatr**, p. 525-31, 1996.

AULETTA, Sveva et al. Imaging bacteria with radiolabelled quinolones, cephalosporins and siderophores for imaging infection: a systematic review. **Clinical and Translational Imaging**, v. 4, p. 229-252, 2016.

AULETTA, Sveva et al. In vitro and in vivo evaluation of 99mTc-polymyxin B for specific targeting of gram-bacteria. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 232, 2021.

AURITI, C. et al. Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 1, p. 25-30, 2003.

BECKER, W. et al. Kinetic data of in-vivo labeled granulocytes in humans with a murine Tc-99m-labelled monoclonal antibody. **European journal of nuclear medicine**, v. 15, n. 7, p. 361-366, 1989.

BECKER, Wolfgang; GOLDENBERG, David M.; WOLF, Friedrich. The use of monoclonal antibodies and antibody fragments in the imaging of infectious lesions. In: **Seminars in nuclear medicine**. WB Saunders, 1994. p. 142-153.

BHUSARI, Priya et al. Evaluating the potential of kit-based 68Ga-ubiquitin formulation in diagnosis of infection: a pilot study: 68: Ga. **Nuclear Medicine Communications**, v. 40, n. 3, p. 228-234, 2019.

BOSCHI, Alessandra; UCCELLI, Licia; MARTINI, Petra. A picture of modern Tc-99m radiopharmaceuticals: Production, chemistry, and applications in molecular imaging. **Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 2526, 2019.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de 68 Radiofarmácia. Radiofarmácia / Conselho Regional de Farmácia do Estado de

São Paulo. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019. 1ª edição. 50 p. ISBN 978-85-9533-031-3. Disponível em: <https://www.crfsp.org.br/images/cartilhas/radiofarmacia.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto em UTIs de 119 hospitais permitiu salvar 558 vidas. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2019/marco/projeto-em-utis-de-119-hospitais-permitiu-salvar-558-vidas>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BRIGANTI, Vittorio et al. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC is a New Opportunity in Neuroendocrine Tumors of the Lung (and in other Malignant and Benign Pulmonary Diseases). **Current radiopharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 166-176, 2020.

BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. Artmed Editora, 2018.

CAMPBELL, Stuart. A short history of sonography in obstetrics and gynaecology. **Facts, views & vision in ObGyn**, v. 5, n. 3, p. 213, 2013.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos, estratégias e validação. Ed. UFSCar: São Carlos, 2001.

CHAIDEMENOS, George Ch. Tetracycline and niacinamide in the treatment of blistering skin diseases. **Clinics in dermatology**, v. 19, n. 6, p. 781-785, 2001.

CHAVES, Kethyllém Mayara de Lima Gonzalez. Antibióticos radiomarcados: potenciais agentes para o diagnóstico de processos infecciosos. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

CHERRY, Simon R.; SORENSON, James A.; PHELPS, Michael E. **Physics in nuclear medicine**. Saunders, 2013.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp: São Paulo, 1997.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). Produção de radiofármacos. Portal do Governo Brasileiro. 2015 Disponível em: <https://www.gov.br/cnen/pt-br/assunto/pesquisa-desenvolvimento-e-ensino-na-area-nuclear/producao-de-radiofarmacos>. Acesso em: 17 jul. 2024.

DA CRUZ, Gonçalo Pereira Rodrigues. **Radiação na Gravidez: abordagem da mulher grávida exposta a radiação ionizante**. 2013.

DA SILVA, Alessandra Ferreira; BOLOGNESI, Leandro. PET COM FDG-F18: ADMINISTRAÇÃO DA DOSE E PREPARO DO PACIENTE. **Tekhne e Logos**, v. 8, n. 1, p. 83-92, 2017.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. **Cromatografia um**

breve ensaio. Química nova, v. 7, n. 1, 1998.

DIAS, L. A. P. **Desenvolvimento de um radiofármaco para marcação com Tc-99m para a identificação de infecção utilizando um peptídeo catiônico sintético.** São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2015.

DINIZ, S. O. F. et al. 99mTechnetium labelled Escherichia coli. **Applied radiation and isotopes**, v. 51, n. 1, p. 33-36, 1999.

EARLY, Paul J. Use of diagnostic radionuclides in medicine. **Health physics**, v. 69, n. 5, p. 649-661, 1995.

EBENHAN, Thomas et al. 68Ga-NOTA-functionalized ubiquicidin: cytotoxicity, biodistribution, radiation dosimetry, and first-in-human PET/CT imaging of infections. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 2, p. 334-339, 2018.

EBENHAN, Thomas et al. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed research international**, v. 2014, n. 1, p. 867381, 2014.

FARMACOPEIA Brasileira. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2019.

FLEMING, Alexander. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FUOCO, Domenico. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. **Antibiotics**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2012.

GASPAR, Gilberto Gambero et al. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant Klebsiella pneumoniae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 483-487, 2015.

