



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ESTUDOS DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS
CINTILOGRÁFICAS EM CÃO DO ÁCIDO 15-p-iodofenil
PENTADECANÓICO MARCADO COM ^{131}I**

IONE CASELATO OLIVEIRA

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

Orientadora:
Dra. Maria Aparecida T.M. De Almeida

**São Paulo
1997**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDOS DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS

CINTILOGRÁFICAS EM CÃES DO ÁCIDO 15 -p- IODOFENIL

PENTADECANÓICO MARCADO COM ^{131}I .

IONE CASELATO OLIVEIRA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

ORIENTADORA:

Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida

São Paulo

1997

Aos meus Pais

por tudo que sou

Aos meus irmãos, Marcelo e Vanessa

Ao Marcelo

A minha Avó, Cecília,

por todo carinho e apoio.

Em memória e com saudades.

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Na pessoa de seu Superintendente Dr. Cláudio Rodrigues e ao Corpo Docente e Pesquisadores.
- À Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida, orientadora, pela orientação e apoio à realização desta Dissertação durante a realização deste trabalho.
- À Dra. Constância Pagano G. Silva, chefe da Coordenadoria de Processamento de material Radioativo pelas condições oferecidas e pelo carinho e amizade durante a execução deste trabalho.
- À Jair Mengatti, chefe de Supervisão de Produção de Radioisótopo.
- À Dra. Nilda P. S. de Pereira, chefe de Supervisão de Controle de Qualidade de Radiofármacos, pelo incentivo e colaboração.
- À Msc Marycel B. Figols, chefe de Supervisão de Radiofarmácia, pelo apoio e facilidades oferecidas.
- À Dra. Emiko Muramoto, pela colaboração, pelas sugestões oferecidas e pela participação nas etapas experimentais.
- À Dra. Elaine B. de Araújo, pela amizade e dedicação em todas as fases deste trabalho, meu muito obrigado.

- Ao Dr. João Alberto Osso Jr., pelas sugestões e pela colaboração
- À Maria Tereza Colturato, pelo apoio e dedicação.
- Aos pesquisadores, técnicos e secretárias da Divisão de Radiofarmácias que colaboraram com a elaboração deste trabalho.
- À Divisão Experimental do Instituto do Coração (INCOR), pela colaboração prestada na realização das imagens cintilográficas.
- À Dra. Iris Janete C. Coelho, pela dedicação e apoio nos experimentos realizados em cães.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1- INTRODUÇÃO	03
2- OBJETIVO	17
3- PARTE EXPERIMENTAL	18
3.1- Materiais	18
3.1.1- Sais e Reagentes	18
3.1.2- Equipamentos	19
3.1.3- Outros	20
3.1.4- Animais	20
3.2- Métodos	21
3.2.1- Marcação do Ácido 15-p-iodofenil penta- decanóico com ^{131}I (IPPA- ^{131}I)	21
3.2.2- Determinação da pureza radioquímica	22
3.2.3- Otimização das condições de marcação	23
3.2.4- Estudos de estabilidade do produto marca- do <i>in vitro</i>	23

3.2.5- Estudos Biológicos	24
3.2.5.1- Distribuição Biológica em camundon- gos	24
3.2.5.2- Imagens Cintilográficas em Cães	25
4- RESULTADOS	26
4.1- Marcação do IPPA com ¹³¹ I	26
4.2- Otimização das condições de marcação	27
4.3- Estabilidade do produto marcado <i>in vitro</i>	28
4.4- Estudos Biológicos	32
4.4.1- Distribuição Biológica em camundongos	32
4.4.2- Imagens Cintilográficas em Cães	37
5- DISCUSSÃO	40
6- CONCLUSÃO	49
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1

**ESTUDOS DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO, E IMAGENS
CINTILOGRÁFICAS EM CÃO DO ÁCIDO 15 -p-iodofenil
PENTADECANÓICO MARCADO COM ^{131}I .**

Ione Caselato Oliveira

RESUMO

A cintilografia do miocárdio obtida após a administração de um traçador radioativo, resulta em um meio de se identificar e quantificar áreas de isquemia ou infarto. O Ácido 15 -p-iodofenil pentadecanóico é marcado com ^{131}I (IPPA- ^{131}I), através da metodologia de troca isotópica na presença de sulfato de cobre pentahidratado e ácido ascórbico. A pureza radioquímica será avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia ascendente em papel. A otimização das condições de marcação foi realizada variando-se o tempo e temperatura de marcação onde com 120°C em 30 minutos apresentou rendimento de marcação considerável com elevada pureza radioquímica. O composto marcado permanece estável até o 7º dia após a marcação. Nos estudos de distribuição biológica observa-se que logo após a administração endovenosa do IPPA- ^{131}I tem-se uma considerável captação pelo músculo cardíaco. O radiofármaco apresenta a rápida metabolização do sangue. As imagens cintilográficas obtidas em cães indicam que ocorre uma permanência no coração permitindo a identificação do músculo cardíaco.

