

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

*Validação do método de doseamento para controle de qualidade do composto
[¹³C] PiB*

Juliane Freitas Bica

Porto Alegre, Julho de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

*Validação do método de doseamento para controle de qualidade do composto
[¹³C] PiB*

Juliane Freitas Bica

Profa. Dr. Aline Rigon Zimmer

Orientadora

Farmacêutico Marcos Vinícius Fortes Alba

Coorientador

Porto Alegre, Julho de 2017.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho apresenta-se sob forma de artigo, baseado nas normas da revista “Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals”, apresentadas em anexo.

Validação do método de doseamento para controle de qualidade do composto [¹⁴C] PiB

¹Juliane Freitas Bica, ²Marcos Vinícius Fortes Alba, ¹Aline Rigon Zimmer*

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Instituto do Cérebro (Inscer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência:

Juliane Freitas Bica

Estudante de Farmácia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

Telefone: +55 51-993000058

Email: ju_bicca@hotmail.com

Marcos Vinícius Fortes Alba

Instituto do Cérebro (Inscer),

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),

Avenida Ipiranga, 6690, prédio 63, 90619-900,

Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51-33205961

Email: marcos.alba@pucrs.br

Aline Rigon Zimmer*

Laboratório de Pesquisa de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga, 2752, 7º andar, sala 703.2, 90610-000,

Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51-996494770

Email: aline.zimmer@ufrgs.br

RESUMO

O número de pessoas com Doença de Alzheimer (DA) vem crescendo exponencialmente, podendo chegar a 74 milhões de casos no mundo em 2030. A patologia desta doença é caracterizada principalmente pelo acúmulo de depósitos de placas beta-amilóide no cérebro, se tornando uma ferramenta importante para indicação do diagnóstico neuropatológico da DA. Com isso, gerou-se grande interesse na descoberta de radiofármaco marcado com átomo emissor de pósitrons, capaz de se ligar a essas placas. O Composto B de *Pittsburgh* ($[^{11}\text{C}]\text{PiB}$), foi o primeiro radiotraçador desenvolvido, com ligação específica às placas beta-amilóide no tecido cerebral, permitindo a visualização e quantificação dessas estruturas através da técnica PET (tomografia por emissão de pósitrons) de forma não invasiva. Entretanto, este radiofármaco não possui monografia oficial, devendo seguir guias gerais para realização do controle de qualidade desta molécula. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método por CLAE para quantificação do PiB, para ser utilizado no controle de qualidade. O método proposto para quantificação do PiB mostrou-se específico, linear na faixa de concentração entre 1,0 e 4,2 $\mu\text{g/mL}$, sensível, preciso, exato e robusto.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer, placas beta-amilóides, Composto B de Pittsburgh, PET, CLAE, validação.

ABSTRACT

The number of people with Alzheimer's disease (AD) has been growing exponentially, possibly reaching the mark of 74 million cases in the world in 2030. The pathology of this disease is mainly characterized by the accumulation of deposits of beta-amyloid plaques in the brain, becoming an important tool to indicate the neuropathological diagnosis of AD. With this, great interest was generated in the discovery of radiopharmaceutical labeled with positron emission atom capable of binding to these plates. Pittsburgh Compound B ($[^{11}\text{C}]$ PiB), a molecule labeled with a radioactive carbon atom, was the first radiotracer developed with specific binding to beta-amyloid plaques in the brain tissue and can be visualized and quantified by PET (positrons emission tomography) noninvasively. However, this radiopharmaceutical has no official monograph and should follow general guides to carry out the quality control of this molecule. Thus, the aim of this study was to develop and validate a HPLC method for quantification of PiB, through a fast and efficient technique to be used in quality control. The proposed method for quantification of PiB showed to be specific, linear in the concentration range between 1.0 and 4.2 $\mu\text{g/mL}$, sensitive, precise, accurate and robust.

Keywords: Alzheimer's disease, beta-amyloid plaques, Pittsburgh Compound B, PET, HPLC, validation.

INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é o tipo de patologia mais frequente entre as demências ^(1,2), caracterizada principalmente pelo depósito e acúmulo de placas beta-amilóide e proteínas tau no cérebro ⁽³⁾. O depósito dessas proteínas leva a ativação das funções da microglia, desencadeando uma cascata neurodegenerativa associada à toxicidade das placas, que levam a diminuição sináptica e neuronal ⁽⁴⁾, danos cognitivos e funcionais, além de distúrbios comportamentais ⁽²⁾. No entanto, quando estes sintomas clínicos se manifestam, o sistema cognitivo já se apresenta comprometido ⁽⁵⁾. Somente a partir da análise histopatológica do tecido cerebral, após a morte do paciente, é possível fazer um diagnóstico definitivo da doença ^(6,7). Porém, com o desenvolvimento de biomarcadores baseados na fisiopatologia da Doença de Alzheimer, é possível fazer um provável diagnóstico através da detecção por imagem cerebral, permitindo a identificação de regiões que captam compostos radiomarcados ⁽⁸⁾. Assim, a utilização de radiofármacos com alta afinidade específica por esses depósitos de proteínas em aglomerados ⁽⁹⁾, impulsionou o interesse pelo diagnóstico precoce e o descobrimento de novos medicamentos capazes de retardar o processo fisiológico desta doença ⁽¹⁰⁾.