GEMMEL, Filip; DUMAREY, Nicolas; PALESTRO, Christopher J. Radionuclide imaging of spinal infections. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 33, p. 1226-1237, 2006.

GRIFFIN, Michael O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C539-C548, 2010.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HAGE, Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares; IWASAKI, Masao. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1275-1283, 2009.

HALL, John E. (Ed.). **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica.** Elsevier

Health Sciences, 2021.

HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. Ed. W.H. Freeman: New York, 1995.

HIRONAKA, F. H. et al. **Medicina Nuclear: princípios e aplicações**. Atheneu; 2012. Disponível em: Acesso em: 05 de novembro de 2022.

HOUNSFIELD, Godfrey N. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system. **The British journal of radiology**, v. 46, n. 552, p. 1016-1022, 1973.

HUGHES, Davina K. Nuclear medicine and infection detection: the relative effectiveness of imaging with ^{111}In -oxine-, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-, and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -stannous fluoride colloid-labeled leukocytes and with ^{67}Ga -citrate. **Journal of nuclear medicine technology**, v. 31, n. 4, p. 196-201, 2003.

İLEM-ÖZDEMİR, Derya et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doxycycline hyclate: a new radiolabeled antibiotic for bacterial infection imaging. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 57, n. 1, p. 36-41, 2014.

İLEM-ÖZDEMİR, Derya; AŞIKOĞLU, Makbule; ÖZKILIÇ, Hayal. Radiolabeling, quality control and kit formulation of a new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled antibiotic: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -doxycycline hyclate. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 298, p. 1635-1642, 2013.

JIANG, Yuhao et al. Synthesis and bioevaluation of novel technetium- $^{99\text{m}}$ -labeled complexes with norfloxacin HYNIC derivatives for bacterial infection imaging. **Molecular Pharmaceutics**, v. 20, n. 1, p. 630-640, 2022.

JURISSON, S. et al. Coordination compounds in nuclear medicine. **Chemical reviews**, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.

KALENDER, Willi A. X-ray computed tomography. **Physics in medicine & Biology**, v. 51, n. 13, p. R29, 2006.

KOPPULA, Bhasker Rao et al. SPECT/CT in the evaluation of suspected skeletal pathology. **Tomography**, v. 7, n. 4, p. 581-605, 2021.

KUMAR, Vinay et al. Robbins & Cotran bases patológicas das doenças. In: Robbins & Cotran bases patológicas das doenças. 2010. p. 1458-1458.

LAVINAS, Tatiana. Direct and indirect radioiodination of protein: comparative study of chemotactic peptide labeling; Radioiodacao de proteina por via direta e indireta: estudo comparativo da marcacao de peptideo quimiotatico. 2004.

LEEKHA, Surbhi; TERRELL, Christine L.; EDSON, Randall S. General principles of antimicrobial therapy. In: **Mayo clinic proceedings**. Elsevier, 2011. p. 156-167.

LI, Bo et al. Diagnostic performance of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-PSMA SPECT/CT for biochemically recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. **Frontiers in**

Oncology, v. 12, p. 1072437, 2022.

LUPETTI, Antonella et al. Radiopharmaceuticals: new antimicrobial agents. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 70-73, 2003.

MANDEL, G. L.; BENNET, J. E. Bennett's principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, v. 3495, p. 522, 2010.

MARQUES, Fabio Luiz Navarro; OKAMOTO, Miriam Roseli Yoshie; BUCHPIGUEL, Carlos Alberto. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, p. 233-239, 2001.

MELLER, Johannes et al. Targeting NCA-95 and other granulocyte antigens and receptors with radiolabeled monoclonal antibodies (Mabs). **Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 54, n. 6, p. 582, 2010.

MESZAROS, Levente K. et al. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC)–Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, n. 6, p. 1059-1069, 2010.

METTLER, Fred A.; GUIBERTEAU, Milton J. Thyroid, Parathyroid, and Salivary Glands. In: METTLER, Fred A.; GUIBERTEAU, Milton J. (Ed.). **Essentials of Nuclear Medicine Imaging**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. p. 99-130. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455701049000044>. Acesso em: 9 jul. 2024. DOI: 10.1016/B978-1-4557-0104-9.00004-4.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa – IN nº 128, de 30 de março de 2022, dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Radiofármacos. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n128-de-30-de-marco-de-2022-389839399>> Acesso em: 25 mai. 2024.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NIETO, R. C., 1998, Estudo da ativação de alvos de Mo para a produção de ⁹⁹Mo pela reação nuclear ⁹⁸Mo(n, γ) ⁹⁹Mo e comportamento das impurezas radionuclídicas do processo. Dissertação de M.Sc., Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil.

O'CONNOR, Michael K.; KEMP, Brad J. Single-photon emission computed tomography/computed tomography: basic instrumentation and innovations. In: **Seminars in nuclear medicine**. WB Saunders, 2006. p. 258-266.