**STUDY OF LABELING, BIODISTRIBUIÇÃO AND
SCINTHILOGRAPHIC IMAGENS IN DOG DO 15 -p- IODOPHENYL
PENTADECANOIC ÁCID LABELING WITH ^{131}I**

Ione Caselato OLiveira

ABSTRAT

The miocárdio cintilografia obtained after a radioactive tracer administration, results in a way to identity and quantity ischemia or infarto areas. The 15 -p- iodophenyl pentadecanoic acid is marked with ^{131}I (IPPA - ^{131}I), through the isotopic exchange methodology in cooper sulfato an ascorbic acid presence. The radioquímica purity will be evaluated by high efficient liquid cromatografia (HPLC) and rising cromatografia in paper. The optimization of the marks conditions was accomplished by varying time and marking temperatures where it was shown considerable mark revenue with high radioquímica purity at 120°C in 30 minutes. The marked mixture stays stable up the 7th day after marking. In the biological distribution studies is observed that right after the endovenosa administration of the IPPA - ^{131}I it is achieved a considerable captação by the cardíaco muscle. The radiofármaco display a fast blood clareamento. The cintilografias images obtained in dogs indicates that there is a stay in heart, allowing the identification of the cardiac muscle.

1- INTRODUÇÃO

A evolução da Medicina Nuclear na obtenção de imagens do miocárdio tem avançado, sempre à procura de um radiofármaco com características físicas e biológicas adequadas.

A cintilografia do miocárdio obtida após a administração de um traçador radioativo, resulta em um meio de se identificar e quantificar áreas de isquemia ou infarto.

O emprego de lípidos marcados com traçador radioativo usado na cintilografia de miocárdio está ligado a capacidade do tecido cardíaco de extrair essas lipoproteínas da corrente sanguínea por se tratarem da importante fonte de energia para seu funcionamento, contribuindo para produção de ATP. Isso se deve às reações enzimáticas correlacionadas com a β -oxidação. Dessa forma a distribuição biológica de um traçador que se acumule seletivamente no miocárdio poderá ser um indicador de perfusão celular dos miócitos. ^(19,20)

A síntese dos ácidos graxos se dá principalmente no tecido adiposo e fígado e é a principal fonte de energia da fibra cardíaca.

As células do miocárdio para suprir sua necessidade de energia podem utilizar uma variedade de combustíveis metabólicos, tais como, ácidos graxos livres, glicose, lactato, piruvato, cetonas e aminoácidos. Sob condições normais e no repouso, 90% da demanda de energia é fornecida pela utilização de ácidos graxos. Observa-se também que no estado de jejum a fonte de energia predominante para o miocárdio é representada pelos ácidos graxos livres.^(12,20)

Uma vez na corrente sanguínea, os ácidos graxos são transportados para o coração como ácidos livres e geralmente, complexado à albumina sérica ou como triglicerídeo complexados a lipoproteínas hidrofóbicas.^(19,20)

Cerca de 40% dos ácidos graxos livres são extraídos pelo miocárdio normal durante o trânsito individual.⁽²⁰⁾

Na superfície das membranas endoteliais os triglicerídeos ligados são hidrolizados à ácidos graxos livres que são prontamente captados pelos componentes celulares do miocárdio.^(19,20)

O catabolismo dos ácidos graxos produzem energia e portanto, contribuem para a produção de adenosina trifosfato (ATP), através de uma série de reações enzimáticas denominadas de β -oxidação.⁽²⁷⁾

A fase inicial do metabolismo intracelular de ácidos graxos é a ativação, resultando em seu respectivo acil-coenzima A (Acil-CoA). Esse processo de ativação ocorre no citoplasma da célula miocárdica, onde uma fração de Acetil-CoA sofre β -oxidação na mitocôndria. Grande parte dessa fração porém, é primeiramente incorporada a triglicérides, subseqüentemente liberada pela lipólise e então oxidada dentro da mitocôndria.⁽²⁷⁾

A transferência do Acil-CoA do citosol para dentro da mitocôndria requer um sistema transportador: a carnitina / carnitina-transferase. Os produtos finais deste processo são o Acetil-coenzima A para ácidos graxos de número par de átomos e propionil-coenzima A para os de número ímpar.⁽²⁷⁾

Estes compostos são finalmente oxidados por meio de reações do ciclo de Krebs, sendo produzidos compostos com alta energia para o trabalho do músculo cardíaco.⁽²⁷⁾

O esquema abaixo demonstra o caminho metabólico simplificado do ácido 15-p-iodo fenil pentadecanóico (IPPA) (fig. 1)^(17,19,20).

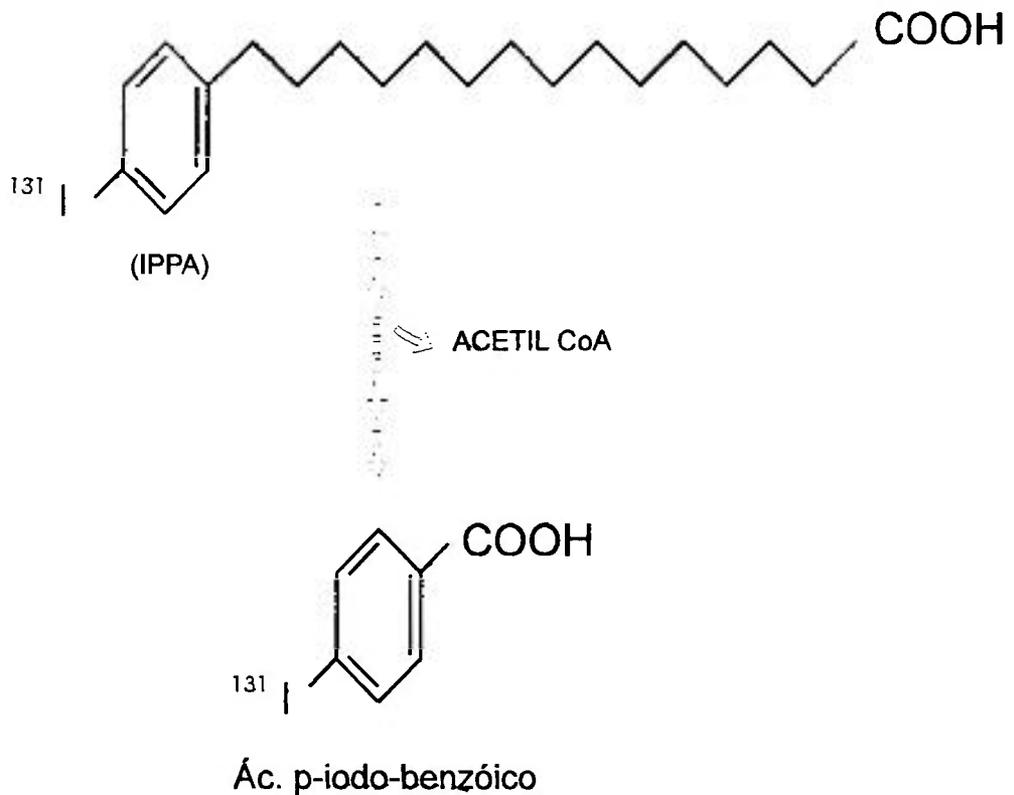


FIGURA 1 - Catabolismo do IPPA - ^{131}I via β - oxidação

Enquanto os ácidos graxos alifáticos marcados na posição terminal com ^{123}I são facilmente catabolisados e liberaram radioiodeto via β -oxidação, o IPPA é degradado a ácido p- ^{123}I benzóico o qual é rapidamente excretado, principalmente na forma de ácido ^{123}I hipúrico.^(2,11,12,19,20)

Um grande número de fatores pode alterar a velocidade de renovação metabólica de ácidos graxos no músculo cardíaco. A utilização do ácido graxo por este tecido é determinada pela capacidade de extração celular ou por mecanismos de controle localizados nas membranas ou no compartimento intracelular.⁽²⁷⁾

A extração dos ácidos graxos livres depende de três fatores: da disponibilidade do substrato, da necessidade de energia das células e do tamanho do "pool" lipídico endógeno.^(20,27)

Os ácidos graxos entram nas células através de um canal seletivo anatômico pelo processo de difusão e pelo processo de saturação da ligação do ácido graxo livre entre proteínas do sangue e proteínas do sarcolema do miocárdio.⁽²⁰⁾

A captação do ácido graxo é controlada por mudanças nos níveis de coA livre e carnitina no citosol e de alterações na velocidade de evolução do ciclo de Krebs.⁽²⁷⁾

A β -oxidação pode processar-se tão rapidamente quanto o ciclo do ácido cítrico oxida a CoA. Todavia uma diminuição do teor de oxigênio decresce a atividade do ciclo de Krebs, aproximadamente na proporção que decresce o fluxo sanguíneo. Outro fator que limita a β -oxidação é redução dos níveis de carnitina, que leva a uma redução concomitante da velocidade de transporte de Acil-CoA para dentro da mitocôndria. Durante a isquemia cardíaca a disponibilidade de carnitina está diminuída.⁽²⁷⁾

A maioria das doenças cardíacas baseia-se nas anormalidades do sistema excitador e condutor do seu músculo. Quando há um comprometimento no metabolismo cardíaco em consequência de qualquer condição patológica, as contrações rítmicas do coração podem interromper-se ocasionalmente provocando uma parada cardíaca. Grande parte das patologias que levam a

morte, resultam da doença da artéria coronária, ou seja, há algum dano na circulação arterial coronariana, por isso, o estudo da fisiologia normal e patológica representam um importante tema no campo da medicina.^(9,20, 27)

Os ácidos graxos marcados com substância radioativa tornam-se excelentes traçadores os quais podem assegurar o estado do tecido do miocárdio, isto é, o grau de viabilidade das células do miocárdio. Deste modo deveria ser desenvolvida uma metodologia que auxiliasse de maneira eficaz o diagnóstico de doenças metabólicas do miocárdio através de uma técnica não invasiva *in vivo*.^(20,22)

As primeiras imagens cardíacas em humanos com ácidos graxos foram demonstradas em 1965 com o ácido iodo olêico marcado com ¹³¹I. Estes ácidos graxos de cadeias médias e longas quando marcados com iodo radioativo eram metabolizados liberando níveis de radioatividade na corrente sanguínea.⁽²²⁾

Evans e col.⁽²⁰⁾, usaram ácido olêico marcado com ¹³¹I como agente para obtenção de imagens do miocárdio em animais de experimentação e em humanos. Estes estudos tiveram sucesso limitado devido ao seu comportamento biológico inadequado da molécula marcada relativo à características de ligação desfavoráveis do radionuclídeo com o fármaco.

Alguns pesquisadores como Biewalters e col.⁽²⁰⁾, e Robinson e Lee⁽²⁰⁾ analisaram um ácido graxo insaturado utilizando a técnica de marcação de adição com radioiodo ¹³¹I, enquanto que um outro grupo empregou ¹²³I como

radioisótopo de escolha introduzindo o átomo de iodo na posição terminal da cadeia carbônica, entretanto depararam com as mesmas dificuldades apresentadas por demais autores. ⁽²⁰⁾

As radioiodações do ácido ω -iodo-9-hexadecanóico, ácido ω -iodo hexadecanóico e o ácido 17-¹²³I- heptadecanóico(IHA) foram amplamente estudadas para uso como indutores metabólicos do miocárdio. Estes ácidos graxos, contudo, são rapidamente metabolizados e deionizados *in vivo*, resultando na liberação inaceitável de radioiodo na corrente sanguínea mostrando ser inadequados para uso clínico. ⁽²⁰⁾

No início da década de 80, Machulla e col. ⁽¹⁹⁾, prepararam um análogo saturado do ácido graxo IHA. Este ácido graxo o IHA tem uma aplicação clínica limitada devido a depuração sanguínea ser mais prolongada associada a liberação do radioiodo "in vivo" após o processo de β - oxidação do IHA. ⁽²⁰⁾

Os estudos realizados por alguns autores concluíram que este ácido graxo radioiodado seria um forte candidato a ser utilizado para avaliação do metabolismo do miocárdio, uma vez que seu comportamento era similar ao ácido palmítico. Assim sendo a introdução do ácido 15-p-iodo fenil pentadecanóico (IPPA) foi uma alternativa encontrada para substituir os análogos dos ácidos graxos já existentes. ⁽¹⁹⁾

Os radioisótopos mais utilizados para diagnóstico de doenças do coração

são: ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc, ¹²³I e ¹³¹I.

Alguns autores demonstraram que a distribuição dos ácidos graxos marcado com ^{123}I poderia ser comparado ao ^{201}Tl no caso do coração com isquemia parcial.⁽⁴⁾

Devido a similaridade na biodistribuição do K^+ e Tl^+ , este último foi sugerido para imagem de perfusão em 1970. A eficiência da extração do Tl está relacionada diretamente ao fluxo sanguíneo regional e a oxigenação do tecido, contudo, as propriedades isotópicas, fazem do Tl um produto não tão ideal para imagem cardíaca devido a seu fóton de baixa energia (raio X de 69-83 Kev, radiação gama de 135 e 167 Kev) que produz significativa atenuação do tecido, além da meia-vida física e biológica longa que limita a dose administrada à dosimetria de radiação interna.⁽⁴⁾

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI é outra substância marcada muito utilizada para imagens cardíacas na detecção de doenças isquêmicas cardíacas. Este composto é rapidamente absorvido no miocárdio pelo processo de difusão passiva em proporção ao seu fluxo sanguíneo regional.⁽⁴⁾

O MIBI apresenta um inconveniente pois, quando administrado intravenosamente é rapidamente captado pelo fígado e no decorrer do tempo aparece uma proporção relativamente alta do trato gastro intestinal (TGI) que de certa forma poderá interferir significativamente na interpretação das imagens cardíacas.⁽³²⁾

Alguns estudos realizados comparando ácidos graxos marcados com ^{123}I com $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ (metoxi isobutil isonitrila) e ^{201}Tl , concluíram que os ácidos graxos (como o Ácido 15-p-iodo fenil pentadecanóico - IPPA ^{131}I) tem uma sensibilidade similar ou melhor que $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ na detecção de doenças artério coronárias, e o paciente pode receber dose menor que a de ^{201}Tl . Além disso, o IPPA possibilita a realização da avaliação cardíaca em pacientes incapazes de realizar o teste de esforço, além de ter uma melhor especificidade devido ao baixo número de resultados falso-positivos.⁽¹²⁾

Apesar do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ser um candidato em potencial para marcação de ácidos graxos devido às suas propriedades físicas ideais, como tempo de meia-vida de 6,02 horas, emissão γ de energia de 140 Kev e ausência de emissão β , a ligação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aos ácidos graxos geralmente promovem alterações estruturais e estereoquímicas que diminuem a absorção no miocárdio.⁽¹²⁾

Uma variedade de análogos de ácidos graxos para marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tem sido sintetizado e avaliado devido ao baixo custo e disponibilidade deste radioisótopo.⁽¹²⁾

A escolha do radionuclídeo deve ser efetuada em razão das suas características como o decaimento radioativo, as partículas emissoras, energia e o tempo de meia-vida ($T_{1/2}$).⁽³⁾

Sabendo-se que o processo de marcação com $^{123/131}\text{I}$ não altera as propriedades bioquímicas, farmacológicas e físico-químicas da molécula do IPPA, eles foram eleitos como sendo radionuclídeos ideais no desenvolvimento de marcação.⁽¹²⁾

O ^{123}I é produzido em ciclotron, por meio da reação $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$ (ref.). Este é o radionuclídeo mais adequado para medidas em aparelho cintilográfico como gama câmeras e Single Photon Computer Tomography (SPECT). As características físicas do ^{123}I , como a emissão gama de baixa energia (159Kev), ausência de emissores β^- e tempo de meia-vida física de 13,3 horas, o fazem ideal para estudos diagnósticos *in vivo*.^(15,17,28,30)

O ^{131}I é produzido em reator e apresenta características físicas menos apropriadas para investigações "in vivo", tais como emissão β^- , associada a um gama de alta energia (354 Kev) e tempo de meia-vida físico de cerca de 8,1 dias. Porém sua disponibilidade e baixo custo fazem com que ainda seja muito utilizado.^(15,28)

O $^{123/131}\text{I}$ são os radioisótopos de escolha para marcação de ácidos graxos para SPECT, uma vez que a ligação do átomo de iodo a molécula de ácido graxo não altera suas propriedades, como mencionado acima.

Diversos autores sintetizaram e marcaram ácidos graxos com iodo radioativo utilizando vários métodos de síntese orgânica e marcação.

Inicialmente, a marcação de ácidos ω -iodados com iodo radioativo foi realizada por troca com o bromo derivado correspondente.⁽²⁷⁾

Evans e col.⁽²⁰⁾, marcaram o ácido oléico através da reação de adição molecular do radioiodeto. Biewalters e col., Poe e col.⁽²⁰⁾, marcaram ácido oléico, linolêico e linólico por adição de I_2 ou ICl .

Para a marcação de ácidos graxos com o radioiodeto a reação de substituição nucleofílica é uma das mais recomendadas podendo ser por troca de halogênio e substituição do grupo tosilato com $^{123/131}I$.

Ultimamente tem sido discutido uma introdução do iodo de maneira interessante e apropriadamente promissora com o uso de compostos metálicos orgânicos. Kabalka demonstrou uma iodação eficiente de ácidos graxos quando um precursor de iodo é usado, mas nenhum relato foi divulgado nesse sentido. Entretanto altos rendimentos radioquímicos podem ser obtidos com uma alta estereoseletividade quando a reação de marcação é realizada com compostos de Sn ou Hg.⁽²⁰⁾

Machulla e col. (1980)^(22,23), estudaram a marcação do IPPA utilizando um método de substituição nucleofílica, com a variação dos diferentes parâmetros desta reação e estabeleceram condições ideais para o seu procedimento.

O desenvolvimento de um ácido de cadeia simples ω -fenil substituído envolve a ligação do iodo na posição "orto" ou "para" do anel fenil terminal (fig 2) (12,13), onde a ligação do iodo desta maneira é considerada estável.

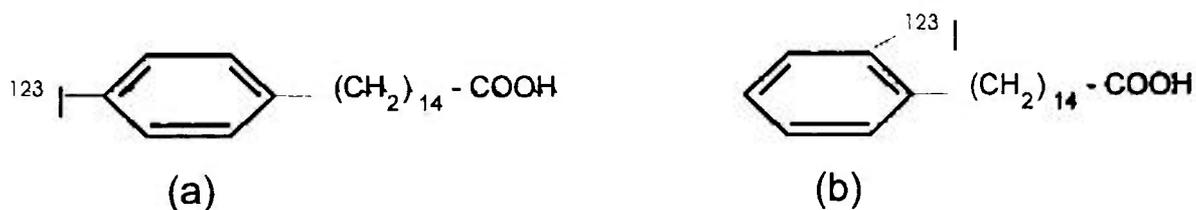


Fig. 2 - Fórmula química: (a) p-IPPA - ^{123}I ; (b) o - IPPA - ^{123}I

Dependendo do método de marcação utilizado não há necessidade de uma etapas de purificação. Quando se utiliza o método de troca nucleofílica do I por I^* na presença de cobre (I), não há necessidade de uma purificação subsequente que possibilita a obtenção de um rendimento de marcação reprodutível.⁽³¹⁾

A presença do radioiodeto livre deve ser reduzida pois pode deteriorar a qualidade das imagens nos estudos em SPECT. Além disso há uma exposição à radiação do órgão não alvo (exemplo: glândula tireóide) ou a uma interpretação falsa dos resultados.⁽³¹⁾

A iodação oxidativa (^{123}I), do ácido fenil pentadecanóico demonstrou baixa eficiência de marcação com presença do isômero orto que conduz a necessidade de purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).⁽⁵⁾

Dougan e col.⁽⁵⁾, utilizaram a metodologia de troca isotópica na presença de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e ácido ascórbico a um temperatura de 107°C por 60 minutos, obtendo-se um rendimento de marcação acima de 80% e uma pureza radioquímica superior à 98% determinada por cromatografia ascendente em papel Whatman 3MM. Neste procedimento os autores lançaram mão da técnica de CLAE para obtenção de um produto radioquimicamente puro.⁽⁵⁾

Os compostos aromáticos halogenados, são relativamente inertes à substituição nucleofílica, a menos que ativados em presença de grupos separadores de elétrons, como metais ou complexos metálicos. Os sais de cobre (Cu^{+2}) tem sido amplamente utilizados como catalizadores deste tipo de reação de troca.⁽⁸⁾

A elaboração de substâncias marcadas para utilização clínica, envolve além dos estudos de otimização das condições de marcação e estabilidade do produto "in vitro", o estudo de distribuição biológica utilizando modelos animais.

Em vários modelos experimentais podemos observar que o ácido fenil pentadecanóico (IPPA) marcado tanto com ^{131}I como ^{123}I , é rapidamente extraído da corrente sanguínea e subseqüentemente metabolizado no músculo cardíaco. Poe e col.⁽⁴⁾, demonstraram em experimentos em cão que os ácidos graxos iodados são excretados do organismo por via renal.

Existem controvérsias a respeito da identificação do metabólito final do IPPA. Para identificação desses produtos resultantes, uma das técnicas de melhor recurso tem sido a Espectrometria de Massa - Bombardeamento com átomo rápido (FAB-MS), o qual demonstra que ácido 3(p-iodofenil) propenóico é o principal metabólito.^(7,12)

Mas esta afirmação citada acima, requer maiores investigações. O que se pode enfatizar, contudo, é que os resultados destes estudos demonstram a estabilidade do radioiodo marcado nos metabólicos.⁽¹¹⁾

Machulla e col., demonstraram que a extração do ácido graxo ω -halo do miocárdio é mais eficiente do que do ácido graxo α -halo em estudos realizados em ratos. Observaram-se que quando o átomo de iodo é introduzido na posição α o acúmulo do radiofármaco no miocárdio era claramente reduzido se comparado com o seu similar, o ácido 11-¹¹C-palmítico.⁽¹⁹⁾

Estes autores, ao estudar estes isômeros do ácido graxo, o-PPA e p-PPA, verificaram que no experimento em animais, os componentes radioativos existentes no sangue não diferenciavam significativamente entre ambos (orto e para).

Posteriormente, os pesquisadores, ao compararem o comportamento dos halogênios iodo e bromo nas posições orto e para do anel benzênico do PPA,

concluíram que a absorção do radiofármaco pelas células do miocárdio não era dependente do substituinte introduzido.⁽¹⁸⁾

Devido a importância clínica do emprego de ácidos graxos marcados com ^{123}I e ^{131}I em cintilografia do miocárdio, e devido à inexistência dos mesmos no mercado nacional, verificou-se o interesse na pesquisa de um radiofármaco capaz de fornecer a imagem metabólica do miocárdio.

2- OBJETIVO

A Medicina Nuclear tem apresentado interesse notório na obtenção de imagens do miocárdio por meio de um radiofármaco com características apropriadas.

O objetivo deste trabalho foi baseia-se nas características do Ácido 15-p-iodofenil pentadecanóico (IPPA) marcado com ^{131}I sendo este radiofármaco seletivo para imagens cintilográficas do miocárdio, juntamente com o interesse da classe médica.

A marcação e otimização do IPPA marcado com ^{131}I foi um ponto importante a ser avaliado, bem como sua estabilidade.

Os estudos de distribuição biológica em animais de laboratório é imprescindível e necessário para o processo de padronização para utilização *in vivo*. Outro fator que contribuiria para esta padronização foi a obtenção de imagens cintilográficas em cães.

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1- MATERIAIS

3.1.1- Sais e Reagentes

1,2-propanodiol (Reagen)

Ácido 15-p-iodo fenil pentadecanóico (EMKA-CHEMIE)

Ácido acético glacial 100%, p.a. (MERCK)

Ácido ascórbico, p.a. (Synth)

Álcool etílico absoluto (Inlab)

Clorofórmio, p.a. (Merck)

Dextrose, p.a. - anidro (Reagen)

Dioxano, p.a. (Quimis)

Hidróxido de Sódio p.a. (Merck)

Na¹³¹I (IPEN)

Nitrogênio gasoso (White Martins)

Resina Lewatit M-600

Solução fisiológica - NaCl 0,9% (IPEN)

Sulfato de cobre pentahidratado, p.a. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Regen)

Tween 80 (Carlo-Erba)

3.1.2- Equipamentos

Balança analítica modelo HM 100, Hilmac, Brasil

Calibrador de dose, Berthold, Alemanha

Calibrador de radioisótopo, modelo Mediac, Nuclear Chicago, Estados Unidos.

Contador automático tipo poço, com cristal de NaI (TI), modelo MAG 312

Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 480 C, CG., Brasil

Caixa de Luvas - *Glove-box*

Manta de aquecimento (Coel-UMP)

Monitor Portátil de radiação Mod. 7013 - CNEN

3.1.3-OUTROS

Membrana filtrante de poro 0,22 μ m, Millipore

Papel Whatman 3MM para cromatografia ascendente

3.1.4-ANIMAIS

Camundongo Swiss, adultos, pesando entre 25 e 30g, alimentados com ração comercial e água - Biotério do IPEN-CNEN / SP

Cão de aproximadamente 11Kg - Divisão experimental do Instituto do Coração, São Paulo.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- MARCAÇÃO DO ÁCIDO 15-p-iodo FENILPENTADECANÓICO COM ^{131}I

Este experimento foi realizado em GLOVE-BOX (caixa de luvas).

A marcação foi baseada no trabalho de Dougan e col. ⁽⁵⁾, que consiste em:

Preparar a solução de IPPA 4 mg/ml TDP (TDP: Tween 80 10%, dextrose 80% 1,2 propanodiol 10%)

Aquecer a 100°C por 2-3 minutos em banho de óleo e agitar por 5-10 minutos.

Tomar 300 μl desta solução e colocar em frasco separado para reação.

À solução de IPPA adicionar 3 μl de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (50 mg/ml de H_2O bidestilada), 10 mg de ácido ascórbico e 30 μl de Na^{131}I 37-370 MBq (1-10mCi).

O iodo presente está na forma de iodeto em solução de NaOH 0,01N.

Nitrogenar por 10 minutos.

Lacrar o frasco e aquecer à 107°C por 60 minutos.

Recuperar em 2-3 ml de solução injetável composta de 8,0 ml de álcool etílico, 1,6 ml de Tween 80 e 90,4 ml de solução fisiológica.

3.2.2 - DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA

A pureza radioquímica do produto marcado foi avaliada pela técnica de cromatografia em papel ascendente, utilizando como suporte fitas Whatmann 3MM (15X1cm) e como fase móvel dioxano:clorofórmio : ácido acético glacial (50:49:1).⁽¹⁰⁾

Após o desenvolvimento cromatográfico, as fitas foram cortadas em segmentos de 1cm e a radioatividade medida em contador gama dotado de cristal de NaI TI , Abbot.

Nestas condições, o Rf do iodo livre é 0 e do produto marcado é 1,0. ⁽¹⁰⁾

Para confirmar os resultados obtidos através da cromatografia ascendente em papel e identificar a presença de outras formas radioquímicas, possíveis e presente, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna C18 modelo Partesil 10 ODS - fase reversa - Whatman, 4,6 X250mm com fluxo de 1ml por minuto, utilizando como solvente etanol:isopropanol:H₂O:ácido acético glacial (261:26:66:5).⁽¹⁾

O efluente passou por detector UV 254nm e detector de radioatividade .

Os tempos de retenção e Rt do IPPA não marcado e do radioiodeto foram previamente determinados para os dois sistemas cromatográficos utilizados.

3.2.3- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO

Avaliou-se neste trabalho os seguintes parâmetros:

- temperatura de reação: 120°C e 150°C
- tempo de reação: 30 e 45 minutos

Para cada parâmetro de marcação foram realizadas um número mínimo de três determinações.

3.2.4- ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PRODUTO MARCADO *in vitro*.

Este estudo foi realizado após a otimização das condições de marcação do IPPA ¹³¹I.