O [N-Metil-11C]2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol ([¹¹C]PiB), substância análoga da Tioflavina T, marcada com um átomo de carbono radioativo (Figura 1), mostrou ter forte relação entre a captação *in vivo* e a presença de placas beta-amilóide no tecido cerebral de pessoas com a Doença de Alzheimer ⁽¹¹⁾. Esse radiotraçador liga-se com alta especificidade nas placas beta-amilóide ⁽¹²⁾ e através da técnica PET (tomografia por emissão de pósitrons) é possível a visualização da imagem, assim como a quantificação destas placas, permitindo um mapeamento do processo biológico cerebral de forma não invasiva ⁽¹¹⁾. Isso a torna um possível marcador no diagnóstico precoce e na diferenciação de pacientes com a Doença de Alzheimer ou Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) ^(13,14).

No entanto, este radiofármaco atualmente é restrito apenas para utilização em centros de pesquisas, pois além de seu tempo de meia vida ser ultra curto (20,4 minutos), não possui registro de medicamento perante nenhum órgão nacional (ANVISA) ou internacional (FDA), o que impossibilita seu uso ambulatorial ⁽¹⁵⁾. Ainda

muitos estudos envolvem o descobrimento de métodos de síntese e técnicas de controle de qualidade. Esses dois processos estão diretamente atrelados visto que, os reagentes utilizados para sintetizar esse composto, podem se tornar impurezas do produto, e assim, interferir nas análises, afetando a segurança e efetividade do medicamento. As duas principais rotas sintéticas para obtenção do [^{11}C]PiB utilizam como precursores o 6-OH-BTA-0 (2-(4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol) ou o 6-MeO-BTA-0 (2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol), na presença de diferentes agentes alquilantes radiomarcados como o [^{11}C]MeOTf (Triflato de Metila) ou o [^{11}C]MeI (Iodeto de Metila). O [^{11}C]MeOTf, o qual se liga ao precursor 6-OH-BTA-0, é o mais utilizado por ter mostrado ser mais reativo, menos volátil, podendo realizar a reação em temperatura ambiente, com menor tempo de reação, devido a ausência da etapa de retirada de grupos protetores, e maior rendimento (Figura 1). ^(16,17,18,19). Assim, é importante desenvolver metodologias capazes de identificar e quantificar a presença de contaminantes no produto final.

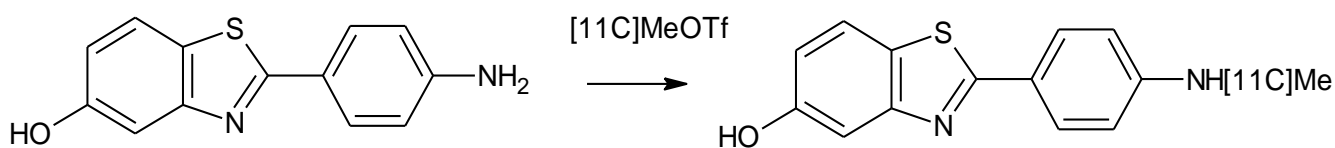


Figura 1 – Obtenção do [^{11}C]PiB a partir do precursor 6-OH-BTA-0.

Na ausência de monografia oficial brasileira específica desse radiofármaco para a realização do controle de qualidade, as empresas produtoras podem adotar as técnicas de guias oficiais internacionais, tais como: USP (Farmacopéia Americana), OMS (Organização Mundial da Saúde), Farmacopeia Européia, entre outras ⁽²⁰⁾. No entanto, nenhuma destas referências possui monografia para o [^{11}C]PiB, necessitando estabelecer e validar protocolos específicos para o controle de qualidade do mesmo, buscando um método rápido em decorrência do tempo de meia vida ultra curto (20,4 minutos). Para isso, existem diretrizes gerais sobre o controle de qualidade de preparações radiofarmacêuticas em compêndios oficiais (Farmacopeia Americana (USP), Farmacopeia Européia) que determinam todos os itens necessários a serem avaliados, tais como o teste de aparência, pH, solventes

residuais, pureza microbiológica, identidade e pureza química, identidade e pureza radioquímica, identidade e pureza radionuclídica e atividade específica⁽²¹⁾.