OLIVEIRA, Rita et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 151-165, 2006.

OWUNWANNE, Azuwuike et al. Preparation of radiopharmaceuticals. The

Handbook of Radiopharmaceuticals, p. 3-15, 1995.

PALESTRO, Christopher J. Molecular imaging of infection: the first 50 years. In: **Seminars in Nuclear Medicine**. WB Saunders, 2020. p. 23-34.

PEREIRA, F. E. L. **Inflamações** In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia Geral. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-147, 1998.

PETRIK, Milos et al. 68 Ga-labelled desferrioxamine-B for bacterial infection imaging. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 48, p. 372-382, 2021.

POUPARD, James A. The antibiotic era: reform, resistance, and the pursuit of a rational therapeutics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1093, 2015.

PREPARA ENEM. Análise cromatográfica ou cromatografia. Disponível em: <<https://www.preparaenem.com/quimica/analise-cromatografica-ou-cromatografia.htm>>. Acesso em: 15 set. 2024.

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Resumo do composto para CID 54671203, Doxiciclina; [citado em 11 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxycycline>

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6049, Edetic Acid; [cited 2024 July 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Edetic-Acid>

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 585323, 2-Hydrazino-nicotinic acid; [cited 2024 July 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hydrazino-nicotinic-acid>

QI, Yongshuai et al. Preparation of (99m) Tc-EDTA-MN and Its Bioimaging in Mouse. **Zhongguo fei ai za zhi= Chinese Journal of Lung Cancer**, v. 18, n. 7, p. 422-426, 2015.

RAKIAS, F.; ZOLLE, I. **Handbook of quality control methods of 99mTc radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine**; COST B3: WG-1; 1996.

RAMOS, Rodrigo Ricardo. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). Martindale the extra pharmacopoeia. 35.th ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.

RICHTER, Wolf S. et al. 99m Tc-besilesomab (Scintimun®) in peripheral osteomyelitis: comparison with 99m Tc-labelled white blood cells. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 38, p. 899-910, 2011.

RISTOW, João Paulo. Estudo e desenvolvimento de algoritmos de sonar ativo para o mapeamento de áreas submersas. **Florianópolis-SC: UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina**, 2015.

RÖNTGEN, Wilhelm Conrad. On a new kind of rays. **Science**, v. 3, n. 59, p. 227-231, 1896.

SAHA, Gopal B.; SAHA, Gopal B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. New York: Springer, 2004.

SALMANOGLU, Ebru; KIM, Sung; THAKUR, Mathew L. Currently available radiopharmaceuticals for imaging infection and the holy grail. In: **Seminars in nuclear medicine**. WB Saunders, 2018. p. 86-99.

SANTOS-OLIVEIRA, Ralph; CARNEIRO-LEÃO, Ana Maria dos Anjos. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional n. 49. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 377-382, 2008.

SARDA, Laure et al. Inability of ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy to discriminate between septic and sterile osteoarticular diseases. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 6, p. 920-926, 2003.

SATO, Renato Cesar; ZOUAIN, Desirée Moraes; KAJITA, Graziela Tiemy. O desafio na difusão da medicina nuclear no contexto dos radiofármacos para tomógrafos por emissão de pósitrons. **Comun. ciênc. saúde**, p. [355-360], 2011.

SCOTT, Raymond PW. Principles and practice of chromatography. **Chrom-ed book series**, v. 1, 2003.

SIGNORE, Alberto et al. Current status of molecular imaging in inflammatory and autoimmune disorders. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 7, p. 743-753, 2018.

TADO, N. A. J. C.; Borges, W. S. Em *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*; Taft, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, 2006, cap. 4

TARIQ, S., RIZVI, S. F. A., ANWAR, U. Tetracycline: classification, structure activity relationship and mechanism of action as a theranostic agent for infectious lesions-a mini review, **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 7, pp. 5787-5796, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2005.

VAHIDFAR, Nasim et al. A brief overview of common radiopharmaceuticals for detection of infection/inflammation in nuclear medicine. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, p. 1-10, 2024.

VALERO-MARTÍNEZ, Cristina et al. Application of nuclear medicine techniques in musculoskeletal infection: Current Trends and future Prospects. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 4, p. 1058, 2024.

VAN DER LAKEN, Conny J. et al. Scintigraphic detection of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. **European journal of nuclear medicine**, v. 25, p. 535-546, 1998.

VOLTARELLI, Júlio C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

WILSON, Michael L.; WINN, Washington. Laboratory diagnosis of bone, joint, soft-tissue, and skin infections. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 3, p. 453-457, 2008.

YANAGIMURA, M.; KOIKE, F., HARA, K. Collagenase activity in gingival crevicular fluid and inhibition by tetracyclines. **Journal of Dental Research**, v. 68, p. 1691-1693, 1989.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://mprofissional.ipen.br>

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal