

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Caracterização química e avaliação *in vitro* da  
atividade antimicrobiana de complexos de <sup>99m</sup>Tc-  
ciprofloxacino e <sup>99m</sup>Tc-pefloxacino**

CINTIA FOCESATTO

Porto Alegre, 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Caracterização química e avaliação *in vitro* da  
atividade antimicrobiana de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ -  
ciprofloxacino e  $^{99m}\text{Tc}$ -pefloxacino**

Dissertação apresentada por Cíntia Fochesatto  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Co-Orientador: Profa. Dr. Vera Lúcia Eifler Lima

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20.02.2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof Dr. Eloy Julius Garcia  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Osso Júnior  
Universidade de São Paulo

Profa. Dr. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F625c Fochesatto, Cíntia  
Caracterização química e avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de complexos de 99m tc-ciprofloxacino e 99m tc-pefloxacino / Cíntia Fochesatto – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xiv, 85p.: il ., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Quinolonas. 2. Ciprofloxacino. 3. Pefloxacino. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Radiofármacos. 6. Medicamentos : Complexação. I. Froehlich, Pedro Eduardo. II. Lima, Vera Lúcia Eifler. III. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:  
Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036  
Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB 10/480

## AGRADECIMENTOS

*Estas últimas palavras são para dedicar a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram, orientaram, ouviram, protegeram e colaboraram ao longo deste trabalho.*

*Ao Professor Prof. Dr. Pedro Fröhlich, agradeço o empenho que colocou neste trabalho, as sugestões, os esclarecimentos e os comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar. Agradeço, principalmente, o constante incentivo, paciência, sabedoria, preocupação e pela confiança para o desenvolvimento deste trabalho.*

*A Profa. Dr. Vera Lucia Eifler Lima, agradeço o compromisso assumido, a dedicação e o conhecimento compartilhado para superar as dificuldades que foram surgindo.*

*Ao laboratório de química farmacêutica, bem como, aos professores e alunos agradeço a atenção e disponibilidade.*

*Ao laboratório de tecnologia bioquímica, ao Prof. Dr. Germani e à Maira que auxiliaram muito neste trabalho na preparação do material biológico, agradeço pela cumplicidade.*

*A Radiopharmacus, Hospital São Lucas da PUCRS, Santa Casa de Porto Alegre, seus funcionários e amigos, que colaboraram nos bastidores deste trabalho, aproveito para expressar o meu profundo agradecimento.*

*Ao radiofarmacêutico Rafael Ribeiro Mädke que contagia a todos com sua empolgação, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional.*

*A Ionara, Alex, Nice, Lenir, pessoal do “laboratório de hipóxia e isquemia” que despertaram em mim a paixão pela pesquisa, quero mostrar a minha gratidão.*

*A minha família e amigos pela cumplicidade e reciprocidade nos bons e nos maus momentos, pelo grande apoio dedicado ao longo da vida.*



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>05</b>
2.1 Objetivo geral .....	07
2.2 Objetivos específicos .....	07
<b>3 REVISÃO.....</b>	<b>09</b>
3.1 Medicina nuclear .....	11
3.2 Radiofármacos .....	13
3.2.1 Produção de radionuclídeos .....	13
3.2.2 Síntese ou escolha do composto não radioativo (fármaco) .....	15
3.2.3 Reação entre os radionuclídeos e fármacos .....	16
3.2.4 Controle de qualidade .....	18
3.3 Diagnóstico de inflamação e infecção .....	19
3.3.1 Utilização de antibióticos/antimicrobianos no diagnóstico de infecções ....	25
3.4 Revisão de quinolonas .....	29
3.4.1 Relação estrutura/atividade .....	29
3.4.2 Mecanismo de ação .....	32
3.4.3 Espectro de ação .....	33
3.4.4 Farmacocinética .....	34
3.4.5 Interações farmacológicas .....	34
3.4.6 Efeitos adversos .....	35
3.4.7 Complexos quinolona-metal .....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Material .....	39
4.2 Métodos .....	40

4.2.1 Complexação quinolona/metal.....	40
4.2.2 Radiofármaco.....	40
4.2.2.1 Preparo do fármaco.....	40
4.2.2.2 Complexação do radiofármaco .....	42
4.2.3 Controle Radioquímico .....	44
4.2.4 Extração em fase sólida.....	46
4.2.5 Testes microbiológicos.....	46
4.2.5.1 Avaliação da ligação <sup>99m</sup> Tc-quinolona com diferentes cepas bacterianas.....	46
4.3 Análise Estatística.....	47
4.4 Descarte de Resíduos Radioativos .....	47
4.5 Descarte de resíduos não-radioativos .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1 Avaliação do complexo quinolona-metal por FTIR .....	51
5.2 Cromatografia de Camada Delgada .....	56
5.2.1 Controle Radioquímico.....	56
5.2.2 CCD: detecção por UV.....	64
5.3 Testes microbiológicos .....	65
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $^{99}\text{Mo}$  – molibdênio 99  
 $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  – íon molibdato  
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  – tecnécio 99 metaestável  
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CIP – radiofármaco  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino  
 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  – íon pertecnetato 99 metaestável  
 $^{99}\text{Tc}$  – tecnécio 99  
AcM - anticorpos monoclonais  
ADN – ácido desoxirribonucléico  
ANOVA – análise de variância  
CCD – Cromatografia em camada delgada  
CIP – ciprofloxacino  
CIM – concentração inibitória mínima  
CLAE-UV – cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta  
CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear  
FSA - ácido formamidínico sulfônico  
FTIR – espectrofotômetro de absorção no infravermelho  
HMPAO - hexametil-propileno amina oxima  
IPEN – Instituto de pesquisas energéticas nucleares  
LAPPS – Laboratório de produção de padrões secundários  
MN – Medicina Nuclear  
 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  – pertecnetato de sódio 99 metaestável  
PEF – pefloxacino  
 $\text{ReO}_4^-$  - perrenato  
TcHR – tecnécio reduzido



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1:</b> Gerador de Molibdênio/ Tecnécio 99 metaestável (99Mo/99mTc) (ARAUJO, 2006) .....	14
<b>Figura 3.2:</b> Estruturas químicas do ciprofloxacino e pefloxacino .....	30
<b>Figura 4.1:</b> Preparação das placas cromatográficas para contagem em Gama-Câmara.....	45
<b>Figura 5.1:</b> Complexos metálicos com as quinolonas (BRION, 1992) .....	51
<b>Figura 5.2:</b> Espectro de infravermelho do cloridrato de ciprofloxacino .....	53
<b>Figura 5.3:</b> Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:cobre .....	53
<b>Figura 5.4:</b> Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:níquel .....	54
<b>Figura 5.5:</b> Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:manganês .....	54
<b>Figura 5.6:</b> Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fases móveis acetona e NaCl 0,9% .....	58
<b>Figura 5.7:</b> Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel NH <sub>4</sub> OH:EtOH:H <sub>2</sub> O (1:2:5) ..	58
<b>Figura 5.8:</b> Avaliação da formação de colóide (média ± DP, n=6). Controle de qualidade radioquímico em solvente NH <sub>4</sub> OH:etanol:água (1:2:5) .....	59
<b>Figura 5.9:</b> Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel acetona .....	61
<b>Figura 5.10:</b> Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel NH <sub>4</sub> OH:EtOH:H <sub>2</sub> O (1:2:5) ..	61
<b>Figura 5.11:</b> Controle de qualidade radioquímico em solvente hidróxido de amônio:etanol:água (1:2:5). As colunas representam as médias e desvio padrão (n=2). Teste estatístico ANOVA seguido de teste Duncan (p<0,05) ...	62
<b>Figura 5.12:</b> Controle radioquímico, fase móvel acetona (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0) .....	63
<b>Figura 5.13:</b> Controle de qualidade radioquímico em solvente acetona, complexação do fármaco ao <sup>99m</sup> Tc, com ácido formamidínico sulfônico (FSA	63

a 100 °C). As colunas representam as médias e desvio padrão (n=3) .....

**Figura 5.14:** Avaliação cromatográfica do complexo CIP:Tc utilizando luz UV (254 nm). 1: CIP livre; 2: <sup>99m</sup>Tc-CIP; 3:Cu-CIP fase móvel acetona; e 4: CIP livre.; 5: <sup>99m</sup>Tc-CIP; 6: Cu-CIP fase móvel hidróxido de amônia:etanol:H<sub>2</sub>O ..... 64

**Figura 5.15:** Porcentagem de ligação do <sup>99m</sup>Tc-CIP a *S. aureus* monitorada em contador de poço. Resultados expressos em porcentagem da ligação do radiofármaco à bactéria através de centrifugação da suspensão de bactérias, colunas expressam a media e desvio padrão (n=3). \*, \*\*, \*\*\*. Grupos definidos pela ANOVA, seguido de teste Duncan (p<0,05) ..... 66

**Figura 5.16:** Porcentagem de ligação do <sup>99m</sup>Tc-CIP e <sup>99m</sup>Tc-PEF às diferentes cepas bacterianas monitorada em contador de poço. Resultados expressos em porcentagem da ligação do radiofármaco a bactéria através de retenção em filtro 0,22 µm, colunas expressam a media e desvio padrão.. 67

**Figura 5.17:** Análise da correlação da porcentagem de formação de colóide pelo sistema CCD com a ligação a cepa bacteriana (separação do radiofármaco ligado a cepa *S. aureus* através do filtro 0,22µm). Formulação do radiofármaco (CIP:SnCl<sub>2</sub>; 2:0,03 com pH de 4 e pefloxacino:SnCl<sub>2</sub>; 2:0,03 com pH de 4) incubado a temperatura ambiente..... 68

**Figura 5.18:** Relação entre a porcentagem de colóide formado e a ligação às bactérias (*S. aureus*) determinada por centrifugação. Formulação do radiofármaco: CIP:SnCl<sub>2</sub>; (7,5:0,1), pH 4,0, temperatura ambiente e 100 °C . 69

## RESUMO

### Caracterização química e avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de complexos de $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacino e $^{99m}\text{Tc}$ -pefloxacino

A diferenciação entre processos infecciosos e inflamatórios representa um grande desafio na área de diagnóstico. A complexação do antimicrobiano ciprofloxacino (CIP) com o tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ -CIP) vem sendo estudada com objetivo de desenvolver um radiofármaco com alta especificidade no diagnóstico de infecções, baseado em seu amplo espectro de atividade antibacteriana. O mecanismo de ação do fármaco consiste na ligação deste com a enzima ADN-girase da bactéria, permitindo sua ligação à bactéria ativa e a obtenção de imagens devido a fótons emitidos pelo  $^{99m}\text{Tc}$ . Tendo em vista que o local de formação do complexo envolve os mesmos grupos funcionais responsáveis pela ligação do fármaco à enzima, sua eficácia pode ser prejudicada. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições ideais para ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  a duas quinolonas (CIP e pefloxacino), utilizando diferentes agentes redutores ( $\text{SnCl}_2$  e FSA), pH da solução e temperatura de incubação. A complexação dos fármacos ao radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$  foi avaliada através do controle radioquímico, utilizando cromatografia em camada delgada. Posteriormente, testou-se sua atividade antimicrobiana *in vitro* utilizando diferentes microorganismos. O agente redutor FSA não foi eficiente na formação do complexo, resultando em uma concentração alta de Tc livre (37%). A formulação com Sn aumentou a formação de colóide com aquecimento (100 °C). A complexação dos antimicrobianos ao Tc impediu sua ligação à ADN-girase. A taxa de ligação variou de 10% (filtração) a 16% (centrifugação). Além disso, verificou-se boa correlação entre a formação de colóide e quantidade de radiação ligada à bactéria em ambos os testes. Esta perda de atividade vem de encontro a alguns estudos clínicos relatados na literatura, que revelam a não diferenciação entre processos infecciosos e processos inflamatórios pelas quinolonas marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ .

**Palavras-chave:** quinolonas, radiofármaco para diagnóstico de infecção,  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacino,  $^{99m}\text{Tc}$ -pefloxacino.



## Abstract

### Chemical characterization and in vitro evaluation of antimicrobial activity of $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin and $^{99m}\text{Tc}$ -pefloxacin

Differentiation between inflammation and infection represents a major challenge in clinical diagnostics. Several studies using ciprofloxacin (CIP), a broad spectrum antimicrobial agent, complexed with technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ ) have been reported in order to evaluate its capacity to diagnose infections. CIP mechanism of action involves its binding with bacterial DNA-gyrase during the growth phase and the acquisition of images due to  $^{99m}\text{Tc}$  radioactivity. The fact that the sites of complexation are the same as those involved in bacterial binding it may affect its antimicrobial activity. The objective of the present work was to evaluate the ideal conditions for the complexation of CIP and pefloxacin with  $^{99m}\text{Tc}$  using stannous chloride and formamidinesulfinic acid (FSA) as reducing agents, different pH and temperatures. The efficiency of complexation was monitored using radiochemical control as well as thin layer chromatography. Furthermore the antimicrobial activity of both complexes was evaluated *in vitro*. FSA was not adequate as a reducing agent and  $\text{SnCl}_2$  was better at room temperature than using heat (100 °C). The complexes did not bound well to the bacterias with binding efficiencies ranging from 10 (filtration method) to 16% (centrifugation method). Besides that, a good correlation between colloid formation (impurity) and radioactivity bound to bacterias was found. This decrease in bacterial activity was previously reported in some articles suggesting that quinolones complexed with  $^{99m}\text{Tc}$  are not suitable to diagnose infections in the presence of inflammation.

**Keywords:** quinolone, radiopharmaceutical,  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin,  $^{99m}\text{Tc}$ -pefloxacin.







A diferenciação de processos infecciosos e inflamatórios representa um grande desafio para a área médica. Os procedimentos tradicionais de imagem detectam alterações anatômicas, ou seja, não detectam a infecção em seu estado inicial, necessitando frequentemente de confirmação através de punção da suposta área lesada com análise microbiológica. Este procedimento, por sua vez, é invasivo e causa certo desconforto ao paciente além de ser de baixa sensibilidade (THRALL E ZIESSMAN, 2001; BRITTON *et al.*, 1997; BOUZA e MUNOZ, 1999; SARDA *et al.* 2002).

A medicina nuclear, através da administração de radiofármacos, permite a aquisição de imagens cintilográficas e a possibilidade da análise funcional de diversos órgãos e tecidos enfermos. A principal vantagem deste método comparado com outras técnicas de diagnóstico por imagem é a localização do foco infeccioso antes da formação de abscessos, ou seja, no estado inicial do processo (THRALL e ZIESSMAN, 2001).

A complexação de fármacos antimicrobianos ao radioisótopo tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) vem sendo estudada com o objetivo de desenvolver um radiofármaco com alta especificidade no diagnóstico de infecções. Antimicrobianos que se ligam irreversivelmente ao microorganismo poderiam ser utilizados para localizar focos infecciosos. Há estudos com o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacino com diferentes resultados e com controvérsias quanto a sua especificidade em ensaios clínicos. Além disso, não existem estudos que elucidem a forma química do complexo formado e existem poucos estudos sobre sua atividade *in vitro*. A introdução deste novo radiofármaco na medicina nuclear será muito útil, além de ser um radiofármaco de fácil preparo é de baixo custo (VINJAMURI *et al.*, 1996; BRITTON *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1998; SONMEZOGLU *et al.*,

2001; LARIKKA *et al.*, 2002a; DUMAREY *et al.*, 2002; SARDA *et al.*, 2003; MALAMITSI *et al.*, 2003; De WINTER *et al.*, 2004).





## 2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização de quinolonas complexadas com  $^{99m}\text{Tc}$  como auxiliares de diagnóstico de processos infecciosos através de testes *in vitro*.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a complexação quinolona-metal e investigar a estrutura química dos complexos formados através de espectroscopia no infravermelho;

- Preparar quinolonas marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando o ciprofloxacino e o pefloxacino;

- Avaliar as condições ideais para ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  às quinolonas frente a diferentes agentes redutores, pH da solução e a temperatura de incubação;

- Analisar a complexação/marcação dos fármacos ao radioisótopo através do controle radioquímico, utilizando cromatografia em camada delgada;

- Investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -quinolonas, utilizando *Staphylococcus aureus*, (American Type Culture Collection - ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048).







### 3.1 Medicina nuclear (MN)

A MN se baseia na administração de fármacos radioativos (radiofármacos) por diferentes vias de administração para a sua distribuição pelo organismo, com objetivo diagnóstico e/ou terapêutico (CALLAHAN *et al.*, 2001).

Os isótopos são elementos químicos cujos átomos apresentam o mesmo número de prótons e diferente número de massa. Podem ser instáveis ou radioativos. Neste caso, emitem radiações eletromagnéticas (radiação gama) e/ou emissão de partículas, como alfa e beta (THRALL e ZIESSMAN, 2001; TAUHATA *et al.*, 2003).

As emissões alfa e beta caracterizam-se por interagir com a matéria e, conseqüentemente, possuem propriedades terapêuticas. A MN pode, também, ser utilizada para avaliação do tratamento farmacológico do paciente (TAUHATA *et al.*, 2003).

Como os fármacos manipulados em MN apresentam uma biodistribuição conhecida, a energia eletromagnética emitida pelo radioisótopo ligado proporciona as imagens cintilográficas do órgão ou tecido desejado. Existe uma variedade de procedimentos em MN, baseados em três passos fundamentais: administração do radiofármaco, obtenção e processamento das imagens (THRALL e ZIESSMAN, 2001).

Um tipo especial de equipamento, a gama-câmara ou câmara de cintilação, é utilizado para transformar essas emissões em imagens, que produzem informações de como se encontra a função e/ou morfologia do órgão ou tecido em estudo (PARKER *et al.*, 2004).

Como exemplos de exames em MN, temos (OWUNWANNE *et al.*, 1995):

- cintilografia miocárdica: para estudar o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias e avaliar a viabilidade do músculo cardíaco simultaneamente, como SESTAMIBI-<sup>99m</sup>Tc ou cloreto de tálio 201;

- cintilografia óssea: para avaliar lesões ósseas, fraturas, tumores ou dor óssea sem causa conhecida, como difosfato de metileno (MDP)-<sup>99m</sup>Tc;

- cintilografia da tireóide: para avaliar a função e mostrar a estrutura da glândula, como NaI<sup>131</sup> ou Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>;

- cintilografia pulmonar: para avaliar a ventilação e a perfusão sanguínea pulmonar, assim como determinar a presença de trombos, como fitato-<sup>99m</sup>Tc, ácido dietileno triamino pentacético (DTPA)-<sup>99m</sup>Tc, macroagregado de albumina humana (MAA)-<sup>99m</sup>Tc;

- cintilografia renal: para avaliar a função dos rins e vias urinárias, como ácido dietileno triamino pentacético (DTPA)-<sup>99m</sup>Tc, etileno cisteína (EC)-<sup>99m</sup>Tc, ácido dimercaptosuccínico (DMSA)-<sup>99m</sup>Tc;

- cintilografia para pesquisa de refluxo gastroesofágico, esvaziamento gástrico, bem como, pesquisa de mucosa gástrica ectópica, como fitato-<sup>99m</sup>Tc, enxofre coloidal-<sup>99m</sup>Tc e Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>;

- cintilografia hepatobiliar: para determinar as funções do fígado e vesícula biliar e a obstrução por cálculos, como FITATO-<sup>99m</sup>Tc, ENXOFRE COLOIDAL-<sup>99m</sup>Tc, DISIDA-<sup>99m</sup>Tc.

Há ainda outros procedimentos, como cintilografia com gálio (<sup>67</sup>Ga), para avaliar infecção ou tumor, pesquisa de sangramento digestivo e cintilografia cerebral (OWUNWANNE *et al.*, 1995).

Com os avanços nos estudos de biodistribuição dos radiofármacos, o número de procedimentos cintilográficos cresceu significativamente. Tem-se muitas vezes para um mesmo composto marcado várias indicações diagnósticas e/ou terapêuticas (OWUNWANNE *et al.*, 1995).

A escolha de um radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco para aplicação em diagnóstico ou terapia em MN depende principalmente das suas características físicas, nomeadamente o tipo de emissão nuclear, tempo de meia-vida e energia das partículas e/ou radiação eletromagnética emitida. O efeito da radiação nas células depende da quantidade e da qualidade/tipo de radiação e o tempo total em que ela é administrada. Por exemplo, pode se utilizar o radionuclídeo iodo-131 para diagnóstico de hipertireoidismo em baixíssimas quantidades e quantidades significativas para terapia de câncer de tireóide (THRALL and ZEISSMAN, 2001).

### 3.2 Radiofármacos

Radiofármacos são fármacos, moléculas ou biomoléculas ligados a radionuclídeos. A preparação de radiofármacos pode ser dividida em três etapas:

- Produção de radionuclídeos;
- Síntese ou escolha de um composto não radioativo (fármaco);
- Reação entre o radionuclídeo e composto não radioativo (OWUNWANNE *et al.*, 1995; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

#### 3.2.1 Produção de Radionuclídeos

A produção de radionuclídeos pode ser direta ou indireta:

- A produção direta pode ser com reatores nucleares, onde o composto químico estável é bombardeado com nêutrons, ou com aceleradores de partículas do tipo linear ou ciclotrons, no qual o composto químico estável é bombardeado por partículas como elétrons, prótons e partículas alfa (TAUHATA *et al.*, 2003).

- A produção indireta é caracterizada pelos sistemas geradores de radionuclídeos. O sistema gerador de coluna é o mais utilizado, pela fácil obtenção e transporte até as instituições onde são requeridos. O gerador de Molibdênio/ Tecnécio 99 metaestável ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) é um sistema composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), onde é depositado o molibdato ( $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ), o qual decai a  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ . Estas duas espécies apresentam diferentes afinidades pelo  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , possibilitando que o  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , juntamente com seu isômero ( $^{99}\text{TcO}_4^-$ ), sejam extraídos do gerador, conforme Figura 3.1. Existem outros dois sistemas de produção indireta: sublimação, baseado na diferença de volatilização do Mo e Tc, e extração com solventes, obtendo-se o isótopo radioativo através da diferença do coeficiente de partição (THRALL e ZIESSMAN, 2001).

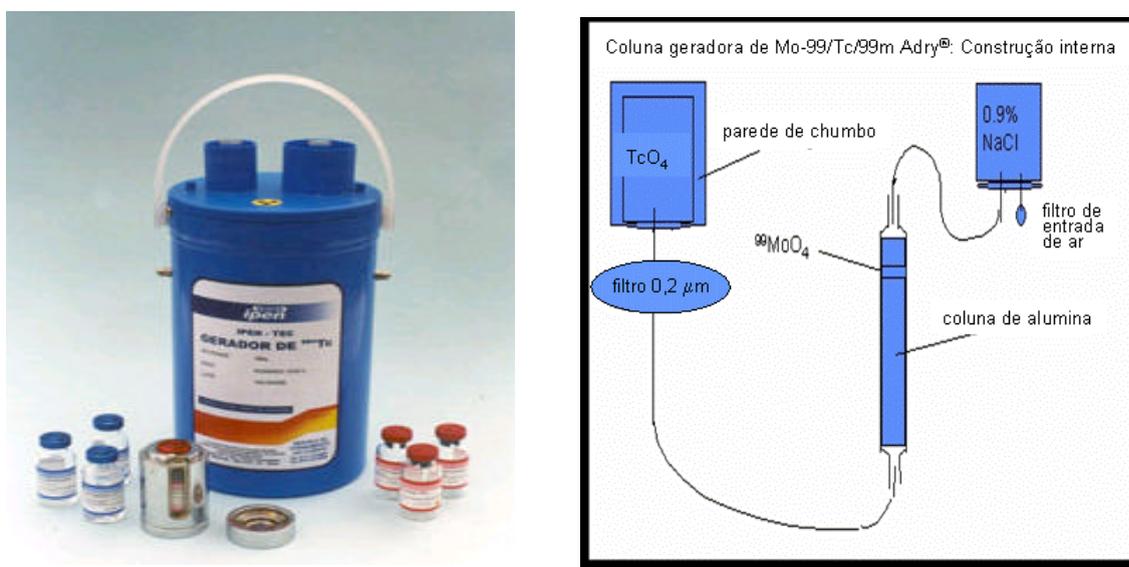


Figura 3.1: Gerador de Molibdênio/ Tecnécio 99 metaestável ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) (ARAÚJO, 2006)

Os radionuclídeos devem atender a pré-requisitos básicos como fácil disponibilidade, tempo de meia-vida efetiva curta, decaimento por transição isomérica ou captura eletrônica, e, por último, propriedades químicas que

permitam sua complexação com moléculas desejadas. Devido a estas necessidades, cerca de 80% dos radiofármacos utilizados em medicina nuclear para diagnóstico incorporam o radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ . Esta ampla aceitação se justifica pelas propriedades físicas do  $^{99m}\text{Tc}$ , como tempo de meia-vida física de 6,04 horas, decaimento por transição isomérica a tecnécio 99 ( $^{99}\text{Tc}$ ), fóton de energia gama pura de 140 keV e facilidade de reagir com diversas estruturas moleculares (ABRAM e ALBERTO, 2006; ZOLLE, 2007).

O Tc não é encontrado na natureza. O nome tecnécio é procedente do grego tecnetos, que significa "artificial". Foi descoberto por Carlo Perrier e Emilio Segré, numa amostra de molibdênio, enviada por Ernest Lawrence, que foi bombardeada com núcleos de deutério em um ciclotron em Berkeley (Califórnia, E.U.A.). Foi o primeiro elemento a ser produzido artificialmente. Todos seus isótopos são radioativos e, portanto, tóxicos. O Tc não apresenta nenhuma função biológica (ABRAM e ALBERTO, 2006).

O Tc é um metal de transição de cor cinza prateada, pertence ao grupo VIIB (Mn, Tc e Re), tem o número atômico 43 e não existe nenhum isótopo estável na natureza. O elemento  $^{99}\text{Tc}$  tem uma meia-vida de  $2,1 \times 10^5$  anos. A estrutura eletrônica do átomo Tc é  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2 4p^6 4d^6 5s^1$ . Pode existir em oito estados de oxidação, de -1 a +7, com o resultado da perda de um determinado número de elétrons a partir dos elétrons dos orbitais 4d e 5s ou ganho de um elétron do orbital 4d. A estabilidade destes estados de oxidação depende do tipo de ligante, presença de diferentes reagentes e química do meio de reação (como pH da solução) que o elemento está presente (SAHA, 2004).

### **3.2.2 Síntese ou escolha de um composto não radioativo (fármaco)**

Primeiramente, o composto não radiativo ou fármaco selecionado deve apresentar grupamentos que possam se ligar ao radionuclídeo (grupos amina, carboxila, hidroxila, sulfidril). A utilização de diferentes fármacos contendo radionuclídeos permite a análise funcional de diferentes tecidos e órgãos, conforme a afinidade ou mecanismo de ação do fármaco. Desde que, a reação

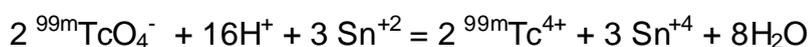
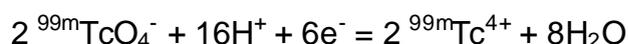
de ligação do fármaco ao radionuclídeo não altere as propriedades do fármaco (OWUNWANNE *et al.*, 1995).

O Tc atende a todas as características físicas desejadas para sua utilização no diagnóstico, porém a desvantagem deste elemento é que ele é um metal de transição e, desta forma, não pode substituir o átomo de hidrogênio como outros átomos radioativos, como o iodo-131/123 e flúor-18, bem como não pode constituir biomoléculas como o carbono, o nitrogênio e o oxigênio. Conseqüentemente, deve-se conhecer a química de coordenação do novo composto formado, radioisótopo e composto orgânico (BANERJEE *et al.*, 2005).

### 3.2.3 Reação entre o radionuclídeo e fármaco

A forma química do Tc disponibilizado do gerador é o pertecnetato de sódio  $^{99m}\text{Tc-NaTcO}_4$ . O íon pertecnetato, tem estado de oxidação +7 para o Tc, semelhante ao íon permanganato  $\text{MnO}_4^-$ , e íon perrenato  $\text{ReO}_4^-$ . Ele tem configuração tetraédrica piramidal com o  $\text{Tc}^{+7}$  localizado no centro e quatro átomos de oxigênio no ápice e base da pirâmide (OWUNWANNE *et al.*, 1995, SAHA, 2004).

A forma +7, estável, deve ser primeiramente reduzida com o auxílio de agentes redutores – como o estanho - à forma de menor estado de oxidação (+4), tornando-se instável, conforme esquema abaixo, indicando que  $\text{Tc}^{7+}$  pode ser reduzido a  $\text{Tc}^{4+}$ . Outros estados de redução,  $\text{Tc}^{3+}$  e  $\text{Tc}^{5+}$ , podem ser formados em condições físico-químicas diferenciadas, como meio reacional ácido ou básico (SAHA, 2004).



Há vários agentes redutores utilizados na preparação do radiofármaco, como cloreto estanoso, fluoreto estanoso, ácido formamidina sulfônico (FSA) e complexos redox (OWUNWANNE *et al.*, 1995).

Os compostos estanosos são os mais utilizados em preparações de radiofármacos por sua estabilidade numa ampla faixa de pH. Algumas vezes, adiciona-se ácido ascórbico, um antioxidante, para prevenir a oxidação do íon estanoso e a reoxidação do tecnécio em presença de oxigênio. Um esquema de complexação é apresentado na Figura 5.1 (pág. 51) (OWUNWANNE *et al.*, 1995; SAHA, 2004).

A maioria dos fármacos e adjuvantes é disponibilizada aos serviços de medicina nuclear através de conjuntos de reativos liofilizados (kits). A marcação ou preparação dos radiofármacos é realizada através da reconstituição destes com o pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) obtido através de um sistema gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (coluna). Dependendo dos componentes do kit o metal pode atingir vários estados de oxidação e de coordenação, dando origem a diferentes radiofármacos (MARQUES *et al.*, 2001).

A introdução do íon estanho como agente redutor nos conjuntos reativos ofereceu novas perspectivas para o desenvolvimento da medicina nuclear e atraiu interesse de todas as partes. Os kits se tornaram uma ferramenta poderosa, pois se pode obter o radiofármaco apenas pela adição de uma solução isotônica de pertecnetato de sódio ao kit. Os sais estanosos são atóxicos e estáveis quando liofilizados e/ou mantidos em atmosfera de nitrogênio (ZOLLE, 2007).

O estanho (II) é facilmente oxidado a Sn (IV) por isso deve-se ter uma série de cuidados ao se manipular as soluções de estanho excluindo o oxigênio e outros agentes oxidantes. O Sn (IV) é uma impureza inevitável, normalmente presente em preparações radiofarmacêuticas (ZOLLE, 2007).

Agentes redutores metálicos são convenientes, eficientes e utilizados na maioria dos kits de medicina nuclear. Sua desvantagem reside na possibilidade de formação de colóides devido à hidrólise em solução aquosa (KLEISNER *et al.*, 2002; ZOLLE, 2007).

As características ideais para os radiofármacos são: fácil disponibilidade, baixo custo, facilidade de preparação, estabilidade do complexo formado e possuir farmacocinética adequada para o tratamento/diagnóstico desejado. O principal objetivo é assegurar a acumulação do radiofármaco no órgão ou tecido de interesse, obtendo assim uma relação órgão alvo *versus* órgãos adjacentes adequada e sua subsequente eliminação do organismo (OWUNWANNE *et al.*, 1995).

### 3.2.4 Controle de qualidade

Como grande parte dos radiofármacos é administrada por via endovenosa (injetáveis de pequeno volume), necessita-se de controles de esterilidade e pirogênios dos conjuntos de reativos utilizados, além de rigorosa execução das Boas Práticas de Manipulação em Radiofarmácia (norma que relaciona Boas Práticas de Manipulação em Farmácia com as Normas Nacionais de Radioproteção). A administração de baixíssimas quantidades do radiofármaco torna a toxicidade praticamente improvável, uma vez que a concentração do princípio ativo marcado sempre está muito abaixo da janela terapêutica específica (OWUNWANNE *et al.*, 1995; CALLAHAN *et al.*, 2001).

Outros testes são realizados para garantir a obtenção das imagens esperadas, como determinação da pureza radionuclídica, que avalia a porcentagem de radiação proveniente do isótopo radioativo desejado. No caso de geradores de molibdênio/tecnécio ( $^{99}\text{Mo}$  /  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) não deve aparecer o radioisótopo  $^{99}\text{Mo}$  no eluato, somente o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . O  $^{99}\text{Mo}$  emite partícula  $\beta$  gerando o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , radioisótopo que emite radiação gama e possui tempo de meia-vida curto (OWUNWANNE *et al.*, 1995; ABRAM e ALBERTO, 2006).

A pureza radionuclídica é determinada através da medida da meia-vida e características das radiações emitidas pelos diferentes radionuclídeos. Nos sistemas geradores de radionuclídeo Mo/Tc o limite de aceitação é de 0,15  $\mu\text{Ci}$   $^{99}\text{Mo}/\text{mCi}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (OWUNWANNE *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2001).

Dado que o gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  é um sistema composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), algumas vezes também são extraídos íons  $\text{Al}^{3+}$  que podem interferir na complexação do fármaco ao radioisótopo, pois é mais um metal na solução que pode interferir na marcação (MARQUES *et al*, 2001).

A determinação da pureza radioquímica, avalia a porcentagem de radiação proveniente da forma química desejada, ou seja, para analisar a complexação do fármaco ao radioisótopo caracterizando impurezas como o pertecnetato livre ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) decorrente da sua não-redução; o óxido de tecnécio ( $\text{TcO}_2$ ), também denominado de tecnécio hidrolisado e reduzido (TcHR), decorrente da redução e não-complexação do metal; e outras espécies reduzidas e complexadas com arranjos diferentes do desejado. Este controle pode ser realizado por cromatografia em camada delgada com diferentes fases móveis, procurando isolar o radiofármaco complexado do radioisótopo livre e outras impurezas citadas acima, com posterior análise em gama-câmara e/ou contador de poço (OWUNWANNE *et al.*, 1995; MARQUES *et al*, 2001).

### 3.3 Diagnóstico de inflamação e infecção

Um dos objetivos de grande parte dos estudos realizados na área de diagnóstico é a diferenciação entre processos infecciosos e processos inflamatórios. O processo inflamatório é a reação do tecido resultando no aumento da permeabilidade capilar, liberação e migração de células do sistema imune, vermelhidão, calor e dor. A infecção ou sepse caracteriza-se e se diferencia da inflamação pela presença de microrganismos na lesão. Existem inflamações sem a caracterização de um processo infeccioso, ou ao contrário, pode ocorrer infecção sem o aparecimento de processo inflamatório, como em pacientes imunossuprimidos (Van der LAKEN *et al.*, 1998; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

O diagnóstico ideal deve ser rápido, com alta sensibilidade e especificidade para que o tratamento possa ser realizado de forma imediata, sem lesões decorrentes do processo infeccioso ou inflamatório. A avaliação

diagnóstica especialmente após uma cirurgia ortopédica na presença de próteses ou placas apresenta mais um problema para o diagnóstico de imagem de processo infeccioso (De WINTER *et al.*, 2004, SIMONSEN *et al.*, 2007).

Diagnósticos laboratoriais não invasivos como testes de proteína C reativa, razão da sedimentação eritrocitária e contagem de células brancas possuem baixa sensibilidade e especificidade. Conseqüentemente, cintilografias ósseas, cintilografias de leucócitos, cintilografia com gálio bem com tomografia computadorizada ou ressonância magnética se apresentam em um cenário mais restrito, já que alguns radiofármacos são disponibilizados apenas uma vez por semana e outros necessitam de manipulação especializada (De WINTER *et al.*, 2004).

Os métodos tradicionais de imagens radiológicas como tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultra-sonografia só podem ser usados para o diagnóstico de infecção e inflamação através da detecção de alterações anatômicas. Portanto, estas técnicas podem não ser eficazes na localização do foco infeccioso, devido a alterações anatômicas insuficientes e, em outros casos, pela dificuldade de diferenciação de processos pós-operatórios com processos infecciosos ou inflamatórios (BRITTON *et al.*, 1997; THRALL e ZIESSMAN, 2001). A limitação da ressonância magnética é que o tecido fibroso ósseo pós-operatório não pode ser diferenciado de um foco infeccioso até um ano após intervenção cirúrgica (De WINTER *et al.*, 2004).

A MN representa um grande apoio para o diagnóstico de focos infecciosos e inflamatórios, pois os métodos cintilográficos baseiam-se na fisiologia destes processos. Esta técnica apresenta vantagens quando comparada com outras técnicas de diagnóstico por imagem e, além disso, é a única capaz de localizar o foco infeccioso antes da formação de abscessos, podendo ser aplicada no diagnóstico de infecções intra-abdominais, doença inflamatória intestinal, infecções ortopédicas, infecções vasculares causadas por próteses, osteomielite, bem como infecções no trato genito-urinário (THRALL e ZIESSMAN, 2001).

Apesar dos métodos disponíveis de imagem disponíveis, a confirmação de vários processos infecciosos ainda é de grande dificuldade (DUMAREY *et al.*, 2002). O diagnóstico de infecção requer, em muitos casos, biópsia do local lesado para a cultura de microrganismos viáveis, procedimento este com baixa sensibilidade (aproximadamente de 50%) (BOUZA e MUNOZ, 1999; SIMONSEN *et al.*, 2007).

O risco de infecção aumenta quando dispositivos de fixação metálica ou próteses articulares são implantados (CECIL, 1997). A maioria dos implantes de próteses pode ser contaminada por bactérias, geralmente por *Staphylococcus aureus* (LARIKKA *et al.*, 2002a).

A osteomielite é uma infecção causada por microrganismos que invadem o osso. As vias patogênicas de infecção definem as principais formas de osteomielite, com os patógenos alcançando o tecido ósseo através de: disseminação hematogênica (localização preferencial em crianças na metáfise de ossos longos e adultos em vértebras); contaminação que acompanha o trauma cirúrgico ou não cirúrgico através de uma ferida; ou disseminação a partir de tecido contíguo infectado (CECIL, 1997; HARRISON, 1995).

O gênero *Staphylococcus* tem pelo menos 30 espécies. O *S. aureus* é coagulase-positivo, o que diferencia das outras espécies. Quase todos os indivíduos apresentam alguma infecção por *S. aureus* durante sua vida (JAWETZ *et al.*, 1998). Os estafilococos coagulase-negativos são membros da microbiota humana normal e, algumas vezes, causam infecções quase sempre associadas a dispositivos e aparelhos implantados, sobretudo em pacientes muito jovens, idosos e imunocomprometidos. O *S. aureus* causa aproximadamente 60% das infecções hematogênicas e introduzidas, sendo o agente principal quando a sepse óssea se dissemina por contiguidade (CECIL, 1997).

O *S. epidermidis* é um patógeno importante nas infecções ósseas associadas a próteses duradouras, como implantes articulares e dispositivos de fixação de fraturas, responsável por 30% dos casos. Estreptococos, bacilos

gram-negativos, anaeróbios, micobactérias e fungos são agentes etiológicos em inúmeros quadros clínicos (CECIL, 1997).

O diagnóstico de osteomielite é realizado através de hemoculturas; se estas forem negativas deve-se realizar aspiração com agulha do pus dos ossos ou biopsia óssea. As culturas provenientes de locais superficiais não são confiáveis (HARRISON, 1995). O diagnóstico requer a confirmação do sítio de envolvimento ósseo e a identificação dos agentes etiológicos. A infecção óssea deve ser diferenciada da artrite séptica e da bursite, da celulite e dos abscessos de tecido mole, das fraturas ósseas e neoplasias bem como dos infartos ósseos observados na hemoglobinopatia falciforme e na doença de Gaucher. O delineamento anatômico da infecção óssea depende, em grande parte, das técnicas radiológicas. A tomografia computadorizada é valiosa para identificar as pequenas alterações ósseas e os seqüestros (necroses) (CECIL, 1997).

As cintilografias são muito mais sensíveis que a radiografia e, em geral, revelam captação aumentada do radionuclídeo, quando os sintomas começam, pois se baseiam em processos fisiológicos. Entretanto, estas técnicas podem ser deturpadas pela especificidade inadequada e pela resolução espacial imprópria, de modo que os exames cintilográficos não podem ser consideradas como conclusivas. As cintilografias utilizadas em MN se diferenciam pelos radiofármacos utilizados e estes podem ser não específicos para o diagnóstico de infecção, a fim de auxiliar no diagnóstico do paciente, conforme Tabela 3.1 (CECIL, 1997).

No Brasil as cintilografias mais utilizadas são as de citrato de gálio ( $^{67}\text{Ga}$ ), pela disponibilidade e fácil manuseio, e as cintilografias com leucócitos marcados com tecnécio, que se caracterizam por um difícil e demorado preparo do material a ser administrado ao paciente.

O radiofármaco citrato de  $^{67}\text{Ga}$  é capaz de rastrear focos de inflamação e infecção além de apresentar afinidade tumoral. É obtido por ciclotrons, apresenta decaimento por captura eletrônica com um espectro de energia gama de 93 (40%), 184 (24%), 296 (22%) e 388 keV (7%), com meia-vida física

de 78 h. As desvantagens de seu uso estão relacionadas às características físicas do radioisótopo como: gama de alta energia, longa meia-vida física e longo tempo entre a administração do radioisótopo e diagnóstico. Outra desvantagem deste radiofármaco é a falta de especificidade de ligação. O  $^{67}\text{Ga}$  atua como íon férrico e circula no sangue ligado à transferrina, atingindo os sítios inflamatórios pelo aumento da permeabilidade vascular, ligando-se à lactoferrina. Possui também afinidade por tecidos neoplásicos, feridas cirúrgicas recentes, colostomias, granulomas não infecciosos e apresenta captação pelo fígado, baço, glândulas salivares, medula óssea, ossos, sistema gastrointestinal e trato urinário (baixa razão de ligação do órgão alvo/órgão adjacente) (Van der LANKEN *et al.*, 1998; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

Tabela 3.1: Radiofármacos utilizados em Medicina Nuclear para auxiliar no diagnóstico de infecção (Adaptado de Van der LAKEN *et al.*, 1998).

RADIOFÁRMACOS NÃO ESPECÍFICOS	
RADIOFÁRMACOS	MECANISMO DE ACUMULAÇÃO
Difosfonatos, marcador ósseo ( $^{99m}\text{Tc}$ -MDP)	Aumento da permeabilidade vascular e aumento do metabolismo ósseo
$^{67}\text{Ga}$ -citrato	Ligação a transferrina e lactoferrina
$^{99m}\text{Tc}$ -nanocolóides	Aumento da permeabilidade vascular e consumo de células endoteliais ativadas
$^{99m}\text{Tc}$ - e $^{111}\text{In}$ -Imunoglobulina Humana (HIG)	Aumento da permeabilidade vascular e ligação a antígenos
Lipossomas radioligados ( $^{99m}\text{Tc}$ )	Extravasamento devido ao aumento da permeabilidade vascular
$^{18}\text{F}$ -fluorodeoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG)	Aumento do consumo de glicose pelos leucócitos ativados
RADIOFÁRMACOS ESPECÍFICOS	
RADIOFÁRMACOS	MECANISMO DE ACUMULAÇÃO
$^{99m}\text{Tc}$ - e $^{111}\text{In}$ -leucócitos	Migração de leucócitos ativados
$^{99m}\text{Tc}$ -anticorpos granulocitos	Aumento da permeabilidade vascular e ligação específica ou ligação a antígenos
Antimicrobianos e peptídeos quimiotáticos ( $^{99m}\text{Tc}$ )	Ligação ao receptor de uma população de células conhecida
$^{99m}\text{Tc}$ -Ciprofloxacino	Ligação à enzima ADN-girase bacteriana

A combinação de cintilografia óssea (MDP-<sup>99m</sup>Tc) com citrato de <sup>67</sup>Ga tem sido sugerida como uma alternativa quando se avaliam infecções de coluna, porém o exame para diagnóstico de infecção pós-cirurgia com Ga é inespecífico e altamente questionável. Resulta num exame de baixa qualidade de imagem e expõe o paciente a uma alta dose radioativa e por um tempo relativamente longo para um exame diagnóstico (De WINTER *et al.*, 2004).

Existem varias técnicas de marcação de leucócitos com radioisótopos (<sup>111</sup>In ou <sup>99m</sup>Tc). Os radioisótopos conseguem entrar nas células brancas do sangue de forma estável, porém de forma limitada. Estas imagens apresentam baixa especificidade, pois tanto na infecção como na inflamação ocorre migração de neutrófilos para o sítio de infecção através de diapedese e quimiotaxia. Sua principal utilização é em processos inflamatórios agudos (BRITTON *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1998; Van der LANKEN *et al.*, 1998).

A principal desvantagem dessa técnica está em sua manipulação, que é complexa, necessitando de um tempo prolongado, manipulador experiente e equipamentos específicos para o manuseio das células. Além disso, representa um risco potencial de contaminações aos membros da equipe bem como ao paciente e a aquisição das imagens pode necessitar de 24 h para concluir o diagnóstico (THRALL e ZIESSMAN, 2001). Outra desvantagem na utilização destes radiofármacos é a dependência da quantidade total de células brancas no sangue dos pacientes, fator este de extrema relevância para a qualidade das imagens com leucócitos marcados (BRITTON, *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1998; LARIKKA *et al.*, 2002b).

A complexação do <sup>99m</sup>Tc aos leucócitos pode produzir vários produtos: compostos hidrofílicos secundários, colóides e complexos lipofílicos, como a hexametil-propileno amina oxima (HMPAO) (OZKER *et al.*, 1996).

Leucócitos marcados com <sup>99m</sup>Tc, teoricamente, possuem vantagens sobre os marcados pelo <sup>111</sup>In, como a disponibilidade do radioisótopo, a menor dose de radiação dispensada ao paciente e obtenção de imagens de melhor resolução. No caso do diagnóstico de infecção para pacientes que foram submetidos a processos cirúrgicos, o exame de leucócitos marcados deve

esperar um intervalo entre 3 a 6 meses para não ocorrer em falsos positivos (De WINTER *et al.*, 2004).

A cintilografia de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  com posterior realização de cintilografia óssea (MDP- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) aumentam a especificidade no diagnóstico de infecção, em suspeitas de infecções de próteses. A cintilografia de leucócitos marcados deve ser combinada com cintilografia de enxofre coloidal, pois estes radiofármacos possuem comportamentos diferentes na biodistribuição da medula óssea em presença de infecção, o que não acontece se o indivíduo não possuir infecção. A desvantagem dos métodos acima é o custo e o tempo para realização dos exames (PALESTRO, 2003; PELOSI *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, a MN tem focado suas pesquisas nos anticorpos monoclonais (AcM), pelas sua diversidade, especificidade e atividade biológica. Estas moléculas possibilitam a criação de uma grande variedade de radiofármacos com alta especificidade para um determinado tecido, tumor ou receptor (BLOK *et al.*, 1999). Contudo, diversos fatores podem influenciar no comportamento dos AcM marcados como associação inespecífica a antígenos, perda da imunoreatividade após a conjugação ao radioisótopo, extravasamento limitado de anticorpos ou difícil acesso aos antígenos e, algumas vezes, antígenos presentes na circulação. Além desses fatores, os AcM possuem alto peso molecular, rápida eliminação e desfavorável relação órgão de estudo / tecidos adjacentes para uso diagnóstico (BLOK *et al.*, 1999; SIGNORE *et al.*, 2001).

A fim de resolver o problema de alto peso molecular, alguns autores procuram sintetizar peptídeo selecionando apenas a porção ativa dos anticorpos. Os peptídeos são biomoléculas compostas por cerca de 50 aminoácidos, apresentando baixo peso molecular, diferenciando-se das proteínas e anticorpos. Proteínas freqüentemente têm derivações de fontes biológicas através da produção de ascite ou de técnicas de ADN recombinante, enquanto peptídeos podem ser sintetizados quimicamente. Os peptídeos se distribuem uniformemente e penetram rapidamente no tecido, por outro lado, são eliminados da circulação mais rapidamente que anticorpos ou fragmentos destes. O fato de apresentarem tempo de meia-vida plasmático pequeno não

permite a concentração no órgão específico (BLOK *et al.*, 1999; SIGNORE *et al.*, 2001).

### 3.3.1 Utilização de antibióticos/antimicrobianos no diagnóstico de infecções

A complexação de antimicrobianos ao  $^{99m}\text{Tc}$  tem a finalidade de proporcionar um diagnóstico sensível, de alta especificidade e de fácil manuseio. Os primeiros antimicrobianos utilizados em MN foram as tetraciclina na década de 70. HAGAN e colaboradores (1977) relataram que as tetraciclina ligadas aos radioisótopos  $^{131}\text{I}$  e  $^{99m}\text{Tc}$  possuíam tendência de se acumular em tecido resultante de infarto, tumores necróticos e em abscessos ou áreas de inflamação, porém com pouco êxito quando comparadas ao  $^{67}\text{Ga}$ , pois a relação do órgão alvo/órgãos adjacentes é bem melhor para o  $^{67}\text{Ga}$  do que para as tetraciclina.

BARRETO e colaboradores (2000) estudaram a complexação de uma cefalosporina de terceira geração, ceftizoxima, ao radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando o ditionito sódico como agente redutor. Através de análises de CLAE-UV, foi possível observar que o processo de marcação modificou a molécula reduzindo a atividade antimicrobiana *in vitro*.

Outro antimicrobiano estudado foi o alafosfalina, inibidor da biosíntese de peptidoglicanos de bactérias, que quando ligado ao radioisótopo concentrou-se em sítios infecciosos de ratos, porém de forma menos efetiva que leucócitos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  (TSOPELAS *et al.*, 2003).

Por outro lado, o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi capaz de diferenciar infecções fúngicas de infecções bacterianas comprovadas por ensaios *in vitro* e *in vivo*, com camundongos (LUPETTI *et al.*, 2002).

O antimicrobiano com maior número de estudos é o ciprofloxacino (CIP). O  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacino foi estudado com objetivo de desenvolver um radiofármaco com alta especificidade no diagnóstico de infecções, baseado no amplo espectro de atividade antibacteriana que envolve não apenas bactérias

Gram-positivas, mas também Gram-negativas (OH *et al.*, 2002; SONMEZOGLU *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação do fármaco consiste na ligação deste com a ADN-girase da bactéria permitindo a ligação do antimicrobiano à bactéria ativa e a obtenção de imagens devido a fótons emitidos pelo  $^{99m}\text{Tc}$  (OH *et al.*, 2002; SONMEZOGLU *et al.*, 2001).

A combinação do  $^{99m}\text{Tc}$  com CIP permite uma localização do foco infeccioso através do acúmulo do radiofármaco no sitio ativo da infecção (SONMEZOGLU, *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* e ensaios com animais têm demonstrado que o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP se concentra em uma ampla variedade de lesões bacterianas, incluindo abscessos causados por bactérias Gram-positivas e/ou negativas, não sendo captado em inflamações estéreis ou lesões com bactérias mortas (BRITTON *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1998).

Outros estudos verificaram que o radiofármaco é capaz de identificar infecções em tecidos moles e em ossos, sendo um radiofármaco promissor para o estudo de osteomielite (LARIKKA *et al.*, 2001b).

Por outro lado, DUMAREY e colaboradores (2002) demonstraram que o consumo do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP não é apenas pela complexação com a bactéria. Pode ocorrer acúmulo no espaço intersticial, favorecido pelo aumento da permeabilidade capilar, uma das possíveis justificativas para hipercaptação em locais de interesse. Além destas hipóteses, o  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP apresenta captação hepática e secreção transintestinal (Dumarey *et al.*, 2002). Existem relatos de que células inflamatórias, macrófagos, monócitos e neutrófilos podem captar  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP, contribuindo para o aumento de concentração em sítios de inflamação assépticos (SARDA *et al.*, 2002). HALL e colaboradores (1998) demonstraram em estudos *in vitro* que a retenção de CIP em células sangüíneas de defesa é baixa comparada com o tempo de retenção em bactérias.

A alta especificidade deste radiofármaco está sendo defendida por alguns autores através da inclusão das imagens de 24 h após administração do radiofármaco. O CIP no plasma encontra-se na forma não ionizada, difundindo-

se facilmente para o espaço extravascular, resultando em uma rápida concentração no tecido inflamado, mas com uma rápida eliminação. Por todos estes fatores, as imagens de 1 e 4 horas podem apresentar baixa especificidade (LARIKKA *et al.*, 2002b). Outro fator relevante na obtenção das imagens prolongadas é a quantidade presente do radiofármaco no local de infecção, extremamente pequena. A dose de princípio ativo encontrado nas formulações dos radiofármacos são de aproximadamente 2,0 mg e muito inferior às doses terapêuticas, que chegam a 500 mg por dose (HALL *et al.*, 1998).

A vantagem de um radiofármaco que utiliza um antimicrobiano está no seu custo, disponibilidade e facilidade de marcação, ou seja, na simplicidade de preparo. Outra vantagem na utilização destes fármacos é a independência da quantidade total de células brancas no sangue dos pacientes, fator este de extrema relevância para a qualidade das imagens com leucócitos marcados (BRITTON, *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1998; LARIKKA *et al.*, 2002b).

Na Tabela 3.2, estão listados os estudos clínicos com os resultados de especificidade e sensibilidade das cintilografias com o CIP. Estes dados podem gerar algumas controvérsias. Os estudos clínicos apresentam alguns casos de falsos positivos, falsos negativos, bem como verdadeiros que são negativos, o que não deveria acontecer pelo mecanismo de acumulação do radiofármaco analisado.

A cintilografia de  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP é comparada com as cintilografias em uso na medicina nuclear ou cintilografias com novos fármacos. Como por exemplo, as cintilografias com o antimicrobiano são comparadas com as de leucócitos marcados. VINJAMURI e colaboradores (1996) obtiveram 84% de sensibilidade e 96% de especificidade quando utilizaram o  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP, enquanto os exames com leucócitos apresentaram 81% e 77%, respectivamente, ou seja, obteve-se maior especificidade com o antimicrobiano. Por outro lado, SONMIZOGLU e colaboradores (2001), apresentaram 94% e 83% de sensibilidade e especificidade do  $^{99m}\text{Tc}$ -CIP e 63% e 96% para os leucócitos demonstrando maior especificidade para o exame de leucócitos.

SIAENS e colaboradores (2004) compararam duas quinolonas diferentes, enrofloxacino e CIP. Através do controle radioquímico verificaram a formação de colóide, que foi removido através de extração em fase sólida.

Os colóides possuem uma biodistribuição característica que interfere na análise de qualquer exame de medicina nuclear. Além disso, os colóides são fagocitados por neutrófilos e monócitos interferindo no diagnóstico de processos infecciosos ou inflamatórios (RAMSAY *et al.*, 2005).

Em ensaios *in vitro* os radiofármacos de quinolonas se ligaram a bactérias em suspensão, porém tanto as viáveis como as mortas por aquecimento. Após testou-se a ligação do radiofármaco em meio com excesso de antimicrobiano não ligado, comprovando a não especificidade dos radiofármacos de quinolonas, sugerindo que podem ter ocorrido modificações do sítio alostérico da molécula após a complexação ao Tc (SIAENS *et al.*, 2005).

### 3.4 Quinolonas

Os membros mais antigos da classe das quinolonas, em particular o ácido nalidíxico, foram disponíveis durante muitos anos para o tratamento de infecções do trato urinário. Esses fármacos são de importância relativamente menor, em virtude de sua utilidade terapêutica limitada e do rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. Neste cenário, a introdução de fluorquinolonas (com átomo de flúor na posição 6), como no caso do norfloxacino e do ciprofloxacino, representou um avanço terapêutico particularmente importante, visto que estes fármacos são dotados de ampla atividade antimicrobiana, baixo número de efeitos colaterais e lento desenvolvimento de resistência bacteriana (HARDMAN *et al.*, 2003).

### 3.4.1 Relação estrutura/atividade

As fluoroquinolonas, conforme exemplificado na Figura.3.2, como o CIP e o pefloxacino (PEF), contêm um grupamento ácido carboxílico na posição 3, uma carbonila em C4 e um substituinte flúor na posição 6. Muitos destes compostos contêm um anel ligado à posição 7 (neste caso um anel piperazinil).

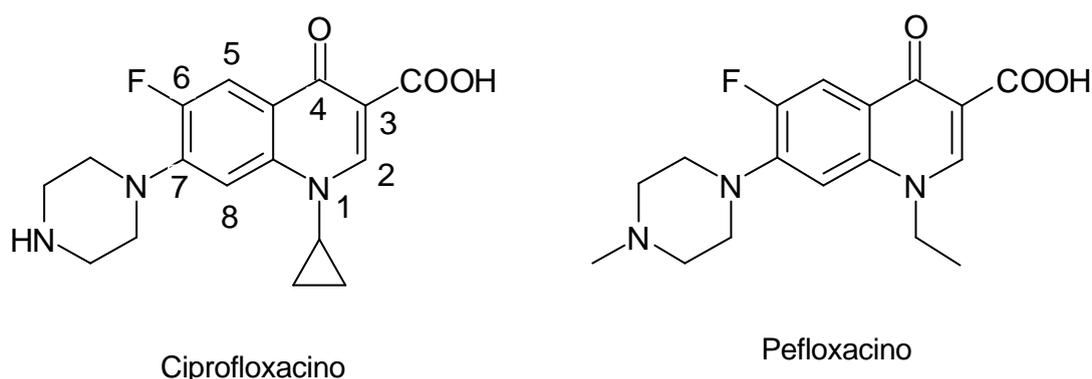


Figura 3.2: Estruturas químicas do ciprofloxacino e pefloxacino.

Estudos da relação estrutura atividade demonstraram que (DELGADO e REMERS, 1998; SOUZA *et al.*, 2004):

- grupamento carboxílico em 3 e cetona em 4 são essenciais para a atividade;
- substituição do nitrogênio na posição 1 por átomo de carbono ou oxigênio leva à perda da atividade;
- substituição da cetona na posição 4 por C=S leva à perda de atividade;
- grupos alquil ou aril na posição 1 (ciclopropil, t-butil, etil, m-fluorbenzeno, 2,4-difluorobenzeno) aumentam a potência do fármaco;
- substituição do átomo de carbono pelo nitrogênio na posição 8 mantém a atividade;

**Tabela 3.2:** Estudos clínicos para diagnóstico de infecção relacionados com <sup>99m</sup>Tc-Ciprofloxacino.

<b>Autores</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Preparo do Radiofármaco (Fármaco, agente redutor, temperatura e tempo incubação)</b>
VINJAMURI, 1996	84%	96%	56 pacientes, imagens de 1, 4 e alguns 24h após	Ciprofloxacino, FSA (0,4 mg), incubação de 100 °C, 10 min
BRITTON, 1997	83%	91%	99 pacientes, imagem 1 e 4 h	Ciprofloxacino, FSA (0,4 mg), incubação de 100 °C, 10 min
HALL, 1998	70,3%	93,1%	90 pacientes, imagens 1, 4 e 24 h	Ciprofloxacino, FSA (0,4 mg), incubação de 100 °C, 10 min
SONMEZOGLU, 2001	94%	83%	51 pacientes, imagens 1 e 4 h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
YAPAR, 2001	85%	92%	22 pacientes, imagens 1 e 4 h	Ciprofloxacino, FSA (0,4 mg), incubação de 100 °C, 10 min
LARIKKA, 2002a	86%	78%	16 pacientes, imagens 1, 4 e 24 h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
LARIKKA, 2002b	89%	95%	30 pacientes, imagens 1, 4 e 24h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
DUMAREY, 2002	84,2%	54,5%	71 pacientes, 4h e 8h ou 24h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
BRITTON, 2002	85,4%	81,7%	879 pacientes,	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
SARDA, 2003	100%	37,5%	27 pacientes, imagens 1,4 e 24 h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 5 min
MALAMITSI, 2003	97,2%	80%	45 pacientes, imagem 1 e 4 h	Ciprofloxacino, tartarato estanhoso, incubação temperatura ambiente, 15 min
De WINTER, 2004	42% 100%	a 91% a 74%	48 pacientes, imagens 1, 3 e 24 h	Ciprofloxacino, FSA (0,4mg), incubação de 100 °C, 10 min

- condensação de anéis nos carbonos 1,8 e 6,7 pode contribuir para o aumento da atividade;
- introdução de substituintes nas posições 5, 6, 7 e 8 pode ter um bom efeito na atividade:
  - o grupos como NH<sub>2</sub> ou átomo de flúor ligados ao Carbono 5, mantém atividade;
  - o o substituinte flúor na posição 6 está associado com aumento significativo da atividade antibacteriana;
  - o substituintes como piperazina ou pirrolidina na posição 7 aumentam a atividade da classe contra *Pseudomonas aeruginosa*;
  - o substituintes como cloro, flúor ou metoxila na posição 8 conferem aumento da atividade antibacteriana.
- Adição de substituintes na posição 2 diminuem ou anulam a atividade.

### 3.4.2 Mecanismo de ação

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos de amplo espectro e ação bactericida. O principal mecanismo de ação das quinolonas é a inibição de enzimas da replicação do ADN bacteriano, consistindo na inibição das subunidades A da ADN-girase. Dois filamentos de ADN devem ser separados para permitir a replicação ou transcrição do ADN. Todavia, qualquer fator capaz de separar os filamentos resulta em superespiralamento positivo do ADN em frente do ponto de separação. Para evitar este obstáculo mecânico, a enzima ADN-girase faz a introdução contínua de superespirais negativas do ADN. Trata-se de uma reação ATP-dependente que requer ruptura de ambos os filamentos de ADN para permitir passagem de um segmento de ADN através da ruptura, que é posteriormente refeita. Estudos demonstraram que as

quinolonas formam um complexo estável com sítios de ligação que se formam após a ligação da enzima ao ADN bacteriano (HARDMAN *et al.*, 2003).

As células eucarióticas não contêm ADN girase. Todavia, possuem outras enzimas (ADN-topoisomerase tipo II) que removem superespirais do ADN eucariótico, a fim de evitar seu entrelaçamento durante a replicação. As quinolonas só inibem a topoisomerase em altas concentrações (HARDMAN *et al.*, 2003).

Algumas cepas bacterianas apresentaram resistência às quinolonas, resultado de mutações no gene que codifica a enzima (ADN girase ou topoisomerase) e pela alteração na permeabilidade da parede celular que está relacionada com a captação e efluxo do antimicrobiano (HARDMAN *et al.*, 2003, PARFITT, 1999; HANG *et al.*, 2001).

### 3.4.3 Espectro de ação

Ação antimicrobiana (PARFITT, 1999):

- Bactérias aeróbicas gram-negativas: *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia spp.*); *Pseudomonas aeruginosa*; *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis*; *Campylobacter spp.*; *Gardanerella vaginalis*; *Pasteurella multocida*; *Vibrio spp.*; *Helicobacter pylori*; *Legionella spp.*;
- Bactérias aeróbicas gram-positivas: *Staphylococcus*; *Corynebacterium spp.*; *Listeria Moncytogenes*;
- Bactérias anaeróbicas: *Bacteroides fragilis* e *Clostridium difficile* são resistentes.
- Outros Microrganismos: *Mycobacter*; *Mycoplasma*; *Rickettsia*; *Plasmodium falciparum*; *Clamydia trachomatis*, *Nocardia asteroides*, *Ureplasma urealyticum* considerados resistentes.

### 3.4.4 Farmacocinética

Em relação à farmacocinética, estes fármacos têm uma boa absorção por via oral, distribuem-se relativamente bem pelos tecidos do corpo, ligam-se moderadamente às proteínas plasmáticas, atravessam a barreira placentária e podem ser eliminados pelo leite. São parcialmente metabolizados pelo fígado e excretados pelos rins (HARDMAN *et al.*, 2003; HANG *et al.*, 2001).

As principais características farmacocinéticas do CIP e do PEF estão na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Principais características farmacocinéticas do ciprofloxacino e do pefloxacino (RITCHEL e KEARNS, 1999)

Parâmetro farmacocinético	ciprofloxacino	pefloxacino
Dose usual (mg/dia)	250-750	400-1000
Biodisponibilidade (%)	65-80	95-100
$t_{\text{máx}}$ (h)	0,7-1,8	1,3
$t_{1/2}$ (h)	4,0	8,5
Vd (l/kg)	2,2	0,16
Cl <sub>ren</sub> (l/h)	14	1,5

### 3.4.5 Interações Farmacológicas

As principais interações farmacológicas das quinolonas são (HANG *et al.*, 2001):

- antiácidos (diminui a absorção de quinolonas por quelação);
- metoclopramida (acelera a absorção das quinolonas);

- probenecida (diminui a excreção das quinolonas);
- nitrofurantoina, cloranfenicol, rifampicina (antagonizam ação antimicrobiana);
- teofilina, cafeína e varfarina (aumento da concentração plasmática destes pela competição enzimática).

### 3.4.6 Efeitos adversos

Os efeitos adversos são raros, geralmente distúrbios gastrintestinais (náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal), erupções cutâneas, tontura e dor de cabeça. Algumas quinolonas estão associadas à maior incidência de reações alérgicas, principalmente de fotossensibilidade (HARDMAN *et al.*, 2003; HANG *et al.*, 2001).

### 3.4.7 Complexos quinolona-metal

As quinolonas têm excelente capacidade para quelar-se com metais resultando nas incompatibilidades com antiácidos e suplementos minerais contendo metais di e trivalentes. Quelatos são insolúveis em água, conseqüentemente, a administração oral simultânea de quinolonas e metais podem representar diminuição na biodisponibilidade do fármaco (DELGADO e REMERS, 1998).

A atividade das quinolonas pode ser reduzida na presença de certos íons metálicos pela formação de complexos metálicos mais solúveis (DREVENSEK *et al.*, 2005). HÖFFKEN e colaboradores (1985) foram os primeiros autores a relatar que a administração simultânea de antiácidos contendo íons metálicos como Mg e Al com CIP resultou na perda de atividade do fármaco.

A estequiometria do quelato formado depende de vários fatores como concentração relativa do agente quelante (quinolona), do metal presente, valência do íon metálico e pH (DELGADO e REMERS, 1998).

Atualmente, o mecanismo de ação dos complexos não está totalmente desvendado. Estudos recentes sugerem que os íons metálicos podem participar do mecanismo de ação destes fármacos, na interação da quinolona complexada com o ADN (JIMÉNEZ-GARRIDO *et al.*, 2005).

Há relatos que a presença de íons metálicos resulta num aumento no consumo do CIP pela bactéria, comparada com o fármaco sozinho (ZUPANCIC *et al.*, 2001).





#### 4.1 Material

Cloridrato de ciprofloxacino (CIP) e mesilato de pefloxacino (PEF), grau farmacêutico, obtidos junto às distribuidoras de matérias-primas farmacêuticas;

Reagentes e solventes orgânicos diversos (todos grau analítico): SnCl<sub>2</sub> anidro, acetona, hidróxido de amônio, etanol.

Gerador <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc em coluna seca, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN, São Paulo).

Equipamentos:

- Gama Câmara (E.CAM, Siemens, Alemanha, com matriz 256X256)
- Contador de Poço (Capintec, Inc., Estados Unidos, modelo CRC-35R)
- Espectrofotômetro infra-vermelho (Shimadzu, Japão, mod. FTIR 8101)
- Potenciômetro Digimed DM-20

A parte experimental do trabalho que envolveu manipulação de substâncias radioativas foi desenvolvida nos laboratórios da empresa Radiopharmacus, localizada no Parque Tecnológico da PUC e na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, por apresentarem condições ideais para a manipulação deste tipo de amostra. As análises das quinolonas e outras amostras não radioativas foram realizadas no LAPPS, sala 704 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e parte dos ensaios microbiológicos foi

desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Bioquímica, sala 707 da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Complexação quinolona/metálico

Como alternativa para avaliação do sítio de ligação quinolona:metal, adicionou-se a uma solução de ciprofloxacino diferentes soluções de sais metálicos (Cu, Ni e Mn), na proporção molar de 2:1. Após incubação por 10 min a temperatura ambiente e sem ajuste de pH, este foi elevado a 9,0 com NaOH 0,1 M para precipitar o complexo formado.

Os precipitados obtidos foram filtrados com papel de filtro comum e secos sobre sílica-gel, em dessecador a vácuo, até peso constante.

Cerca de 1,5 mg do precipitado foi triturado com cerca de 150 mg de KBr, em gral de ágata, para preparação das pastilhas e posterior leitura em espectrofotômetro de infravermelho.

### 4.2.2 Radiofármaco

#### 4.2.2.1 Preparação do fármaco

Para avaliar as condições ideais de preparação do radiofármaco utilizaram-se os procedimentos abaixo descritos.

**Procedimento A:** Solução de quinolona (CIP) 5mg/ml: pesou-se 500 mg de CIP e dissolveu-se em 100,0 ml de NaCl 0,9% em b.v.. Agente redutor: 100 mg de SnCl<sub>2</sub>, dissolvido em 50 mL de solução de NaCl 0,9% contendo 0,5 ml de HCl concentrado e. b.v.. Adicionou-se 20,0 ml da solução do agente redutor à solução de CIP e ajustou-se o pH das soluções com NaOH 1,0 N para 2,7,

3,0, 4,0 e 5,0. As soluções resultantes foram fracionadas em frascos de vidro fechados com rolha em frações de 2,0 mL obtendo-se as seguintes soluções:

1 – CIP 7,5 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1 mg, pH 2,7

2 – CIP 7,5 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1 mg; pH 3,0

3 – CIP 7,5 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1 mg; pH 4,0

4 – CIP 7,5 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1 mg; pH 5,0

**Procedimento B:** Solução de CIP a 0,2 mg/ml em NaCl 0,9%. Agente redutor foi preparado conforme descrito anteriormente nas concentrações de 0,1 mg/ml e 0,03 mg/ml de SnCl<sub>2</sub>. Separou-se duas frações de 20 ml da solução de quinolona e adicionou-se 20 mL da solução de agente redutor (0,1 mg/ml ou 0,03 mg/ml) a cada uma. Após a mistura das soluções ajustou-se o pH com NaOH 1,0 N para 4,0 e 6,0. As soluções resultantes foram fracionadas em frascos de vidro fechados com rolha em frações de 2,0 mL obtendo-se as seguintes soluções:

1 – CIP 2,0 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1, mg; pH 4,0

2 – CIP 2,0 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,1, mg; pH 6,0

3 – CIP 2,0 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,03 mg; pH 4,0

4 – CIP 2,0 mg; SnCl<sub>2</sub> 0,03 mg; pH 6,0

**Procedimento C:** Solução de quinolona dissolvida em NaCl 0,9% com concentração de 2,0 mg/ml, como mencionado anteriormente. O agente redutor, ácido formamídínico sulfônico (FSA), foi preparado nas concentrações de 0,4 mg/ml, 1,0 mg/ml e 3,0 mg/ml. Separou-se frações de 20 mL da solução de quinolona e adicionou-se 20 mL das soluções de agente redutor. Após a mistura das duas soluções ajustou-se o pH com NaOH 1,0 N para 4,0 e 6,0. As

soluções resultantes foram fracionadas em frascos de vidro em porções de 2,0 mL obtendo-se as seguintes soluções:

1 – CIP 2,0 mg; FSA 0,4 mg; pH 4,0

2 – CIP 2,0 mg; FSA 0,4 mg; pH 6,0

3 – CIP 2,0 mg; FSA 1,0 mg; pH 4,0

4 – CIP 2,0 mg; FSA 1,0 mg; pH 6,0

5 – CIP 2,0 mg; FSA 3,0 mg; pH 4,0

6 – CIP 2,0 mg; FSA 3,0 mg; pH 6,0

**Procedimento D:** Solução de pefloxacino (PEF) dissolvida em NaCl 0,9% com concentração de 2,0 mg/mL. Agente redutor:  $\text{SnCl}_2$  foi preparado conforme descrito anteriormente na concentração de 0,03 mg/ml. Separou-se duas frações de 20 mL da solução de quinolona e adicionou-se 20 mL da solução de agente redutor 0,03 mg/mL. Após a mistura das soluções ajustou-se o pH com NaOH 1,0 N para 4,0. A solução resultante foi fracionada em frascos de vidro em porções de 2,0 mL obtendo-se a seguinte concentração:

1 – PEF 2,0 mg;  $\text{SnCl}_2$  0,03 mg; pH 4,0

#### 4.2.2.2 Complexação do radiofármaco

As misturas de quinolona e agente redutor foram marcadas com  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , obtido de geradores  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  de coluna do IPEN/CNEN, numa atividade de 10-15 mCi em volume de 1,0 mL. A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente ou em banho-maria (100°C).

A composição das soluções obtidas e a temperatura de incubação de cada uma são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Especificações dos componentes do radiofármaco.

<b>Fármaco</b>	<b>Agente redutor</b>	<b>pH</b>	<b>Radioisótopo</b>	<b>Incubação</b>
<b>Procedimento A</b>				
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	2,7	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	2,7	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	3,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	3,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	5,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 7,5 mg	0,1 mg SnCl <sub>2</sub>	5,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
<b>Procedimento B</b>				
Ciprofloxacino 2 mg	0,03 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,03 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	0,03 mg SnCl <sub>2</sub>	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,03 mg SnCl <sub>2</sub>	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	0,10 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,10 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	0,10 mg SnCl <sub>2</sub>	6,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,10 mg SnCl <sub>2</sub>	6,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
<b>Procedimento C</b>				
Ciprofloxacino 2 mg	0,4 mg FSA	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,4 mg FSA	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	0,4 mg FSA	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	0,4 mg FSA	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente

Ciprofloxacino 2 mg	1,0 mg FSA	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	1,0 mg FSA	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	1,0 mg FSA	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	1,0 mg FSA	6,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	3,0 mg FSA	4,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	3,0 mg FSA	4,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
Ciprofloxacino 2 mg	3,0 mg FSA	6,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	100 °C
Ciprofloxacino 2 mg	3,0 mg FSA	6,0	10mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente
<b>Procedimento D</b>				
Pefloxacino 2,0 mg	0,03 mg SnCl <sub>2</sub>	4,0	10 mCi <sup>99m</sup> Tc	Temp. ambiente

#### 4.2.3 Controle Radioquímico

O controle radioquímico é utilizado para analisar a marcação, ou seja, a complexação do fármaco ao radioisótopo e, além disso, determinar a porcentagem das impurezas que possam estar presentes na formulação.

As placas de CCD, utilizando gel de sílica 60 (Merck), foram desenvolvidas com três diferentes fases móveis:

- acetona;
- NaCl 0,9%;
- hidróxido de amônio:etanol:H<sub>2</sub>O (1:2:5).

O tamanho das placas foi de 10,0 cm de altura e 2,0 cm de largura. Após a reação entre o fármaco e radionuclídeo 50 µl foram aplicados sobre a placa de gel de sílica.

Logo depois do desenvolvimento da cromatografia a posição das manchas foi avaliada com o auxílio de lâmpada UV (254 nm), gama-câmara

e/ou cortadas conforme esquema descrito na Figura 4.1, para posterior medida em contador de poço (OWUNWANE *et al.*, 1995; BARRETO *et al.*, 2000; SIAENS *et al.*, 2004). O resultado do controle radioquímico foi expresso em porcentagem, considerando-se a radioatividade total da placa.

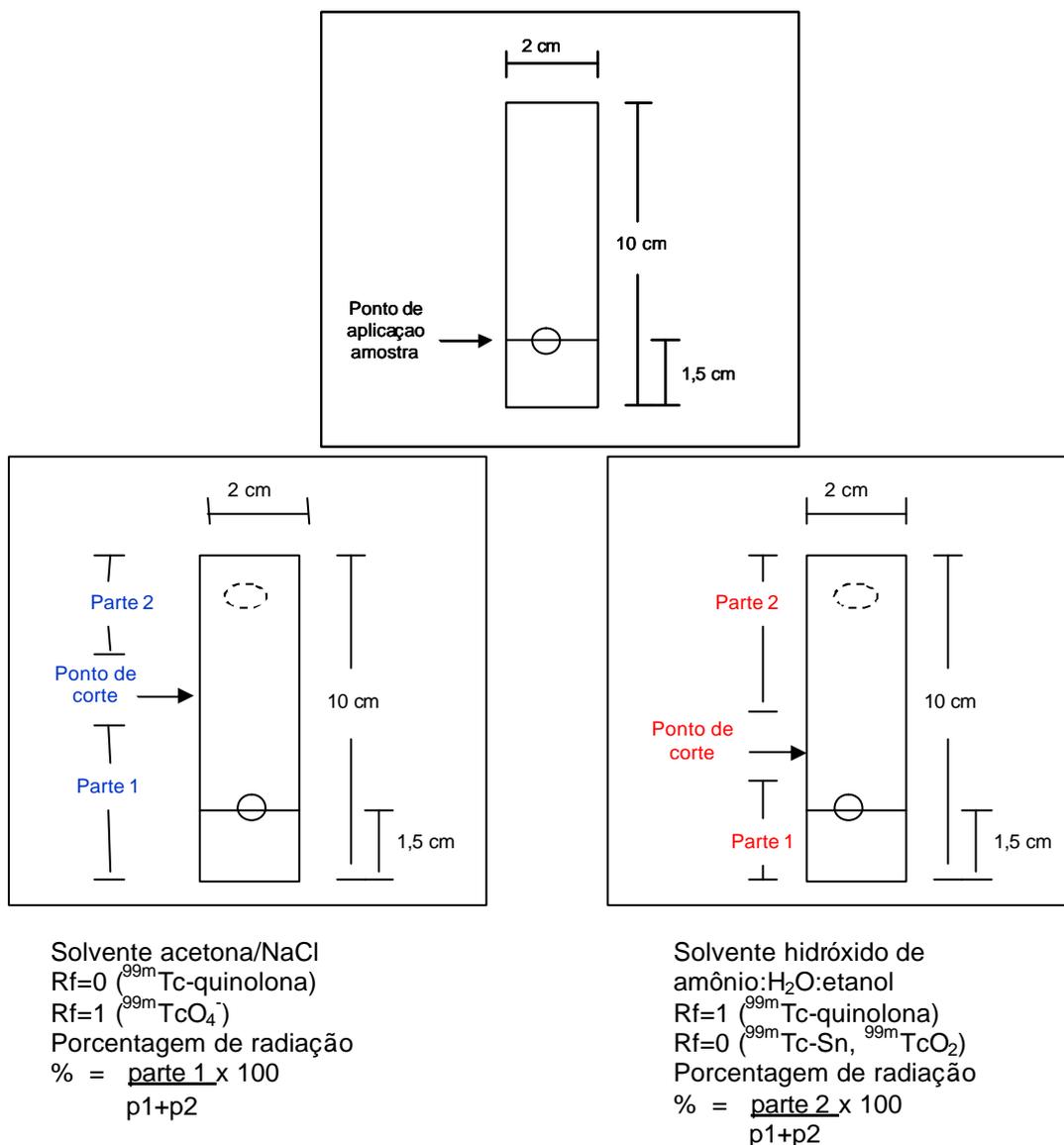


Figura 4.1: Preparação das placas cromatográficas para contagem em contador de poço.

#### 4.2.4 Extração em fase sólida

Testaram-se colunas de fase sólida de sílica gel e C18 a fim de separar o colóide formado. Primeiramente foram realizados alguns testes para o condicionamento da coluna, lavagem e eluição dos analitos das mesmas (soluções, solventes e vazões).

Os cartuchos de C18 (Speed™ C18/18) e gel de sílica, foram condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL NaCl 0,9%. A seguir, a amostra foi adicionada ao cartucho – 1,0 mL do radiofármaco marcado - eluído com 2 ml de NaCl 0,9% e 2 ml de etanol ou metanol.

Os controles radioquímicos para detecção da impureza de interesse foram realizados antes da passagem do radiofármaco pela coluna e posteriormente.

#### 4.2.5 Testes microbiológicos

##### 4.2.5.1 Avaliação da ligação $^{99m}\text{Tc}$ -quinolona com diferentes cepas bacterianas

Para avaliar a ligação dos radiofármacos às bactérias, utilizaram-se as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus*, (American Type Culture Collection - ATCC 25923); *Staphylococcus epidermides* (ATCC 12228); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). As cepas foram suspensas em tubos de ensaio contendo Caldo de Soja e Tripticaseína (TSB) com turvação equivalente a 0,5 McFarland, contendo aproximadamente  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/ml. 0,2 ml desta suspensão foram incubados a 37 °C por 1 h com 0,2 mL do radiofármaco diluído 1:10 com NaCl 0,9% ( $^{99m}\text{Tc}$ -CIP ou  $^{99m}\text{Tc}$ -PEF) e 1,6 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM com ácido acético 0,01 M, contendo 0,01% de Tween 80 (50%, V/V). A avaliação do grau de ligação das quinolonas às bactérias foi realizada por dois métodos diferentes.

Método 1: centrifugação.

Após incubação a solução foi centrifugada numa rotação de 2000 g por 5 minutos. Após separação do sobrenadante, lavou-se o centrifugado com NaCl 0,9%, recentrifugou-se e removeu-se novamente o sobrenadante. A atividade foi monitorada através de contador de poço, relacionando a atividade do centrifugado com a atividade total (sobrenadante e centrifugado).

Método 2: filtração.

Após incubação a solução foi filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ , Milipore®, Estados Unidos) e o material retido no filtro foi lavado com NaCl 0,9% (1,5 mL). Após, realizou-se a leitura da radiação através de um contador de poço. A percentagem de ligação do radiofármaco à bactéria foi determinada pela atividade do filtro dividida pela atividade total (filtro mais a radiação do filtrado) multiplicado por 100.

### **4.3 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido de teste de Duncan quando observadas diferenças significativas entre tratamentos ( $\alpha=0,5$ ).

### **4.4 Descarte de resíduos radioativos**

Os resíduos radioativos foram descartados conforme Norma CNEN-NE-6.05, de dezembro de 1985.

### **4.5 Descarte de resíduos não-radioativos**

Os resíduos não radioativos utilizados para as análises foram descartados conforme o Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGR) da Faculdade de Farmácia baseado no disposto na Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº. 306, de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) e na Resolução Nº. 358, de 29 de abril de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).





### 5.1 Avaliação do complexo quinolona-metal por FTIR

Na literatura estão relatados vários estudos avaliando a ação quelante de quinolonas com diversos cátions divalentes (principalmente  $Mg^{++}$ ,  $Cu^{++}$  e  $Fe^{++}$ ). As quinolonas no estado “anfotérico” (*zwitterion*) são potencialmente capazes de formar complexos simples. Nestes estudos a quinolona se coordena com os íons metálicos, geralmente em ligações bidentadas através do grupo carbonila da posição 4 (4-oxo) e do grupo carboxílico da posição 3. Os quelatos correspondem a complexos equimoleculares carregados positivamente (complexos 1:1) responsáveis por ação bactericida ou de complexos neutros de estequiometria 2:1 (quinolona:metal) como pode ser visualizado na Figura 5.1 com o CIP (BRION, 1992, SADEEK, 2005).

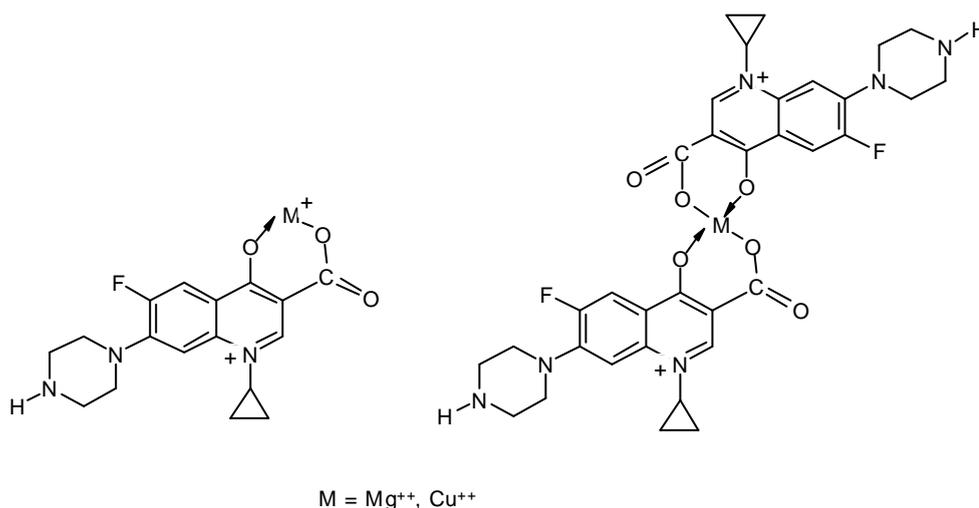


Figura 5.1: Complexos metálicos com as quinolonas (BRION, 1992).

De acordo com a literatura, os máximos de absorção característicos das quinolonas são as bandas de vibração do grupo NH, próximo a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , do

grupo OH em 3000 – 3500  $\text{cm}^{-1}$ , a banda da carboxila (COOH) ligada ao C3 que aparece na região entre 1712 a 1730  $\text{cm}^{-1}$  e a banda da carbonila conjugada (CO, estrutura  $\alpha,\beta$ -insaturada) em C4, que aparece entre 1616 a 1633  $\text{cm}^{-1}$  (GAO *et al.*, 1995; AL-MUSTAFA, 2002; PSOMAS *et al.*, 2006).

A baixa concentração do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $\sim 10^{-9}\text{M}$ ) nas reações de complexação com fármacos apresenta um grande problema para a determinação da estequiometria da reação (SAHA, 2004). Assim sendo, avaliou-se a ligação de quinolonas ao Mn, metal da mesma família na tabela periódica, grupo VIIB (Mn, Tc e Re), ao invés do  $^{99}\text{Tc}$ , considerando que o local de ligação deve ser o mesmo. Tendo em vista que existem mais trabalhos avaliando a estrutura dos complexos com quinolonas e metais como Cu, Mn e Ni, estes também foram preparados, conforme descrito em 4.2.1, com o objetivo de poder evidenciar os grupos químicos participantes do complexo.

As Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 apresentam os espectros de infravermelho do CIP livre, na forma de cloridrato, ligado ao Cu, Ni e Mn, respectivamente.

Como pode ser observado nas figuras citadas, os espectros de todos os complexos avaliados evidenciam alterações ocorridas após a formação dos mesmos na região da carboxila do ácido ligado ao C3.

Nos espectros dos complexos com Cu, Ni e Mn é possível constatar o desaparecimento da banda em 1709  $\text{cm}^{-1}$ , referente à carboxila. Aparentemente, a partir deste fato, a complexação ocorre entre o carboxilato e o metal. Entretanto, analisando o espectro com Cu, observa-se um alargamento da banda em 1624  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao grupamento 4-oxo, com o surgimento de outra em 1615  $\text{cm}^{-1}$ . Desta maneira, não é possível afirmar que a carbonila não estaria envolvida no complexo, pois pode haver uma sobreposição de bandas.

No caso do espectro do CIP-Ni e CIP-Mn, diferentemente, observa-se uma banda em 1633  $\text{cm}^{-1}$  e 1613,8  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, e o desaparecimento da banda em 1624  $\text{cm}^{-1}$ . Da mesma forma que anteriormente, esta banda também pode ser atribuída tanto ao complexo carboxilato-Ni ou carboxilato-Mn, quanto ao 4-oxo.

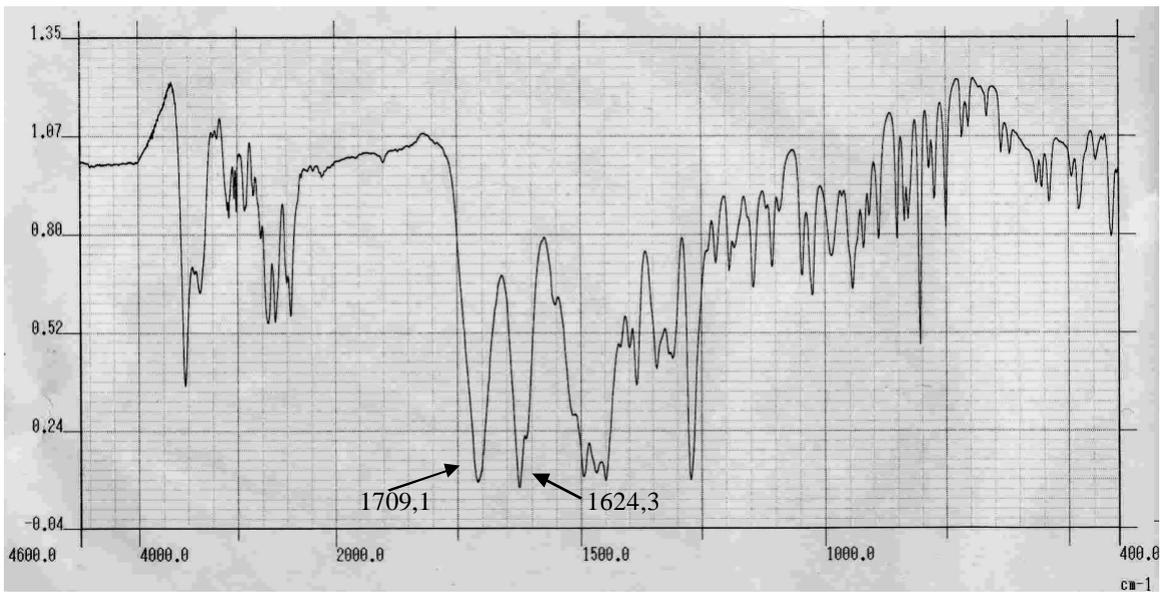


Figura 5.2: Espectro de infravermelho do cloridrato de ciprofloxacino

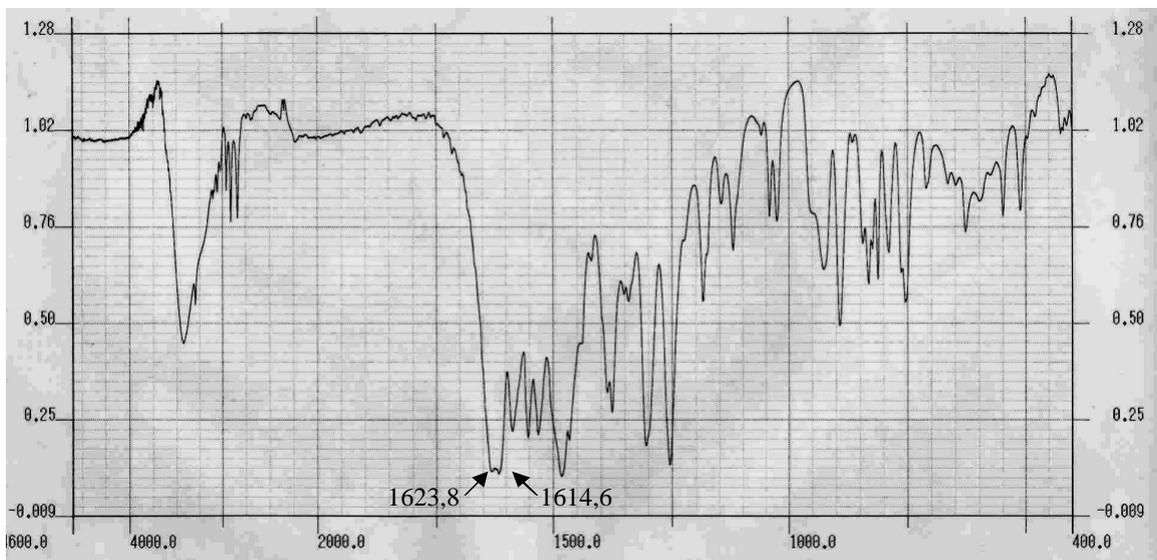


Figura 5.3: Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:cobre.

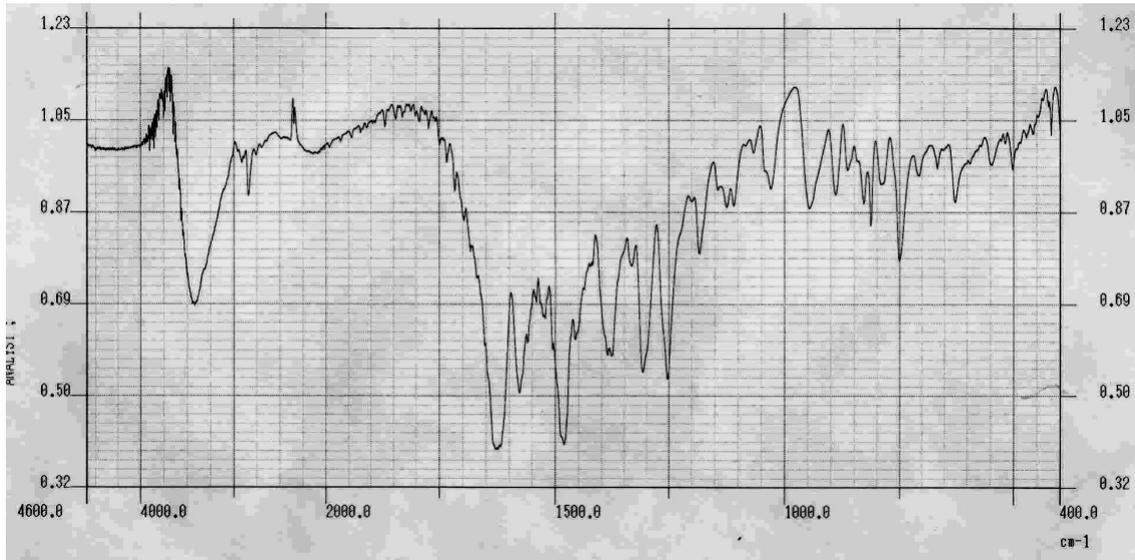


Figura 5.4: Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:níquel.

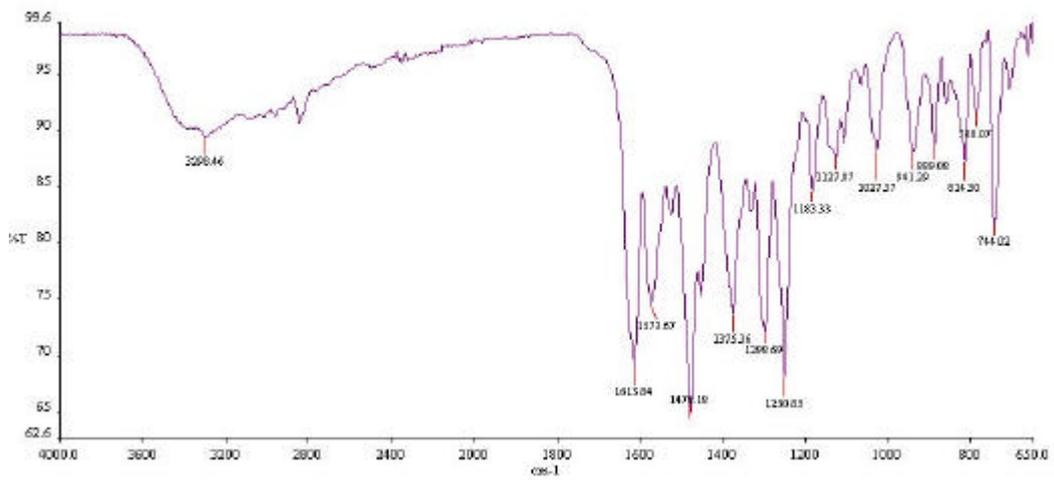


Figura 5.5: Espectro de infravermelho do complexo ciprofloxacino:mangânês.

Resultados semelhantes foram encontrados por SADEEK (2005), nos complexos de norfloxacino-Mn, norfloxacino-Co e norfloxacino-Fe, e WU e colaboradores (2003), trabalhando com complexo de CIP-Cu.

Outra diferença encontrada por WU e colaboradores (2003) no espectro após a complexação foi a modificação da banda centrada em  $3528\text{ cm}^{-1}$ , característica da ligação NH. Houve um alargamento da banda, mostrando máximo de absorção entre  $3438\text{ cm}^{-1}$ . Este mesmo comportamento foi observado nas figuras acima (5.3, 5.4 e 5.5) e por outros pesquisadores (LÓPEZ-GRESA *et al.*, 2002; SADEEK, 2005). Este alargamento é referente à ligação NH característica de sais de aminas, que apresentam fortes bandas de absorção na região  $3200\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  (COLTHUP, 1990), sugerindo que houve a complexação com Cu, Ni e Mn.

SADEEK (2005) propôs a razão molar da complexação do norfloxacino com Mn (II), Co (II) e Fe (III) de 2:1, 2:1 e 3:1, respectivamente, e a ligação ocorreu pelos átomos de oxigênio dos grupos carbonila e carboxílico, com migração do átomo de hidrogênio do grupo carboxílico para o grupo piperazínico, gerando um nitrogênio quaternário. Porém, assim como nos trabalhos anteriormente mencionados, os resultados aqui verificados não permitem fazer esta afirmação.

O mesmo comportamento observado para o Cu e Ni ocorreu com o complexo com Mn, indicando a participação da carbonila em C3 no complexo formado.

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana de complexo CIP-Mg, isto é, observar se a complexação da carbonila em C3, responsável pela ligação do fármaco à enzima, poderia influir em sua atividade, TUREL e colaboradores (2002) testaram o complexo frente a vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, observando uma diminuição de atividade antimicrobiana.

Resultados diferentes foram encontrados em outro estudo, onde CIP e enoxacino foram complexados com Cu, Mg e Co e suas atividades antimicrobianas foram verificadas através da concentração inibitória mínima

(CIM), frente a 34 cepas bacterianas diferentes. Os autores concluíram que tanto a quinolona livre quanto a complexada apresentou atividade semelhante, com exceção do complexo com Mg, que demonstrou uma atividade inferior à quinolona livre, sugerindo que o mecanismo de ação quando o íon Mg está envolvido é diferente. Os autores sugerem que íons metálicos podem participar do mecanismo de ação destes fármacos, na interação da quinolona/ADN-girase (JIMÉNEZ-GARRIDO *et al.*, 2005).

Estas observações contraditórias ressaltam a importância de avaliar a capacidade destes complexos em se ligar às bactérias.

## 5.2 Cromatografia de Camada Delgada

### 5.2.1 Controle Radioquímico

O controle radioquímico é utilizado para analisar a eficiência da marcação, ou seja, a complexação do fármaco ao radioisótopo e, além disso, determinar a porcentagem das impurezas que possam estar presentes. Estas impurezas proporcionam a formação de radiofármacos com baixa qualidade, com características de biodistribuição não diferenciada, podendo causar problemas nas interpretações dos exames (MARQUES *et al.*, 2001).

As impurezas relatadas na literatura do radiofármaco quinolona-<sup>99m</sup>Tc são duas: o metal radioativo livre (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) e colóide (<sup>99m</sup>Tc-Sn). O metal radioativo livre apresenta maior afinidade pela tireóide, glândula salivar, estômago e rins, enquanto que o colóide se concentra no fígado, rins e em neutrófilos e monócitos periféricos, através do processo de fagocitose (HUNG *et al.*, 1996; RAMSAY *et al.* 2005; ZOLLE, 2007).

Como estes elementos sanguíneos, células brancas ou leucócitos, estão presentes em processos inflamatórios, bem como em processos infecciosos, eles prejudicam sua diferenciação. Poucos autores avaliam a formação dessas impurezas nas preparações de radiofármacos para diagnóstico de infecção.

Utilizando o sistema cromatográfico de fase sólida gel sílica e os eluentes: acetona, NaCl 0,9% e hidróxido de amônio:etanol:H<sub>2</sub>O (1:2:5), verificou-se a complexação do metal à quinolona.

A quantidade de SnCl<sub>2</sub> é empiricamente otimizada para cada formulação, mantendo o equilíbrio entre dois parâmetros: quantidade suficiente para reduzir todo o pertecnetato de sódio adicionado e o menor excesso possível, a fim de evitar a redução adicional de pertecnetato a estados de oxidação inferiores (ZOLLE, 2007). Outro aspecto que pode gerar impurezas é a presença de oxigênio no frasco, particularmente antes da adição de pertecnetato de sódio, resultando na oxidação do estanho disponível para reduzir o Tc<sup>+7</sup> e, conseqüentemente, impedindo a complexação do metal ao fármaco. O pertecnetato de sódio (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) permanece livre gerando problemas do momento da imagem (SAHA, 2004).

Testou-se, primeiramente, a mistura ClP:SnCl<sub>2</sub> (7,5 mg e 0,1 mg), com variação de pH de 2,7 a 5,0 e marcação de 10 a 15 mCi, com incubação à temperatura ambiente e a 100 °C, verificando-se a possível formação de radioisótopo livre e colóide. Nestas preparações foram observadas baixas quantidades de Tc livre (= 5%) em todas as marcações realizadas, variando temperatura e pH, como demonstrado na Figura 5.6 (Rf=1 para o Tc livre e Rf=0 para o radiofármaco, nos solventes NaCl 0,9% e acetona). Porém, detectou-se a presença de colóide (±30 %), impureza radioquímica (Rf=0 para colóide e Rf=1 para o radiofármaco), na fase móvel hidróxido de amônio:etanol:H<sub>2</sub>O (1:2:5), específico para a análise do colóide, conforme Figura 5.7.

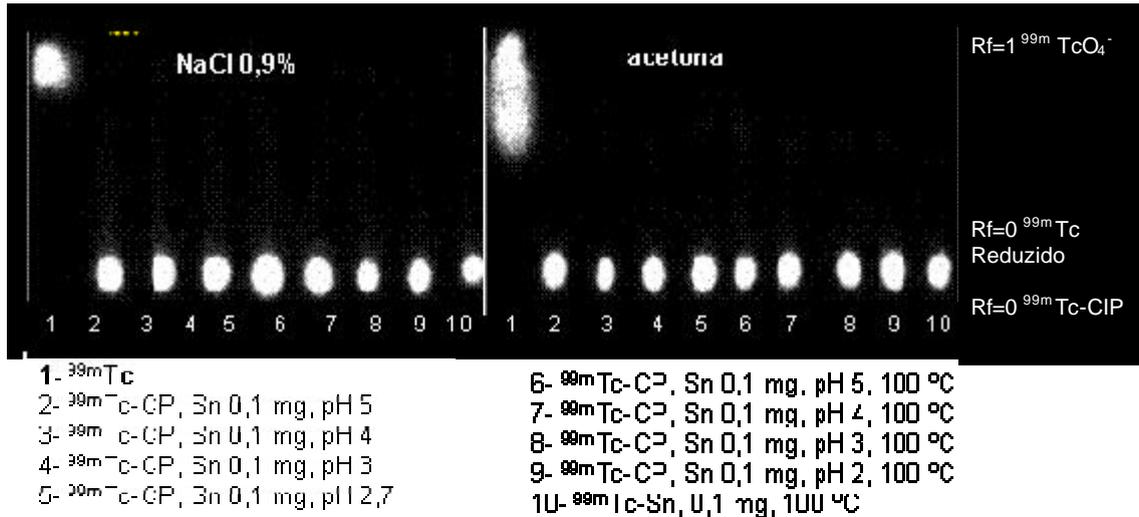


Figura 5.6: Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fases móveis acetona e NaCl 0,9%.

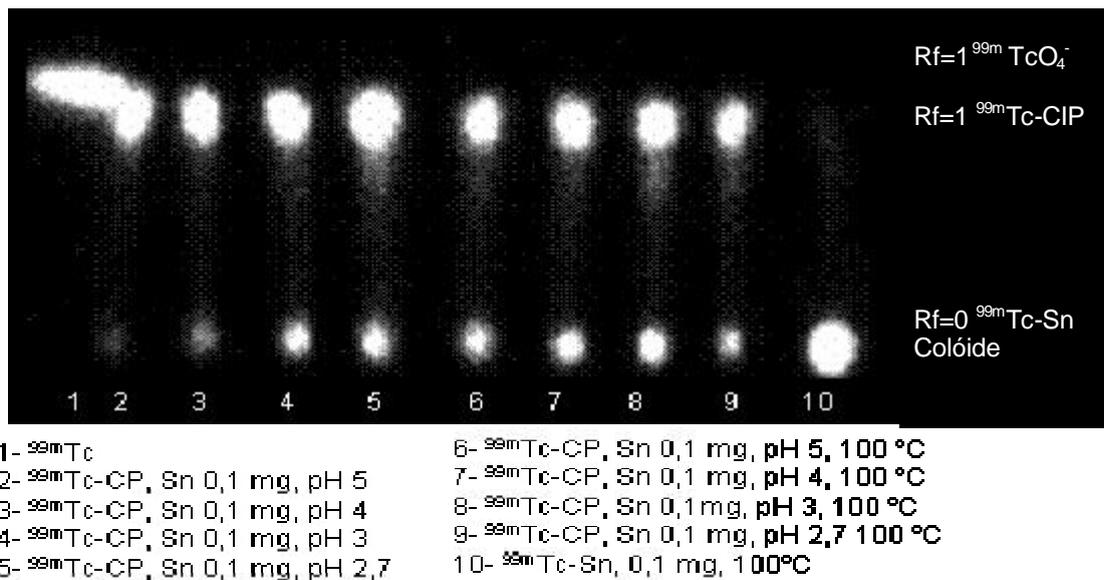


Figura 5.7: Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:2:5).

Verificou-se que a quantidade de colóide formada nas formulações preparadas sob aquecimento foi significativamente maior que nas soluções incubadas à temperatura ambiente (40 % e 19 %, respectivamente,  $p < 0,05$ ,

n=6) e que nestas a quantidade foi menor em pH mais elevado, conforme esquematizado na Figura 5.8.

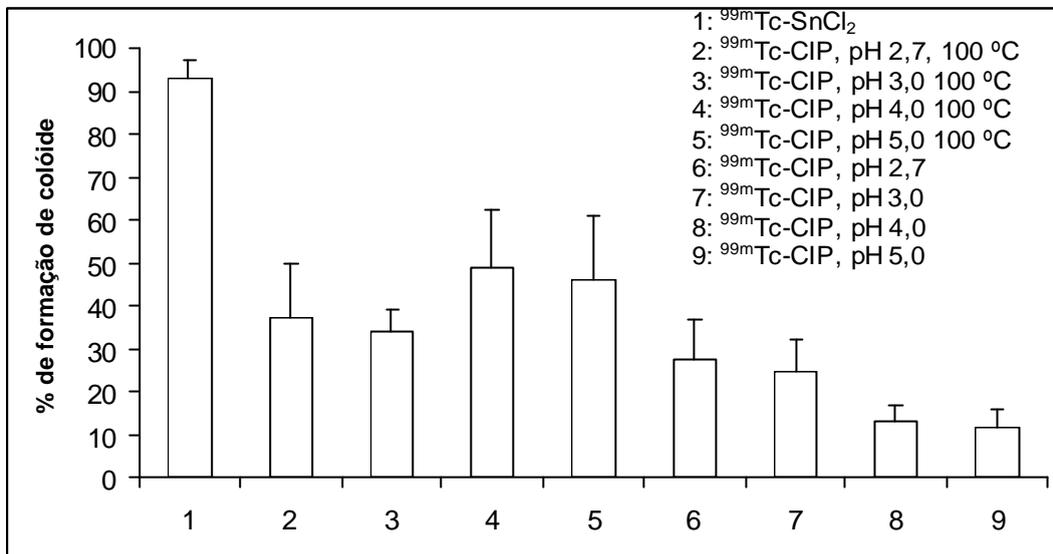


Figura 5.8: Avaliação da formação de colóide (média  $\pm$  DP, n=6). Controle de qualidade radioquímico em solvente  $\text{NH}_4\text{OH}$ :etanol:água (1:2:5).

A análise estatística (ANOVA seguida de teste de Duncan) apresentou os seguintes resultados:

- $^{99m}\text{Tc-SnCl}_2$  foi diferente de todas as outras amostras;
- $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5,0 e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0 são diferentes das demais;
- $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 3,0 é diferente de  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5,0, 100 °C e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0, 100 °C;
- $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 2,7 é diferente de  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5,0,  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0,  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5,0, 100 °C e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0, 100 °C;
- $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0, 100 °C é diferente de  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 3,0, 100 °C.

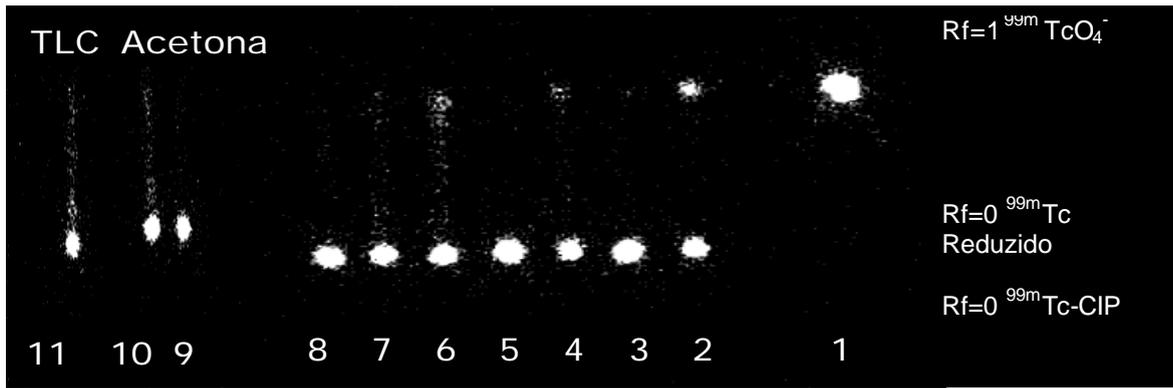
O íon estano (Sn<sup>2+</sup>) tem a função de gerar os estados de oxidação reduzidos do  $^{99m}\text{Tc}$ , que se ligam aos fármacos. Quantidade insuficiente de

$\text{Sn}^{2+}$  leva à obtenção de radiofármacos com baixa pureza radioquímica. Por outro lado, o excesso pode levar à formação de Tc reduzido (TcHR) e de colóide (MARQUES *et al.*, 2001). O colóide é uma impureza que deve ser evitada, pois dependendo da quantidade presente, pode modificar o padrão de biodistribuição e limitar o valor diagnóstico do radiofármaco preparado/marcado (ZOLLE, 2007).

Com o objetivo de diminuir a formação de colóide, avaliou-se a concentração do  $\text{SnCl}_2$  (0,1 mg e 0,03 mg) associado ao pH (4,0 e 6,0) e temperatura (100 °C e ambiente). Utilizou-se o pH 6,0 ao invés de 5,0 para avaliar um valor mais próximo da neutralidade, uma vez que o experimento anterior apresentou bons resultados tanto para o pH 4,0 quanto para o pH 5,0, onde houve menor formação de colóide. Em ambas as concentrações de agente redutor foi possível observar baixas quantidades de radioisótopo livre na forma de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , de acordo com o controle radioquímico, sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ,  $n=2$ ). Desta forma, podemos afirmar que mesmo a concentração mais baixa de agente redutor é suficiente para reduzir o  $\text{Tc}^{+7}$ , permitindo que este se ligue ao fármaco (Figura 5.9). Porém, através da CCD detectou-se que o aquecimento aumentou a formação de colóide (Figuras 5.10 e 5.11).

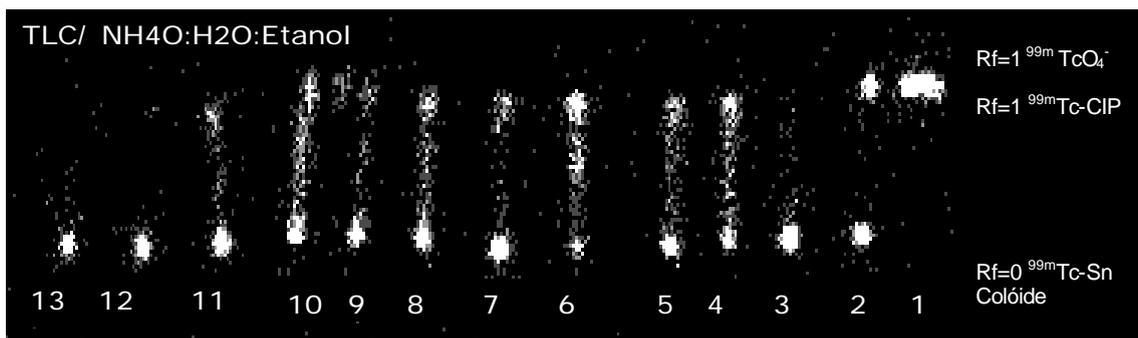
A fim de verificar a complexação com o Tc e uma possível variação na atividade antibacteriana, uma segunda quinolona, o pefloxacino, foi analisado de forma inédita. O PEF possui tempo de meia-vida superior ao CIP (RITCHEL e KEARNS, 1999) e desta forma poderia auxiliar nas imagens tardias utilizadas em medicina nuclear. Utilizou-se a preparação de CIP que apresentou menor formação de colóide para a preparação do radiofármaco,  $^{99\text{m}}\text{Tc}:\text{PEF}$  (2 mg),  $\text{SnCl}_2$  (0,03 mg), temperatura ambiente e pH 4,0. Os resultados do controle radioquímico em CCD foram semelhantes aos obtidos com o CIP, apresentando baixas concentrações de radioisótopo  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (< 5%) e concentrações de colóide em torno de 11%.

Através do teste ANOVA, seguido do teste de Duncan ( $p < 0,05$ ), foi possível determinar que o principal fator que influenciou a formação de colóide foi o aquecimento, contribuindo para um maior teor desta impureza.



- |  |  |
|--|--|
| 1- Tc  | 7- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 6,0, 100 °C |
| 2- Tc-SnCl <sub>2</sub> , 0,03 mg                    | 8- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 4,0          |
| 3- Tc- SnCl <sub>2</sub> , 0,1 mg                    | 9- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 4,0, 100 °C  |
| 4- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 4,0         | 10- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 6,0         |
| 5- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 4,0, 100 °C | 11- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 6,0, 100 °C |
| 6- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 6,0         |  |

Figura 5.9: Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel acetona.



- |  |  |
|--|--|
| 1- Tc  | 7- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 6,0, 100 °C |
| 2- Tc-SnCl <sub>2</sub> , 0,03 mg                    | 8- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 4,0          |
| 3- Tc- SnCl <sub>2</sub> , 0,1 mg                    | 9- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 4,0, 100 °C  |
| 4- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 4,0         | 10- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 6,0         |
| 5- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 4,0, 100 °C | 11- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,1 mg, pH 6,0, 100 °C |
| 6- Tc-CIP, SnCl <sub>2</sub> 0,03 mg, pH 6,0         | 12- Tc-SnCl <sub>2</sub> , 0,03 mg, 100 °C           |
|  | 13- Tc- SnCl <sub>2</sub> , 0,1 mg, 100 °C           |

Figura 5.10: Controle radioquímico (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0). Fase móvel NH<sub>4</sub>OH:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:5).

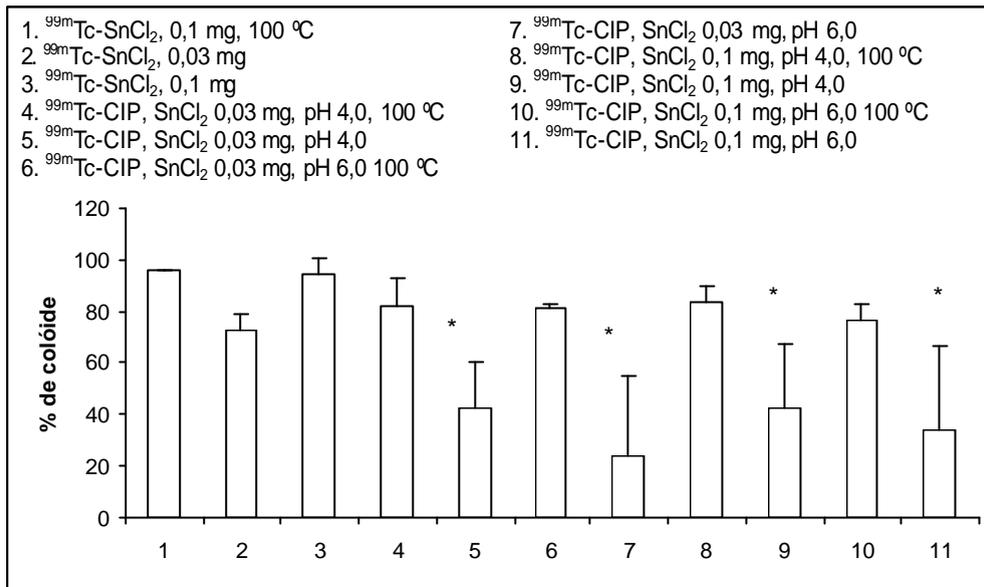


Figura 5.11: Controle de qualidade radioquímico em solvente hidróxido de amônio:etanol:água (1:2:5). As colunas representam as médias e desvio padrão (n=2). \* Diferentes dos demais (ANOVA seguido de teste de Duncan,  $p < 0,05$ )

Alguns autores utilizam cartuchos de extração de fase sólida C18 para retirar o colóide formado (SIAENS *et al.*, 2004). Com objetivo de avaliar esta possibilidade, realizou-se alguns ensaios com os cartuchos C18, (Speed™ C18/18, Applied Separations, Allentown, E.U.A.), mas estes não apresentaram resultados satisfatórios nas condições testadas. Não ocorreu diferença significativa na porcentagem de colóide antes e após a passagem pelos cartuchos.

Outro agente redutor testado foi o ácido formamídínico sulfônico – FSA. A primeira quantidade testada foi de 0,4 mg e esta não foi efetiva para reduzir o  $\text{TcO}_4^-$ . Conseqüentemente, aumentou-se a quantidade para 1,0 mg e 3,0 mg para realização dos testes. O aquecimento mostrou-se imprescindível para ocorrer a complexação. Mesmo aumentando a quantidade de FSA (1,0 mg e 3,0 mg) não foi possível reduzir todo o  $\text{TcO}_4^-$  adicionado. Verificou-se que cerca de 37% do Tc adicionado não foi reduzido. Ou seja, obtiveram-se baixas concentrações de radiofármaco marcado e concentrações consideráveis de impureza. BENITEZ e colaboradores (2006) citam em seu trabalho, também, a baixa eficiência de complexação do radioisótopo ao fármaco utilizando o FSA

na concentração de 0,40 mg. As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam os principais resultados obtidos com o uso de FSA. Além disso, observou-se que o FSA perde a eficiência como agente redutor no momento que é congelado, ao contrário do SnCl<sub>2</sub>, que pode ser congelado e descongelado sem perder sua atividade redutora.

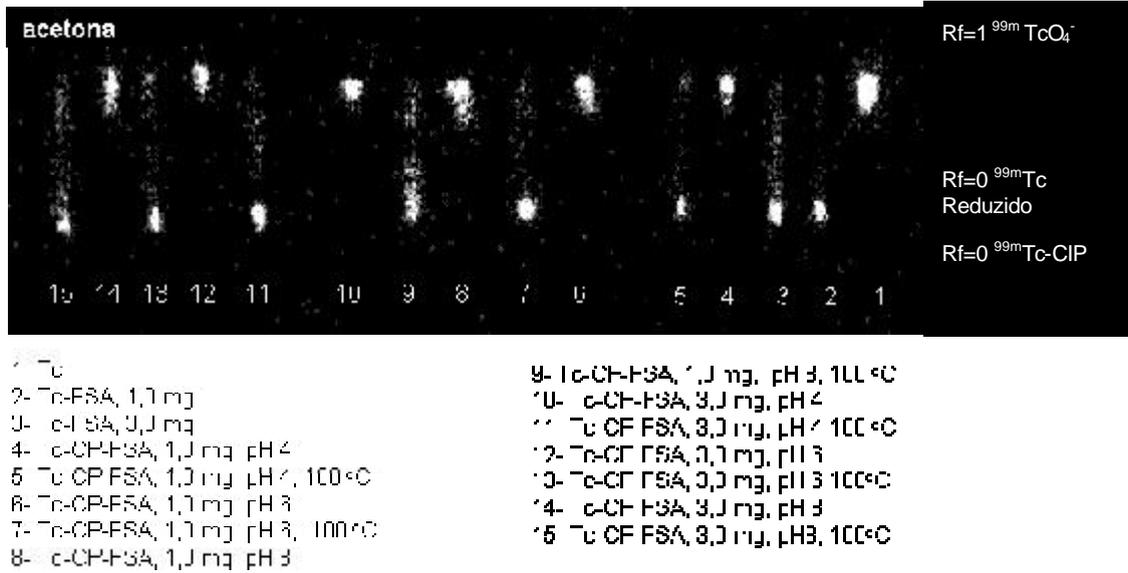


Figura 5.12: Controle radioquímico, fase móvel acetona (Imagem adquirida em equipamento E.CAM da Siemens com matriz 256X256, colimador de alta eficiência, tempo de 2 minutos e zoom de 2.0).

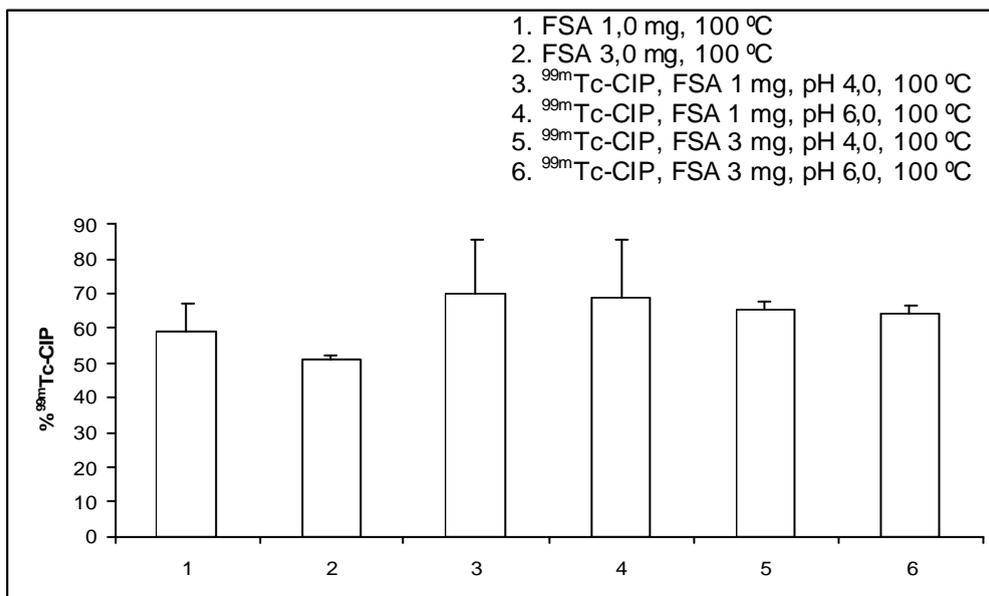


Figura 5.13: Controle de qualidade radioquímico em solvente acetona, complexação do fármaco ao <sup>99m</sup>Tc, com ácido formamidínico sulfônico (FSA a 100 °C). As colunas representam as médias e desvio padrão (n=3)

### 5.2.2 CCD: detecção por UV

Com a finalidade de avaliar o comportamento das quinolonas nos sistemas cromatográficos apresentados anteriormente, as placas foram também observadas sob luz UV (254 nm), combinando os dados para analisar o comportamento da quinolona livre e complexada com Tc e Cu.

Verificou-se que tanto a quinolona livre como a complexada apresentou  $R_f=0$  nos solventes acetona e NaCl 0,9% e  $R_f=1$  para o sistema hidróxido de amônia:etanol:H<sub>2</sub>O, conforme observado na Figura 5.14, coincidindo com os resultados da análise radioquímica.

Considerando-se que no caso da complexação com Tc apenas uma pequena fração está ligada ao metal e quase todo o CIP está livre, utilizou-se o complexo Cu-CIP para avaliar comportamento microbológico do complexo sem a presença da quinolona livre.

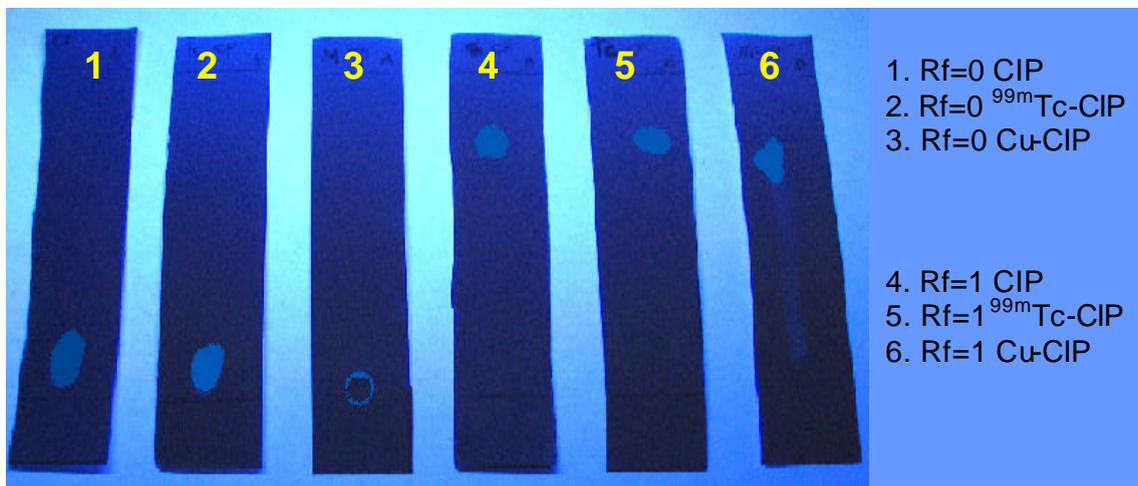


Figura 5.14: Avaliação cromatográfica do complexo CIP:Tc utilizando luz UV (254 nm).  
1: CIP livre; 2: <sup>99m</sup>Tc-CIP; 3: Cu-CIP fase móvel acetona; e 4: CIP livre.;  
5: <sup>99m</sup>Tc-CIP; 6: Cu-CIP fase móvel hidróxido de amônia:etanol:H<sub>2</sub>O.

### 5.3 Testes microbiológicos

Após a complexação da quinolona ao radioisótopo e análise das impurezas presentes na formulação analisou-se a ação antimicrobiana dos radiofármacos. A ligação do radiofármaco à bactéria foi analisada através da incubação deste em caldo contendo bactérias.

Os ensaios de controle radioquímico e ligação à bactéria foram realizados simultaneamente.

A separação da parte de interesse foi realizada de duas formas; através de centrifugação e através de filtração. Dessa forma, foi possível verificar a porção do radiofármaco que realmente se ligou a ADN-girase, verificando-se uma baixa ligação do radiofármaco à bactéria em ambos os métodos.

Estes ensaios *in vitro* são muito utilizados para radiofármacos que possuem afinidade a bactérias, como o peptídeo UBI-<sup>99m</sup>Tc, que obteve taxas de ligação na faixa de 40 a 80% a *S. aureus* e *K. pneumoniae* utilizando a centrifugação para isolar o radiofármaco ligado às bactérias, (WELLING *et al.*, 2000; FERRO-FLORES *et al.*, 2003); o M13-<sup>99m</sup>Tc, que obteve uma ligação de 30 a 80% frente a *S. aureus* e *E. coli* (RUSCKOWSKI *et al.*, 2004) e a alofasfalina-<sup>99m</sup>Tc, com taxas de ligação em torno de 5% a *S. aureus* (TSOPELAS *et al.*, 2002).

As formulações (antimicrobiano e agente redutor) em diferentes pH foram testadas frente ao *S. aureus*, verificando-se que a formulação de pH 4,0 complexada a temperatura de 100 °C obteve uma ligação a enzima bacteriana significativamente maior ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Por outro lado, as preparações de CIP em pH 5,0 e 4,0 complexadas a temperatura ambiente obtiveram uma baixa ligação à bactéria (Figura 5.15).

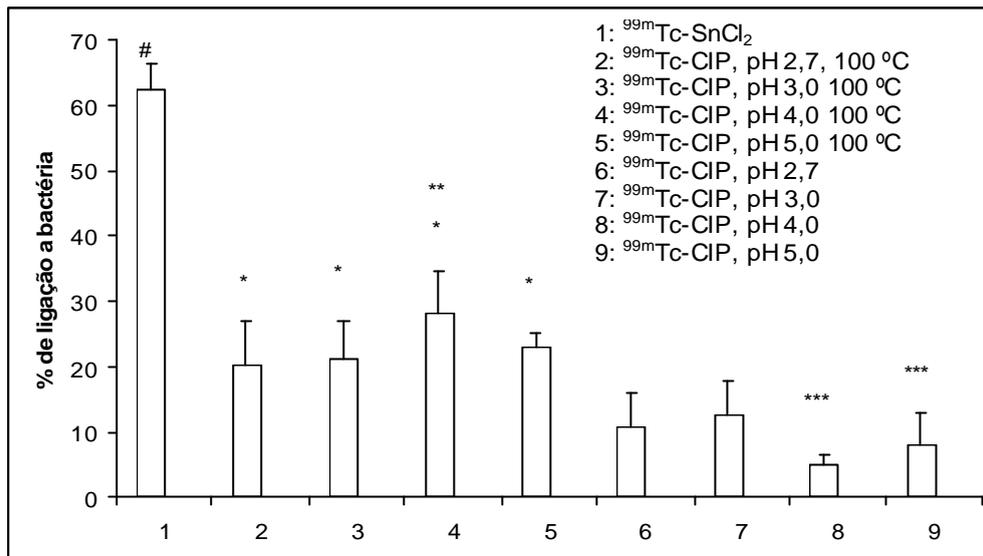


Figura 5.15: Porcentagem de ligação do  $^{99m}\text{Tc-CIP}$  a *S. aureus* monitorada em contador de poço. Resultados expressos em porcentagem da ligação do radiofármaco à bactéria através de centrifugação da suspensão de bactérias, colunas expressam a média e desvio padrão (n=3).

A análise estatística (ANOVA seguida de teste de Duncan,  $p < 0,05$ ) apresentou os seguintes resultados:

- \* as amostras submetidas a 100 °C são diferentes das preparações submetidas a temperatura ambiente;
- \*\*  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0 100 °C, é diferente de  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5,0 100 °C e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 3,0 100 °C;
- \*\*\*  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 4,0 e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 5 são diferentes de  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 3,0 e  $^{99m}\text{Tc-CIP}$ , pH 2,7.

Os resultados demonstraram que as formulações preparadas sob aquecimento, que apresentaram maior formação de colóide, foram também as que apresentaram maior taxa de ligação do radiofármaco a bactéria.

As quinolonas são antimicrobianos de amplo espectro, sendo este um dos motivos de sua seleção para o desenvolvimento de um radiofármaco para diagnóstico de infecção. Desta forma, testaram-se diferentes cepas bacterianas para verificar a ação do radiofármaco. Selecionou-se quatro diferentes cepas, duas Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e

duas cepas Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogene*.

Analisou-se também o comportamento do PEF e, conforme descrito anteriormente, o comportamento de complexação e formação de impurezas foi muito semelhante entre as duas quinolonas.

A ligação dos radiofármacos CIP- $^{99m}\text{Tc}$  e PEF- $^{99m}\text{Tc}$  às bactérias ficou na faixa de 10% e não apresentou diferença entre as cepas bacterianas e nem entre os radiofármacos marcados. O método de separação do microrganismo foi através de filtração (Figura 5.16)

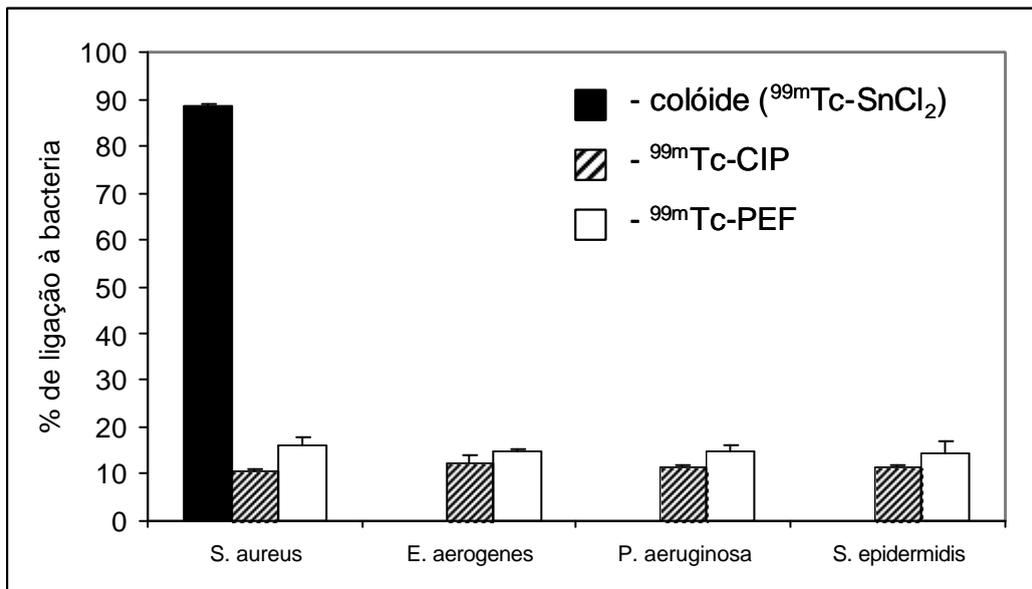


Figura 5.16: Porcentagem de ligação do  $^{99m}\text{Tc-CIP}$  e  $^{99m}\text{Tc-PEF}$  às diferentes cepas bacterianas monitorada em contador de poço. Resultados expressos em porcentagem da ligação do radiofármaco a bactéria através de retenção em filtro 0,22  $\mu\text{m}$ , colunas expressam a média e desvio padrão.

Em ambos os métodos de avaliação da ligação do radiofármaco, obteve-se resultados semelhantes. Na centrifugação a ligação ficou em torno de 16% enquanto que na filtração ficou na faixa de 10%.

Como mencionado anteriormente, o colóide é uma das impurezas que pode ser formada na complexação do radiofármaco. Analisando-se a correlação entre a porcentagem de colóide formado, obtido através do controle radioquímico, e a radiação ligada à bactéria, obteve-se forte correlação para o método de filtração ( $r^2=0,99$ ) e centrifugação ( $r^2=0,85$ ), evidenciando que a ligação à bactéria está diretamente relacionada à formação de colóide, como pode ser observado nas Figuras 5.17 e 5.18. Pode-se verificar, desta forma, que após complexação com o radioisótopo, a quinolona não foi capaz de se ligar à ADN girase das bactérias.

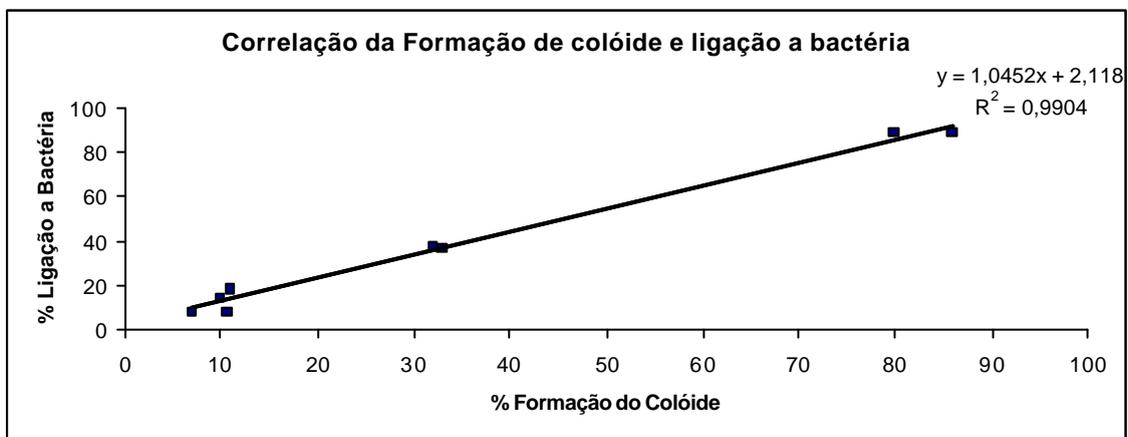


Figura 5.17: Análise da correlação da porcentagem de formação de colóide pelo sistema CCD com a ligação a cepa bacteriana (separação do radiofármaco ligado a cepa *S. aureus* através do filtro 0,22 $\mu$ m). Formulação do radiofármaco (CIP:SnCl<sub>2</sub>; 2:0,03 com pH de 4 e pefloxacino:SnCl<sub>2</sub>; 2:0,03 com pH de 4) incubado a temperatura ambiente.

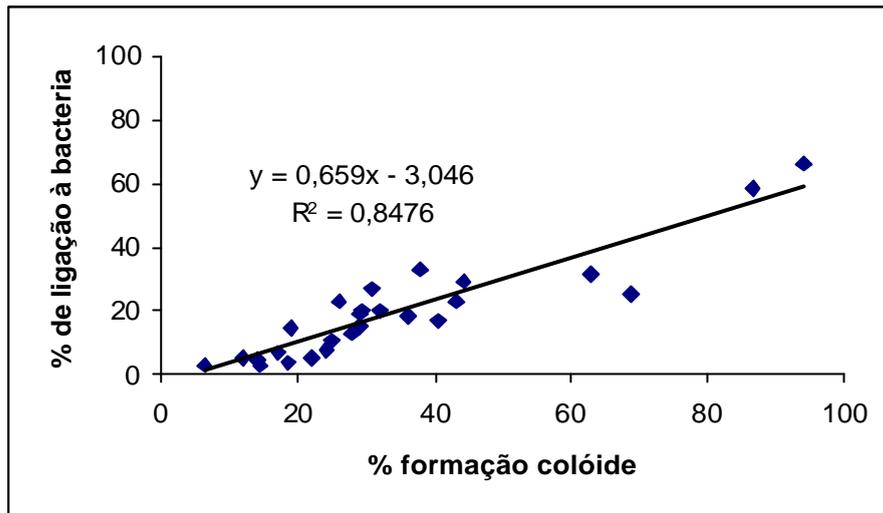


Figura 5.18: Relação entre a porcentagem de colóide formado e a ligação às bactérias (*S. aureus*) determinada por centrifugação. Formulação do radiofármaco: CIP:SnCl<sub>2</sub>; (7,5:0,1), pH 4,0, temperatura ambiente e 100 °C.

SIAENS e colaboradores (2005) analisaram a ligação dos radiofármacos CIP-<sup>99m</sup>Tc e Enrofloxacino-<sup>99m</sup>Tc a cepas vivas de *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans* e cepas mortas por aquecimento de *S. aureus*. O radiofármaco teve uma baixíssima ligação às duas cepas analisadas (3 a 6%, pelo método de centrifugação). Os radiofármacos foram analisados quanto à pureza radioquímica através de CCD (gel de sílica /acetona para Tc livre e gel de sílica/água:etanol:hidróxido de amônia, 5:2:1, para o colóide). A impureza colóide, quando presente, foi removida através de cartucho C18.

Em outro estudo, ALEXANDER (2005) verificou, também, que o <sup>99m</sup>Tc-CIP se ligou a *E. coli* tanto morta quanto viva (3,6 a 6%, centrifugação). Neste estudo, os autores verificaram apenas a ausência de Tc livre e não verificaram a quantidade de colóide formada. Além disso, a ligação aos diversos microrganismos foi muito baixa em todos os estudos *in vitro* realizados.

Em seus estudos com coelhos, SARDA e colaboradores (2002) demonstraram boa sensibilidade e baixa especificidade para diagnóstico de infecção pós-operatório, utilizando o CIP-<sup>99m</sup>Tc. DUMAREY e colaboradores

(2002) também relataram baixa especificidade para infecções osteoarticulares. Os autores também sugeriram que a afinidade pelo tecido inflamado observada em alguns trabalhos poderia ser causada pela penetração de CIP-<sup>99m</sup>Tc em células específicas, como macrófagos, neutrófilos e monócitos ou acúmulo no espaço intersticial, favorecido pelo aumento da permeabilidade capilar. Essa também é uma das possíveis justificativas para hipercaptação em locais de interesse. Ou seja, a captação do radiofármaco ou impureza nele presente (colóide) através de células do sistema inflamatório impossibilitaria a diferenciação de processos infecciosos de processos inflamatórios.

Apesar de existirem vários estudos sugerindo que a complexação de quinolonas com metais não interfere em sua ação antimicrobiana, foi possível observar que, *in vitro*, a complexação ao metal Tc impediu sua ligação às bactérias testadas, sugerindo que a radiação que permanecia ligada a estas era proveniente do colóide formado.

No estudo de WELLING e colaboradores (2001) foram investigadas as possibilidades e limitações da marcação com <sup>99m</sup>Tc de peptídeos de lactoferrina com atividade antimicrobianos e CIP e a capacidade destes em diferenciar infecções causadas por bactérias ou fungos de processos inflamatórios. Os peptídeos demonstraram ligação preferencial aos microrganismos, quando avaliados *in vitro*, e rápida e intensa acumulação *in vivo* nos sítios infecciosos, quando comparado com os sítios inflamatórios. Porém, os peptídeos se acumularam no fígado e intestino, podendo desfavorecer o diagnóstico de infecção por imagem. Outra conclusão deste estudo é que o <sup>99m</sup>Tc-CIP se acumulou com a mesma intensidade em processos inflamatórios e infecciosos.