Com isso, o objetivo do trabalho foi desenvolver e validar um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do composto B de Pittsburgh (PiB), na presença de impurezas, através de uma técnica rápida e eficiente, para ser utilizado no controle de qualidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Processo de produção de [¹¹C]PiB

A amostra produzida no Instituto do Cérebro da PUCRS (Inscer) foi obtida através de acelerador de partículas (ciclotron), onde o ¹¹C é produzido a partir da reação nuclear ¹⁴N(p, α)¹¹C, sendo transferido na forma de ¹¹C-CO₂ através de linha de transferência. No módulo de síntese Tracerlab FX_{C-Pro} (GE®) o [¹¹C]CO₂ é convertido em [¹¹C]MeOTf, que é transferido para o frasco reator contendo o precursor 6-OH-BTA-0 para a reação sob condições a 80 °C durante 1 minuto. A purificação é realizada através da injeção em sistema CLAE com coluna semi-preparativa. Em seguida, o produto passa por cartucho de extração de fase sólida (C18) para remoção de solvente orgânico e então, é diluído com etanol e logo após, o eluato é diluído com solução salina 0,9% estéril. O produto acabado é transferido para o equipamento de envase, onde é esterilizado através de um filtro de 0,22 μm no momento do envase.

Reagentes e Solventes

Para síntese do Composto B de Pittsburgh ([¹¹C]PiB) e realização das análises cromatográficas utilizou-se o precursor 6-OH-BTA-0 (pureza > 95 %), Padrão de referência não radioativo do PiB (pureza > 95 %), ambos obtidos da ABX® (*ABX- Advance Biochemical Compounds*), solução salina 0,9% Hypofarma estéril, etanol Merck®, acetonitrila grau CLAE Merck® e água ultrapura obtida a partir de sistema de purificação de água MilliQ (Millipore®).

Equipamento e Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas de quantificação do PiB foram efetuadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu - modelo Prominence), equipado com os detectores PDA (modelo SPD-M20A) e radioativo (Flow-RAM), com bomba LC-20 ADSP, amostrador automático modelo SIL-20AHT, forno de colunas modelo CTO-20A, e sistema controlador modelo CB-20A. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Agilent Pursuit, 300 x 3,9 mm; 10 µm). A fase móvel para análise isocrática foi constituída por acetonitrila e água (30:70 v/v), com vazão de 3,0 mL/min, volume de injeção de 30 µL, e a detecção foi realizada por UV no comprimento de onda 350nm, com tempo total de corrida de 13 min.

Parâmetros para Validação do Método Analítico

A metodologia analítica foi validada de acordo com a RE 899 de 29 de maio de 2003 – ANVISA (Brasil, 2003) ⁽²²⁾, baseada no método analítico de categoria I, e na Guia da AOAC – Apêndice F (2016) ⁽²³⁾.

Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de determinar o analito inequivocamente, na presença de outros componentes, que podem ser impurezas, produtos de degradação ou excipientes ⁽²²⁾. Análise realizada a partir de, primeiramente, injeção do placebo (solução salina + etanol a 10%) contaminado com o precursor 6-OH-BTA-0 (100 µg/mL), e, após, da injeção da solução padrão de PIB (2,0 µg/mL) preparada em placebo e também contaminada com o precursor 6-OH-BTA-0.

Linearidade e Intervalo

A linearidade representa a capacidade de obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado ⁽²²⁾. Para sua determinação construiu-se uma curva de calibração de seis pontos de concentração para o padrão não radioativo de PiB (1,0; 1,5; 2,1; 2,6;

3,1 e 4,2 µg/mL) analisados em triplicata para obtenção da equação da reta da curva obtida, e definição do intervalo linear.

Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida de forma precisa e exata, utilizando um determinado procedimento experimental ⁽²²⁾. O ponto de menor concentração testado na análise da exatidão foi utilizado e analisado para determinação do limite de quantificação.

Precisão

A precisão do método foi avaliada em nível de repetibilidade e de precisão intermediária, representando a proximidade dos resultados de uma amostra em um curto período de tempo e em dias separados, sendo este com variação de analista ou equipamento utilizado para três níveis de concentração ⁽²²⁾. A repetibilidade foi determinada a partir da análise em triplicata de concentrações de nível baixo, médio e alto (1,0; 2,1; e 4,2 µg/mL) preparadas pelo mesmo analista, no mesmo dia. A precisão intermediária foi determinada a partir da análise destes mesmos pontos, em triplicata, por analista diferente, e em dias diferentes.

Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro, partindo de uma substância de pureza conhecida ⁽²²⁾. Assim, foram analisadas amostras de concentração conhecida de padrão não radioativo de PiB em placebo (etanol 10% em solução salina 0,9%). Utilizaram-se concentrações alta, média e baixa (4,2; 2,1; e 1,0 µg/mL, respectivamente). Injetou-se em duplicata, previamente à injeção dos pontos analisados, uma solução padrão de PIB recentemente preparada em fase móvel, com concentração de 2,1 µg/mL (solução de adequabilidade do sistema) para realizar o doseamento através de calibração de ponto único. A análise da exatidão se deu desta maneira por simular adequadamente a situação de rotina do controle de qualidade.

Robustez

É a medida da capacidade que um método analítico tem em resistir a pequenas variações de parâmetros analíticos ⁽²²⁾. Injetou-se o placebo contaminado com padrão não radioativo de PiB para observar se o método permanece adequado mediante alterações, como: alteração do fluxo para 2,8 mL/min, ou de fase móvel alterada (acetonitrila 32% e água MiliQ 68%), realizando-se as leituras em triplicata, com concentração de 2,1 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Especificidade

A especificidade do método foi confirmada através da comparação entre os resultados obtidos das análises do placebo contaminado com 6-OH-BTA-0 e com padrão não radioativo de PiB e 6-OH-BTA-0 para demonstrar que o método é capaz de separar e detectar isoladamente o analito de interesse (o PiB), sem que haja coeluição nem interferência da(s) principal(ais) impureza(s).

Pode-se observar a partir da análise dos cromatogramas obtidos com o padrão de PiB, o placebo contaminado com precursor 6-OH-BTA-0 e com o padrão de PIB contaminado com o precursor (Figura 2A-C), que não há interferentes no mesmo tempo de retenção do composto de interesse. O PiB apresentou tempo médio de retenção de aproximadamente 8,54 minutos, pureza de pico maior que 0,99, resolução de pico de aproximadamente 2,95 e concentração observada de 2,2 µg/mL, o que gerou uma recuperação de 110%. Enquanto o precursor utilizado como contaminante apresentou tempo de retenção médio de 3,22 minutos, confirmando a não interferência da análise na presença dos dois compostos.

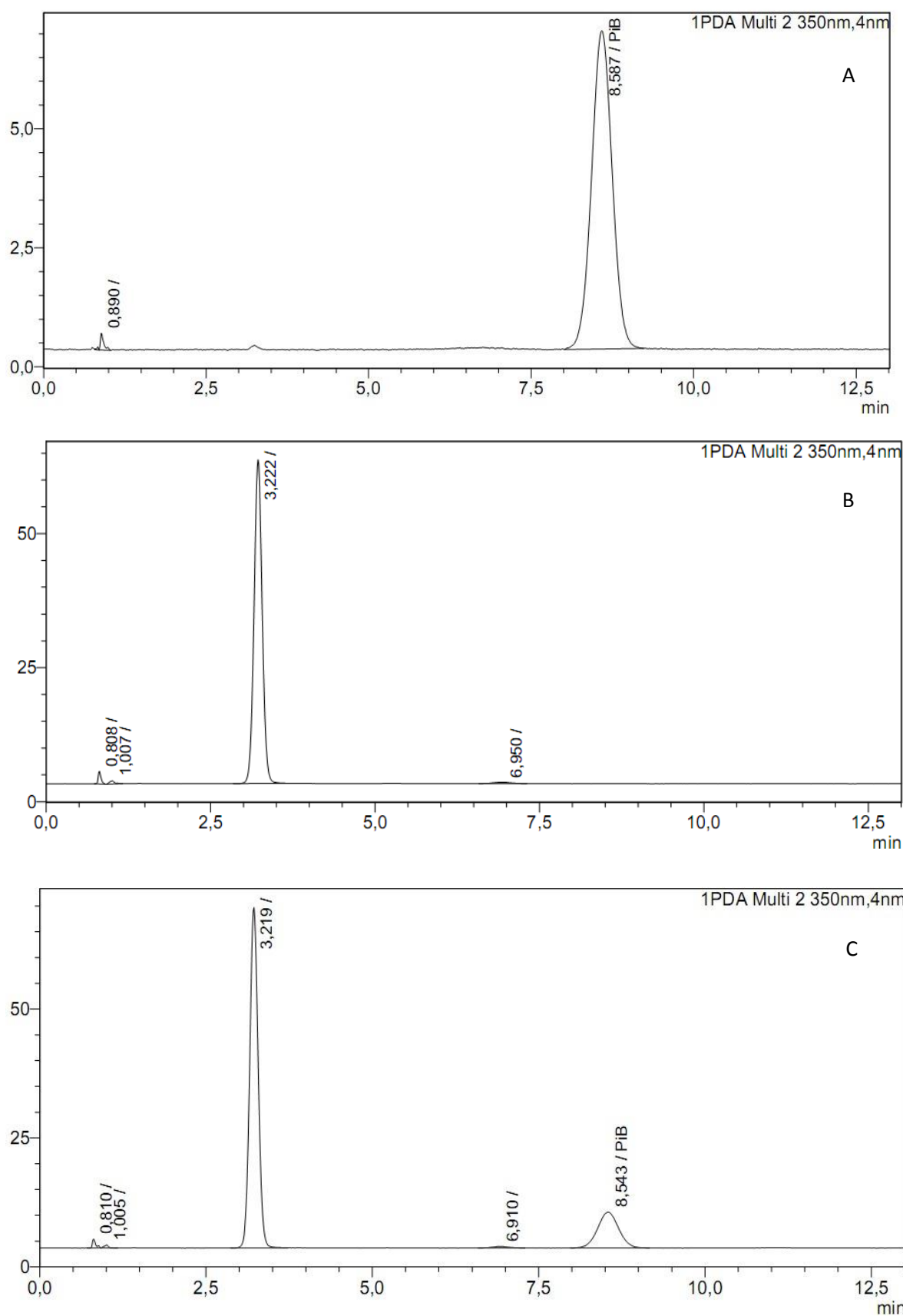


Figura 2. Cromatogramas obtidos por *CLAE* com método utilizando fase móvel constituída de acetonitrila e água (30:70 v/v) em um fluxo de 3,0 mL/min, detecção

UV 350 nm e volume de injeção de 30 µL. A) Padrão PIB com concentração 2,1 µg/mL B) Cromatograma do placebo contaminado com 6-OH-BTA-0; C) Cromatograma do placebo contaminado com PiB e 6-OH-BTA-0.

Linearidade e Intervalo

A linearidade da curva analítica foi observada na faixa de 1,0 a 4,2 µg/mL, intervalo no qual pode-se assegurar que à uma relação de proporcionalidade entre as variáveis, foi obtida a partir da análise de regressão linear, e a equação da reta foi determinada como: $y = 73296x + 2642,8$; com um coeficiente de correlação de r igual a 0,9997, sendo representada na Figura 3.

Segundo a ANVISA ⁽²²⁾, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Portanto, o valor de r obtido na regressão linear da curva de análise do PiB pelo método desenvolvido obedece aos limites estabelecidos.

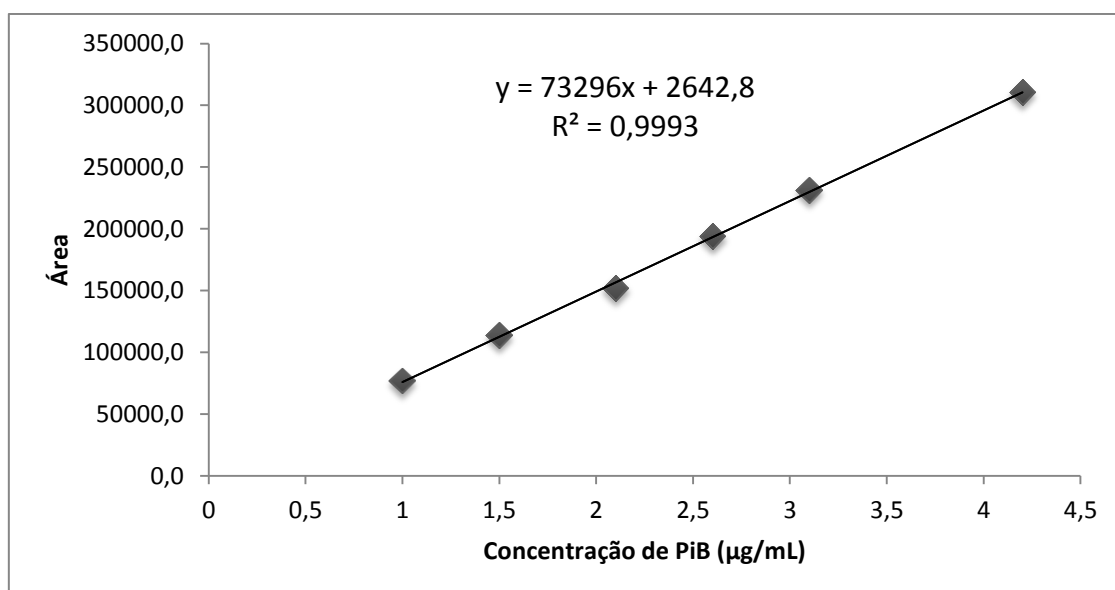


Figura 3. Gráfico de regressão linear da média das três curvas padrão no intervalo de concentração de 1,0 a 4,2 µg/mL, determinada por CLAE (n=3), obtido através de solução padrão de PiB não radioativo.

Tabela 1. Dados da curva analítica da linearidade obtido através da média das áreas de solução padrão de PiB.

Linearidade						
Concentração (µg/mL)	1,0	1,5	2,1	2,6	3,1	4,2
Média das áreas (mAU*min)	76988,3	113554,3	152317,3	193964,3	231453,3	310376,7
DP	1138,4	432,7	685,9	784,4	578,2	870,7
CV %	1,5	0,4	0,5	0,4	0,2	0,3

Pela faixa de coeficiente de variação de 0,2 a 1,5% pode-se confirmar que além da reta ter uma tendência linear, os resultados mostraram-se próximos nas diferentes concentrações.

Precisão

Os resultados dos ensaios para repetibilidade e precisão intermediária podem ser observados na Tabela 2. A RE 899/2003 determina que os valores de Coeficiente de Variação (CV %) devem ser inferiores a 5% ⁽²²⁾. Ainda a Guia da AOAC (2016) preconiza que os limites para os CV % do analito podem variar conforme a faixa de concentração do mesmo. Desta forma, são permitidos CV % de até 11 e 7,3 % para amostras de concentração de 10 e 1 ppm (µg/g, equivalente a faixa de 10,0 e 1,0 µg/mL), respectivamente ⁽²³⁾. O método mostrou CV % satisfatórios, variando de 0,2 a 2,3 %, demonstrando estarem dentro do preconizado.

Tabela 2. Resultados do ensaio de repetibilidade e precisão intermediária utilizando a média das áreas obtidas em triplicata.

Precisão						
	Dia	Concentração (µg/mL)	Intra-dia			Inter-dia CV%
			Média das áreas	DP	CV%	
Analista 1	1	1,0	76988,3	1138,39	1,5	1,4 2,3 2,3
		2,1	152317,3	685,9	0,5	
		4,2	310376,7	870,75	0,3	
Analista 2	2	1,0	75805,333	788,947	1,0	
		2,1	146202	1161,702	0,8	
		4,2	297473	566,543	0,2	

Exatidão

Os resultados referentes à avaliação da exatidão do método proposto para análise do PiB estão apresentados na Tabela 3. Foram obtidos valores de recuperação adequados, pois o *Guia da AOAC* (2016) preconiza que a recuperação do analito seja entre 80 a 110% para amostras de concentração entre 10 e 1 ppm (µg/g) (equivalente a faixa de 10,0 a 1,0 µg/mL) ⁽²³⁾.

Tabela 3. Resultados obtidos a partir da avaliação da exatidão.

Pontos	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração observada (µg/mL)	CV (%)	Recuperação %
Alto	4,1	4,2	3,0	102
Médio	2,1	2,1	0,5	100
Baixo	1,0	1,1	0,3	110

Limite de Quantificação (LQ)

Foi utilizado o menor nível de concentração do intervalo da curva analítica para determinar o limite de quantificação. Para isso, através do ensaio de exatidão obteve-se uma concentração de 1,1 µg/mL, que gerou uma recuperação de 110%.

Nessa avaliação o coeficiente de variação mostrou-se adequado ($\leq 5\%$) ⁽²²⁾, assim como a recuperação do analito (80-110%) ⁽²³⁾, assegurando ser um método sensível.

Robustez

A partir dos resultados observados na Tabela 4, mediante as alterações estabelecidas, pode-se verificar que com a mudança do fluxo para 2,8 mL/min ocorreram variações significativas nos dados de recuperação ($\geq 110\%$) para este método analítico. Já com a mudança de constituição da fase móvel da cromatografia, todos os parâmetros analisados permaneceram dentro das especificações, mostrando-se manter exato e preciso. O valor de recuperação e resolução do pico estão de acordo com o preconizado pela *Guia da AOAC* ⁽²³⁾ e ANVISA ⁽²²⁾. Comparando o tempo de retenção do composto, pode-se notar que o mesmo teve alteração a partir das mudanças mencionadas, tanto para alteração de fluxo quando para fase móvel, conforme já esperado. Quando o fluxo foi diminuído, o tempo de retenção aumentou para 9,11 minutos ($\pm 6,6\%$), e quando se aumentou a proporção de acetonitrila na fase móvel o tempo de retenção diminuiu para 6,7 minutos ($\pm 22\%$). Essa mudança tem um impacto significativo no método de análise, visto que devido ao tempo de meia ultra curto do PiB, se torna um fator limitante no tempo total do processo.

Tabela 4. Resultados obtidos a partir das alterações cromatográficas para avaliar a robustez do método.

Variação das condições cromatográficas	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração medida ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Recuperação (%)	Resolução
Fluxo 2,8 mL/min	2,0	2,4	2,0	120	3,024
Fase móvel ACN:H ₂ O(%) 32:68	2,0	2,2	0,26	110	2,874

CONCLUSÕES

O método proposto para quantificação do PiB por CLAE mostrou-se específico, linear na faixa de concentração entre 1,0 e 4,2 µg/mL, sensível, preciso, exato e robusto para variação da proporção de fase móvel, sendo adequado para avaliação do PiB no controle de qualidade. Os parâmetros de validação apresentados estão de acordo com a norma do país, a RE 899/2003 ⁽²²⁾ e a Guia Internacional da AOAC ⁽²³⁾, estabelecidas como referência devido à ausência de uma guia específica para análise de radiofármacos, assim como, uma monografia específica para o [¹¹C]PiB, o que se tornou um grande desafio no desenvolvimento do método.

Conhecida a meia vida de 20,4 minutos do composto em questão, o tempo de análise se torna um fator limitante, visto que todo o processo deve ser realizado de 2 a 3 meias vidas, neste caso, entre 40 e 60 minutos aproximadamente ⁽²⁴⁾. A partir do resultado de robustez apresentado após variação da proporção de acetonitrila e água na fase móvel, pode-se perceber que o tempo de retenção do composto de interesse diminuiu significativamente, o que possibilitaria a redução da duração desta análise, otimizando o tempo da mesma e, conseqüentemente, possibilitando a liberação do produto para utilização em um tempo menor.

REFERÊNCIAS

- [1] Wilson, Robert S. et al. The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychology And Aging*, **2012**;27(4): 1008-1017.
- [2] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. **2007**;3(3):186-91.
- [3] Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. **2009**;118(1):5-36.
- [4] Yankner, B.; Duffy, L.; Kirschner, D.. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 12 out. **1990**; 250(4978):279-282.
- [5] Schilling, Lucas Porcello et al. Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. *Dementia & Neuropsychologia*, jun. **2016**;10(2):79-90.
- [6] Ni, R., Gillberg, P.G., Bergfors, A., Marutle, A., Nordberg, A.. Amyloid tracers detect multiple binding sites in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain*, **2013**;136 (Pt 7), 2217-2227

- [7] Mattson MP, Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **2004**;430(7000):631-9.
- [8] Busatto Filho, Geraldo; Britto, Luiz Roberto Giorgetti de; Leite, João Pereira. Advancing Neuroscience Applications to Psychiatric and Neurological Disorders: More than Ever, an Interdisciplinary Task. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, out. **2012**;34:121-124,.
- [9] Klunk, W.E.. Biological markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **1998**;19(2):145-147
- [10] Nordberg, A., et al.. The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*. **2010**;6: 78-87.
- [11] Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. **2004**;55(3):306-19.
- [12] Klunk, W.E.. Amyloid imaging as a biomarker for cerebralb-amyloidosis ans risk prediction for Alzheimer dementia. *Neurobiol. Aging*, **2011**;32 (Supl 1), S20-S36.
- [13] Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. **2004**;3(9):519-27
- [14] Langstrom B, Andren PE, Lindhe O, Svedberg M, Hall H. In vitro imaging techniques in neurodegenerative diseases. *Mol Imaging Biol*. **2007**;9(4):161-75.
- [15] Brasil. Resolução RDC N°64, de 18 de dezembro de **2009**. Trata sobre o Registro de Radiofármacos, Capítulo I, seção IV, Art. 5º.
- [16] Mathis, Chester A. et al. Synthesis and Evaluation of ¹¹C-Labeled 6-Substituted 2-Arylbenzothiazoles as Amyloid Imaging Agents. *Journal Of Medicinal Chemistry*, jun. **2003**;46(13):2740-2754.
- [17] Wilson, Alan A. et al. A rapid one-step radiosynthesis of the β -amyloid imaging radiotracer N-methyl-[¹¹C]2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([¹¹C]-6-OH-BTA-1). *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, set. **2004**;47(10):679-682.
- [18] Clemente, Gonçalo dos Santos; ABRUNHOSA, Antenor de. Synthesis optimization of [¹¹C] Pittsburgh Compound B by the captive solvent method. **2013**. DOI: 10.1109/ENBENG.2012.6331358
- [19] Coliva, A. et al. Synthesis optimization of 2-(4-N-[¹¹C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([¹¹C]PIB), β -amyloid PET imaging tracer for Alzheimer's disease diagnosis. *Applied Radiation And Isotopes*, nov. **2015**;105:66-71.
- [20] Brasil. Resolução RDC N° 37, de 6 de julho de **2009**, Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras, Art. 1º.
- [21] Technical Guide for the elaboration of monographs on radiopharmaceutical preparations, *European Pharmacopoeia*, **2010**. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.

[22] Brasil. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de **2003**, Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

[23] International AOAC - Guideline - Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, **2016**.

[24] Schubiger, P.a. et al. PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging. Journal Of Nuclear Medicine, **2007**;48(10):1750-1750.

ANEXO I

Normas da Revista Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

General

The Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals publishes all aspects of research dealing with labeled compound preparation and applications of these compounds. This includes tracer methods used in medical, pharmacological, biological, biochemical and chemical research in vitro and in vivo.

The Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals devotes particular attention to biomedical research, diagnostic and therapeutic applications of radiopharmaceuticals, covering all stages of development from basic metabolic research and technological development to preclinical and clinical studies based on physically and chemically well characterized molecular structures, coordination compounds and nano-particles.

Manuscript Submission

All papers must be submitted via the online system. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/jlcr> to navigate to the Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals online submission site.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have created an account.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .rtf, .ppt, .xls. LaTeX files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided in addition to the source files. Figures may be provided in .tiff or .eps format.

INITIAL SUBMISSION

NON-LATEX USERS: Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LATEX USERS: For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISION SUBMISSION

NON-LATEX USERS: Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LATEX USERS: When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your now revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded documents must be deleted. If your manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

Accepted Article

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record.

The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Copyright and Permissions

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Authors must sign, scan and upload to the online system:

Copyright Transfer Agreement with original signature(s) - without this we are unable to accept the submission, and

permission grants - if the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form

The Copyright Transfer Form and the Permissions Form should be uploaded as "Supplementary files not for review" with the online submission of your article.

If you do not have access to a scanner, further instructions will be given to you after acceptance of the manuscript.

To enable the publisher to disseminate the author's work to the fullest extent, the author must sign a Copyright Transfer Agreement, transferring copyright in the article from the author to the publisher, and submit the original signed agreement with the article presented for publication. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author, unless specifically requested

Pre-Submission English Editing

Papers must be in English. Oxford English Dictionary or American spelling is acceptable, provided usage is consistent within the manuscript.

Manuscripts that are written in English that is ambiguous or incomprehensible, in the opinion of the Editor, will be returned to the authors with a request to resubmit once the language issues have been improved. This policy does not imply that all papers must be written in "perfect" English, whatever that may mean. Rather, the criterion will require that the intended meaning of the authors must be clearly understandable, i.e., not obscured by language problems, by referees who have agreed to review the paper.

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html> All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation of papers

Manuscript style. Use a standard font of the 12-point type: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript.

Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

During the submission process you must enter 1) the full title 2) the short title of up to 70 characters 3) names and affiliations of all authors and 4) the full address, including email, telephone and fax of the author who is to check the proofs.

Include the name(s) of any sponsor(s) of the research contained in the paper, along with grant number(s).

Enter an abstract of no more than 250 words for all articles. Please see the guidance below on acceptable abstract writing for JLCR.

Keywords. Authors should prepare no more than 10 keywords for their manuscript.

Writing Abstracts

An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions. The abstract should be no more than 250 words and convey the following:

1. An introduction to the work. This should be accessible by scientists in any field and express the necessity of the experiments executed
2. Some scientific detail regarding the background to the problem
3. A summary of the main result
4. The implications of the result
5. A broader perspective of the results, once again understandable across scientific disciplines

It is crucial that the abstract convey the importance of the work and be understandable without reference to the rest of the manuscript to a multidisciplinary audience. Abstracts should not contain any citation to other published works.

Nomenclature, Abbreviations and Symbols

Nomenclature, abbreviations and symbols should follow the latest rules of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). In IUPAC nomenclature, isotopic substitution is indicated by a prefix consisting of (1) any necessary locant numeral or numerals; (2) the atomic symbol with the mass number as a superscript to the left of the symbol; and (3) a subscript (other than the unity) indicating the number of such atoms. Trivial names should be avoided unless the compound is to be mentioned often in the text, in which case a systematic name should also be given the first time the trivial name is used.

Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals also touches on biology and medicine, and therefore a wide range of nomenclature rules apply./p>

For biological and biochemical nomenclature authors should conform to the (identical) guidelines published in J Biol Chem 260:16-42 (1985) and Eur J Biochem 138:9-37 (1984).

For biomedical nomenclature authors should conform to rules given in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals prepared by the International Steering Committee of Medical Editors. Reprints of this document are available from the Editor, Annals of Internal Medicine.

For questions of style, usage and punctuation, refer to The Chicago Manual of Style, which will be the final authority.

Reference Style

References: All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. J Comp Neurol **1998**;390:537-551.

Book:

3. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; **1990**. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style

Illustrations and ChemDraw Rules

Copy and paste all illustrations and chemical structures into the text file. In addition upload chemical structures as separate ChemDraw files [or similar chemical drawing

packages] and all other figures as separate files in either .tiff or .eps format, with the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be in a size related to the size given for chemical structures, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

Black and white and colour photos - 300 dpi

Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum

Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

Tables should be part of the the main document and should be placed after the references. If the table is created in excel the file should be uploaded separately.

Chemical structures have to be prepared in ChemDraw either 80mm (onecolumn) or 175mm (two column) widths. However, the one-column format should be used whenever possible as this allows greater flexibility in the layout of the manuscript. Use this ChemDraw Download template or use the following settings:

Drawing settings Text settings

chain angle 120° font Arial

bond spacing 18% of length size 12 pt

fixed length 17 pt

bond width 2 pt Preferences

line width 0.75 pt units points

margin width 2 pt tolerances 5 pixels

hash spacing 2.6 pt

Bold width 2.6 pt

Authors using different structural drawing programs should choose settings consistent with those above. Compound numbers should be bold, but not atom labels or captions.

Graphical Table of Contents

JLCR's table of contents will be presented in graphical form with a brief abstract.

The table of contents entry must include the article title, the authors' names (with the corresponding author indicated by an asterisk), no more than 80 words or 3 sentences of text summarising the key findings presented in the paper and a figure that best represents the scope of the paper. (see the section on abstract writing for more guidance).

Table of contents entries should be submitted to Manuscript Central in one of the generic file formats and uploaded as 'Supplementary material for review' during the initial manuscript submission process.

The image supplied should fit within the dimensions of 50mm x 60mm, and be fully legible at this size.

Examples for arranging the text and figures as well as paper title and authors' names are shown below.

Citing EarlyView Articles

To include the DOI in a citation to an article, simply append it to the reference as in the following example:

R. K. Harris, A. Nordon, K. D. M. Harris, Rapid. Commun. Mass Spec. **2007**, DOI: 10.1002/rcm.21464.

To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following example:

DOI 10.1002/JLCR.20941, becomes <http://dx.doi.org/10.1002/JLCR.20941>.

Supporting Information

Data that are (i) not amenable to presentation in a traditional print format, (ii) of interest primarily to specialists and do not require Journal page space, or (iii) particularly useful to the community in electronic (downloadable) form can be published online as supplementary material hosted within Wiley Online Library.