A especificidade deste radiofármaco está sendo defendida por alguns autores através da inclusão das imagens de 24 horas após administração do mesmo. O CIP no plasma encontra-se na forma não ionizada, difundindo-se facilmente para o espaço extravascular, acarretando em rápida concentração no tecido inflamado, mas com rápida eliminação. Isto não acontece se o tecido estiver infectado, pois o radiofármaco ligado à bactéria permaneceria um maior tempo no local. Por todos estes fatores, as imagens de 1 e 4 horas podem apresentar baixa especificidade devido ao extravasamento, não diferenciando

processos inflamatórios e infecciosos, e desta forma as imagens de 24 horas confirmariam a presença de bactéria, pois as não ligadas seriam eliminadas mais rapidamente (LARIKKA et al., 2002b).

Inicialmente, o CIP-<sup>99m</sup>Tc marcado prometia ser um marcador específico e que se ligaria apenas às bactérias ativas, ou seja, somente a processos infecciosos, entretanto em muitos estudos o radiofármaco se concentra em processos inflamatórios. Esta ação pode ser devido ao colóide e/ou a inativação do radiofármaco. De Winter e colaboradores (2004), também, discute se a síntese do radiofármaco mantém seu mecanismo de ação.

Nossos estudos demonstram a alta correlação da formação de colóides e ligação à bactéria *in vitro* questionando mais uma vez a especificidade do radiofármaco testado e a importância da realização do controle radioquímico para não ocorrerem problemas na interpretação dos exames.

Alguns estudos relatam a falta de especificidade do CIP-<sup>99m</sup>Tc como: acumulação do radiofármaco em processos de necrose avascular, próteses articulares soltas, displasia fibrosa, artrite reumatóide e outras artropatologias inflamatórias, infecções de candidíase disseminadas, *Entamoeba histolytica*, abscesso de fígado, pneumonia por *Pneumocystis carini*, tumores diferenciais de pulmão e sarcoma de Ewing's (de WINTER et al., 2004); em pacientes com artrite reumatóide, doença inflamatória crônica (Hall et al., 1998)

A marcação de antimicrobianos com <sup>99m</sup>Tc é uma técnica de fácil manipulação, ou seja, de simples preparo, ao contrário da marcação de leucócitos, que necessita um maior grau de treinamento. Outra vantagem na utilização deste fármaco é a independência da quantidade total de células brancas no sangue de pacientes, fator este de extrema relevância para a qualidade das imagens com leucócitos marcados (BRITTON, et al., 1997; HALL et al., 1998; LARIKKA et al., 2002b). Entretanto, ainda se esta a procura de um fármaco ideal para esta complexação, e que mantenha sua ação após a ligação ao metal.





- ✓ Os protocolos empregados permitiram a complexação do ciprofloxacino com Cu, Ni, Mn e com  $^{99m}\text{Tc}$ ;
- ✓ Os espectros de infravermelho evidenciaram a participação da carboxila em C3 do CIP na formação dos complexos com Cu, Ni e Mn, porém não foi possível caracterizar a participação da carbonila em C4;
- ✓ Os sistemas cromatográficos utilizados permitiram a detecção das impurezas presentes na formulação: tecnécio livre e colóide;
- ✓ Através de revelação com luz UV foi possível observar que o fármaco livre se comportou da mesma maneira que o fármaco complexado nos sistemas cromatográficos utilizados;
- ✓ As condições ideais para a complexação com  $^{99m}\text{Tc}$  foram: temperatura ambiente, pH 4,0 e  $\text{SnCl}_2$  como agente redutor (2 mg CIP:0,03 mg  $\text{SnCl}_2$ );
- ✓ O FSA como agente redutor não foi adequado nas condições avaliadas, com baixa eficiência de marcação;
- ✓ O PEF foi complexado nas mesmas condições do CIP, com resultados semelhantes;
- ✓ Através dos testes microbiológicos *in vitro* com cepas Gram-positivas e Gram-negativas foi verificado que os complexos de CIP e PEF com  $^{99m}\text{Tc}$  não se ligaram às mesmas;

- ✓ Os ensaios de ligação *in vitro* demonstraram uma correlação direta entre a quantidade de colóide formado e a quantidade de radiação retida pelas bactérias testadas.

- ABRAM, U., ALBERTO, R. Technetium and Rhenium – Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.8, p.1486-1500, 2006.
- ALEXANDER, K., DROST, T., MATTOON, J., S., KOWALSKI J., L., FUNK, J., A. CRABTREE, A., C. Binding of ciprofloxacin labeled with technetium Tc 99m versus <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate to a live and killed equine isolate of *Escherichia coli*. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.69, p.272-7, 2005.
- AL-MUSTAFA, J. Magnesium, calcium and barium perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin. **Acta Chimica Slovenica**, v.49, p.457-66, 2002.
- ARAÚJO, E., B. **Radiofármacos de tecnécio-99m**. Disponível em: <http://www.las-ans.org.br/PDF/AraújoE.B.ppt>. Acesso em: 08/10/2007.
- BANERJEE, S. R., MARESCA, K. P., FRANCESCONI, L., VALLIANT, J., BABICH, J. W., ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of <sup>99m</sup>Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate desing. **Nuclear Medicine and Biology**, v.32, p.1-20, 2005.
- BARRETO, V. G., ROCA, F. I., TUBAU, F., MARTIN-COMIN, J. Marcaje de ceftizoxima com <sup>99m</sup>Tc. **Revista Espanhola Medicina Nuclear** v.19, p.479-83, 2000.
- BENITEZ, A., ROCA, M., MARTIN-COMIN, J. Labeling of antibiotics for infection diagnosis. The Quartely **Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.50, n.2, p.147-52, 2006.
- BLOK, D., FEITSMA, R. I. J., VERMEIJ, P., PAUWELS, E. J. K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.26, n.11, p.1511-9, 1999.
- BOUZA, E., MUNOZ, P. Micro-organisms responsible for osteo-articular infections. **Beilliere's Clinical Rheumatology**, v.13, n.1, p.21-35,1999.
- BRION, J., D. Quinolones in: **Traité de Chimie Thérapeutique - Medicaments antibiotiques**. Paris: Tec e Doc – Lavoisier, Vol 2, Cap., 1992.
- BRITTON, K. E., VINJAMURI, S., HALL, A. V., SOLANI, K., SIRAJ, Q. H., BORMANJI, J., DAS, S. Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the

localisation of bacterial infection. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.24, n.5, p.553-6, 1997.

BRITTON, K. E., WAREHAM, D. W., DAS, S. S., SOLANKI, K. K., AMARAL, H., BHATNAGAR, A., KATAMIHARDJA, A. H. S., MALANISMITSI, J., MOUSTAFA, H. M., SOROA, V.E; SUNDRAM, F.X., PADHY, A. S. Imaging bacterial infection with  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton). **Journal of Clinical Pathology**, v.55, p.817-23, 2002.

CALLAHAN, R. J., CHILTON, H. M., GOODWIN, D. A., HNATOWICH, D. J., PONTO, J. A., SWANSON, D. P., ROYAL, H. D. **Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for the Use of Radiopharmaceuticals**. Version 3, June. 2001. Disponível em: <http://interactive.sum.org/index.cfm?PageID=772&RPID=10> Acesso em: 05/09/2007.

CECIL, BENNETT, J.C., PLUM, F. **Cecil, Tratado de Medicina Interna**. 20 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

COLTHUP, N. B., DALY, L. H., WIBERLEY, S. E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3 ed., San Diego: Academic Press, 1990.

De WINTER, F., GEMMEL, F., VAN LAERE, K., DE WINTER, O., POFFIJN, B., DIERCKX, R. A., VAN DE WIELE, C.  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin planar and tomographic imaging for the diagnosis of infection in the postoperative spine: experience in 48 patients. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.31, n.2, p.233-9, 2004.

DELGADO, J. N., REMERS, W., R. **Wilson and Gilsvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. 10 ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998.

DREVENSEK, P., KOSMRLJ, J., GIESTER, G., SKAUGE, T., SLETTEN, E., SEPEIĆ, K., TUREL, I. X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.100, n.11, p.1755-1763, 2006.

DREVENSEK, P., ZUPANCIC, T., PIHLAR, B., JERALA, R., KOLITSCH, U., PLAPER, A., TUREL, I. Mixed-valence Cu(II)/Cu(I) complex of quinolone ciprofloxacin isolated by a hydrothermal reaction in the presence of L-histidine: comparison of biological activities of various copper-ciprofloxacin compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.432-42, 2005.

DUMAREY, N., BLOCKLET, D., APPELBOOM, T., TANT, L., SCHOUTENS, A. Infecton is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.29, n.4, p.530-5, 2002.

FERRO-FLORES, G., MURPHY, C. O., PEDRAZA-LOPEZ, M., MELENDEZ-ALOFORT, L., ZHANG, Y., RUSCKOWSKI, M., HNATOWICH, D. *In vitro* and *in vivo* assessment of  $^{99m}\text{Tc}$ -UBI specificity for bacteria. **Nuclear Medicine and Biology**, v.30, p.597-603, 2003.

- GAO, F., YANG, P., XIE, J., WANG, H. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of novel Fe(III), Co(II) and Zn(II) Complexes with Norfloxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.60, p.61-7, 1995.
- HAGAN, P. L., TAYLOR, A. Jr., CHAUNCEY, D.M., SCHELBERT, H. Comparison of  $^{131}\text{I}$  and  $^{67}\text{Ga}$ -citrate as abscess localizing agents. **Nuklearmedizin**, v.16, n.2, p.76-8, 1977.
- HALL, A. V., SOLANKI, K. K., VINJAMURI, S., BRITTON, K. E., DAS, S. S. Evaluation of the efficacy of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Infecton, a novel agent for detecting sites of infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.51, n.3, p.215-9, 1998.
- HANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- HARDMAN, J.D. **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.
- HARRISON. **Princípios de Medicina Interna**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- HÖFFKEN, G., BORNER, K., GLATZEL, P. D., KOEPPE, P., LODE, H. Reduced Enteral Absorption of Ciprofloxacin in the presence of antacids. **European journal of clinical microbiology**, v.4, p.345, 1985.
- HUNG, J. C., PONTO, J. A., HAMMES, R. J. Radiopharmaceutical-Related Pitfalls and Artifacts. **Seminars in Nuclear Medicine**, v.XXVI, n.4, p.208-25, 1996.
- JAWETZ, E., METRICK, J. L., ADELBERG, E. A. **Microbiologia Medica**. 20 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- JIMÉNEZ-GARRIDO, N., PERELLÓ, L., ORTIZ, R., ALZUET, G., GONZÁLEZ-ALVAREZ, M., CANTÓN, E., LIU-GONZÁLEZ, M., GARCÍA-GRANDA, S., PÉREZ-PRIEDE, M. Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.677-89, 2005.
- KLEISNER, I; KOMAREK, P; DOMARKOVA, I; KONOPKOVA. M. A new technique of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin kit preparation. **Nuklearmedizin**, v.41, p.224-9, 2002.
- LARIKKA, M. J., AHONEN, A. K., NIENELA, O., JUNILA, J. A., HANALAINEN, M. M., BRITTON, K., SYRJALA, H. P. Comparison of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ciprofloxacin,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  white blood cell and three-phase bone imaging in the diagnosis accuracy with extended imaging time. **Nuclear Medicine Communications**, v.23, p.655-61, 2002a.
- LARIKKA, M., J., AHONEN, A., K., NIENELA, O., PURONTO, O., JUNILA, J., A., HANALAINEN, M., M., BRITTON, K., SYRJALA, H., P.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ciprofloxacin

(Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. **Nuclear Medicine Communications**, v.23, p.167-70, 2002b.

LÓPEZ-GRESA, M., P., ORTIZ, R., PERELLÓ, L., LATORRE, J., LIU-GONZÁLES, M., GARCÍA-GRANDA, S., PÉREZ-PRIEDE, M. Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin) Spectroscopic and X-ray structural characterization antibacterial studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.92, p.65-74, 2002.

LUPETTI, A., WELLING, M., MAZZI, U., NIBBERING, P. H., PAUWELS, E. K.J. Technetium-99m labeled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infection. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.29, n.5, p.674-9, 2002.

MALAMITSI, J., GIAMARELLOU, H., KANELLAKOPOULOU K., DOUNIS, E., GRECKA, E., CHRISTAKOPOULOS, J., KORATZANIS, G., ANTONIADOU, A., PANOUTSOPOULOS, G., BATSAKIS, C., PROUKAKIS, C. Infecton: a  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin radiopharmaceutical for the of bone infection. **Clinical Microbiology Infect**, v.9, n.2, p.101-9, 2003.

MARQUES, N., L., F., OKAMOTO, M., R., Y., BUCHPIGUE, C., A. Alguns Aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio 99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v.34, n.4, p. 233-9, 2001.

OH, S., J., RYU, J-S., SHIN, J. W., YOON, E., J., HA, H-J; CHEON, J., H., LEE, H., K. Synthesis of  $^{99m}\text{Tc}$  -ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. **Applied Radiation and Isotopes**, v.57, p.193–200, 2002.

OWUNWANNE, A., PATEL, M., SADEK, S. **The Handbook of Radiopharmaceuticals**. 1 ed., London: Clays, 1995.

OZKER, K; COLLIER, B., D; HELLMAN, R., S., ISITMAN, A., T., KRASNOW, A., Z., UZUM, F., STEFFEL, F., S. A high-efficiency, rapid e multi-dose procedure for white blood labelling with  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO. **Nuclear Medicine Communications**, v.17, p.342-5, 1996.

PALESTRO, C., J. Nuclear Medicine, the Painful Prosthetic Joint, and Orthopedic Infecton. **Journal of Nuclear Medicine**, v.44, n.6, p.927-9, 2003

PARFITT, K. (Ed.). **Martindale: The complete drug reference**. 32 ed., London: Pharmaceutical Press, 1999.

PARKER, J., A., DAUBE-ITHERSPOON, M., E., GRAHAM, L., S., ROYAL, H., D., TODD-POKROPEK, A., E., YESTE, M., V. **Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for General Imaging**, 2004. Disponível em: <http://interactive.sum.org/index.cfm?PageID=772&RPID=10> Acesso em: 05/09/2007.

PELOSI, E., BAIOTTO, C., PENNONE, M., MIGLIARETTI, G., VARETTO, T., MAIELLO, A., BELLO, M., BISI, G.  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-Leukocyt scintigraphy in patients with symptomatic total hip ou knee arthroplasty: Improved diagnosti

accuracy by means of semiquantitative evaluation. **The Journal Nuclear Medicine**, v.45, n.3, p.438-44, 2004.

PSOMAS, G., TARUSHI, A., EFTHIMIADOU, E., K., SANAKIS, Y., RAPTOPOULOU, C., P., KATSAROS, N. Syntesis, structure and biological activity of copper (II) complexes com oxolic. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.100, n.11, p.1764-73, 2006.

RAMSAY, S. C., MAGGS, J., A., KETHEESAN, N., NORTON, R., LABROOY, J. Relative uptake of technetium 99m stannous colloid by neutrophils and monocytes is altered by gram-negative infection. **Nuclear Medicine and Biology**, v.32, p. 101-7, 2005.

RITCHEL, W.A. & KEARNS, G.L. **Handbook of Basic Pharmacokinetics**. 5.ed. Washington: APA, 1999.

RUSCKOWSKI, M., GUPTA, S., LIU, G., DOU, S., HNATOWICH, J., D. Investigations of a 99mTc Bacteriophage as a Potencial Infection-Specific Imaging Agent. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.45, p.1201-8, 2004.

SADEEK, S., A. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure**, v.753, p.1-12, 2005.

SAHA, G., B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5 ed. New York: Springer, 2004.

SARDA, L., CREMIEUX, A. C., LEBELLE, Y., MEULEMANS, A., LEBTAHI, R., HAYEM, G., GENIN, R., DELAHAYE, N., HUTEN, D., LE, GULUDEC, D. Inability of <sup>99m</sup>Tc ciprofloxacin Scintigraphy to Discriminate Between Septic and Sterile Ostioarticular Diseases. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.44, n.6, p.920-6, 2003.

SARDA, L., SALEH-MGHIR, A., PEKER, C., MEULEMANS, A., CREMIEUX, A., C., LE, GULUDEC, D. Evaluation of scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.43, p.239-45, 2002.

SIAENS, R., H., RENNEN, H., J., BOERMAN, O., C., DIERCKX, R., SLEGGERS, G. Synthesis and comparison of <sup>99m</sup>Tc-Enrofloxacin and <sup>99m</sup>Tc-Ciprofoxacin. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.45, n.12, p.2088-94, 2004.

SIGNORE, A., ANNOVAZZI, A., CHIANELLI, M., CORSETTI, F., VAN DER WIELE, C., WATHERHOUSE, R., N., SCOPINARO, F. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.28, n.10, p.1555-65, 2001.

SIMONSEN, L., BUHL, A., OERSENES, T., DUUS, B. White blood cell scintigraphy for differentiation of infection and aseptic loosening. **Acta Orthopaedica**, v.78, n.5, p.640-7, 2007.

- SONMEZOGLU, K., SONMEZOGLU, M., HALAC, M., AKGUN, I., TURKMEN, C., ONSEL, C., KANMAZ, B., SOLANKI, K., BRITON, K., E., USLU, I. Usefulness of  $^{99m}\text{Tc}$ -Ciprofloxacin (Infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: comparative study with  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO leukocyte scintigraphy. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.42, n.4, p.567-74, 2001.
- SOUZA M. V. N., ALMEIDA M. V., SILVA A.; COURT M. R; C. Ciprofloxacina, uma importante fluoroquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira Farmácia**, v.85, n.1, p. 13-18, 2004.
- TAUHATA, T., SALATI, I., P. A., DI PRINZIO, R., DI PRINZIO, A. R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 5 ed. Rio de Janeiro – IRD/CNEN, 2003
- THRALL, J., H., ZIESSMAN, H., A. **Nuclear Medicine “The requisites”** 2 ed. St. Louis: Mosby, 2001.
- TSOPELAS, C., PENGLIS, S., RUSZKIEWIEZ, A., BARTHOLOMEUSZ, F., D., L.  $^{99m}\text{Tc}$ -Alafosfalin: an antibiotic peptide infection imaging agent. **Nuclear Medicine and Biology**, v.30, p.169-75, 2003.
- TUREL, I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v.232, p.27-47, 2002.
- VAN DER LAKEN, C., J., BOERMAN, O., C., OYEN, W., J., G., VAN DER VEM, M., T., P., VAN DER MEER, J., W., M., CORSTENS, F., H., M. Scintigraphic detection of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.25, p.535-46, 1998.
- VINJAMURI, S., HALL, A., V., SOLANKI, K., K., BOMANJI, J., SIRAJ, Q., O'SHAUGHNESSY, E., DAS, S., S., BRITTON, K., E. Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$  Infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial of bacterial infection. **The Lancet**, v.347, p.233-5, 1996.
- WELLING, M., M., LUPETTI, A., BALTER, H. S., LANZZERI, S., SOUTO, B., REY, A., M., SAVIO, E., O., PAULUSMA-ANNEMA, A., PAUWELS, E., K., J., NIBBERRING, P., H.  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* Infections. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.42, n.5, p.788-94, 2001.
- WELLING, M., M., PAULUSMA-ANNEMA, A., BALTER, H., S., PAUWELS, E., K., J., NIBBERRING, P., H. Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.27, n.3, p.293-301, 2000.
- WU, G., WANG, G., XUCHUN, F., ZHU, L. Synthesis, Crystal Structure, Stacking effect and antibacterial studies of a novel quaternary copper (II) complex with quinolone. **Molecules**, v.8, p. 287-96, 2003.
- YAPAR, Z., KIBAR, M., YAPAR, A., F., TOGRUL, E., KAVASELCUK, U., SARPEL, Y. The efficacy of technetium-99m ciprofloxacin (Infecton) imaging in

suspected orthopaedic infection: a comparison with sequential bone/gallium imaging. **European Journal Nuclear Medicine**, v.28, n.7, p.822-30, 2001.

ZOLLE, I. **Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine**. Berlin: Springer, 2007

ZUPANCIC, M., TUREL, I., BUKOVEC, P., WHITE, A. J. P., WILLIAMS, D. J. Synthesis and Characterization of two novel zinc(II) complexes with ciprofloxacin. Crystal Structure of  $[C_{17}H_{19}N_3O_3F]_2 \cdot [ZnCl_4] \cdot 2 H_2O$ . **Croatica Chemica Acta**, v.74, n.1, p. 61-74, 2001.