A marcação foi realizada e procedeu-se até o 7º dia a avaliação da pureza radioquímica: estabilidade do produto.

A pureza radioquímica de cada marcação (n=3) foi avaliado do 1º ao 7º dia por meio de cromatografia ascendente em papel conforme descrito anteriormente. Para o 1º e 7º dia da marcação utilizou-se ainda a técnica de CLAE para avaliação da pureza radioquímica.

3.2.5- ESTUDOS BIOLÓGICOS

3.2.5.1- DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA EM CAMUNDONGOS

Após a marcação do IPPA com ^{131}I , o produto foi purificado para a eliminação do iodeto presente em uma coluna Lewatit e esterilizado em filtro Millipore 0,22 μm .

Em todos os estudos biológicos realizados em camundongos Swiss, os animais foram previamente pesados e a dose do produto marcado 30-50 μCi (MBq) / 0,1 ml foi administrado na veia caudal sem utilização de anestesia.

Utilizou-se um número mínimo de sete(7) animais para cada tempo avaliado na realização destes estudos.

Após administração endovenosa do IPPA- ^{131}I os animais, foram sacrificados aos 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 1440 minutos, por decapitação e o sangue coletado em frascos heparinizados.

Os órgãos retirados foram: coração, pulmão, estômago, rins, fígado, intestinos, tireóide e músculo. Os órgãos foram pesados e a radioatividade determinada em contador tipo poço com detector NaI (TI). As caudas dos animais também foram contadas para eventual correção da dose administrada.

Amostras de 100 μ l de sangue foram coletadas para se determinar a radioatividade sanguínea.

As porcentagens da dose administrada presentes nos diversos órgãos e no sangue foram determinadas em relação a um padrão da dose administrada, apropriadamente diluído e contado em contador gama, mantendo-se a mesma geometria e mesmo tempo de contagem das amostras.

3.2.5.2- IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM CÃES

Este experimento foi realizado no serviço de Radioisótopo do Instituto do Coração (INCOR).

Num cão macho com aproximadamente 11Kg, anestesiado com pentobarbital, injetou-se por via intravenosa 185 MBq (5 mCi) da solução de IPPA-¹³¹I.

As imagens foram obtidas em câmara de cintilação OHIO modelo OM-100, acoplada a um computador Sopa Medical modelo S-500 com colimador de média resolução. As imagens iniciaram-se logo após a administração endovenosa, sendo observadas até 40 minutos após a administração endovenosa.

4- RESULTADOS

4.1- MARCAÇÃO DO IPPA COM ^{131}I

Para a determinação da eficiência de marcação do IPPA com ^{131}I , utilizou-se da cromatografia ascendente em papel para se avaliar a pureza radioquímica, juntamente com a CLAE onde analisaram-se as espécies radioquímicas presentes.

A pureza radioquímica desta marcação como descrita por Dougan e col.⁽⁵⁾, foi de 80 - 89%. O rendimento de marcação foi de 60%.

Na figura 4.1 apresenta-se o espectro de CLAE do produto frio, o IPPA, com R_t de aproximadamente 5,94 minutos.

No espectro de CLAE apresentado na figura 4.2 temos o iodo radioativo, outra espécie radioquímica, tendo seu R_t de 3,59 minutos.

O produto marcado de acordo com o método proposto por Dougan e col.⁽⁵⁾, IPPA- ^{131}I , foi avaliado e analisado na figura 4.3, onde os R_t das espécies radioquímicas presentes, foram de aproximadamente 3,61 min. para o ^{131}I e 6,84 min., para o produto marcado (IPPA- ^{131}I).

4.2- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO

Na tabela 4.1 observa-se a pureza radioquímica em relação aos tempos de marcação e a temperatura de reação.

TABELA 4.1 - Pureza radioquímica em relação ao tempo e temperatura de reação

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM PUREZA RADIOQUÍMICA		
	TEMPERATURA (°C)		
	107	120	150
60	85,05 ± 1,18	91,10 ± 2,01	88,03 ± 1,20
45	87,03 ± 1,00	90,09 ± 1,09	91,00 ± 1,30
30	88,04 ± 1,92	98,02 ± 1,08	92,30 ± 1,02

Na figura 4.4 pode-se observar o espectro de CLAE que apresentou melhor resultado.

4.3- ESTABILIDADE DO PRODUTO MARCADO *in vitro*

O estudo de estabilidade apresenta como resultado os dados da cromatografia ascendente em papel no 1º dia de marcação com o valor de $98,02 \pm 1,08$, sendo confirmado pelo espectro de CLAE apresentado na figura 4.5.

O estudo completou-se no 7º dia após a marcação onde na cromatografia ascendente em papel o resultado foi de $98,00 \pm 1,10$, o que foi observado também por meio do espectro de CLAE, figura 4.6.

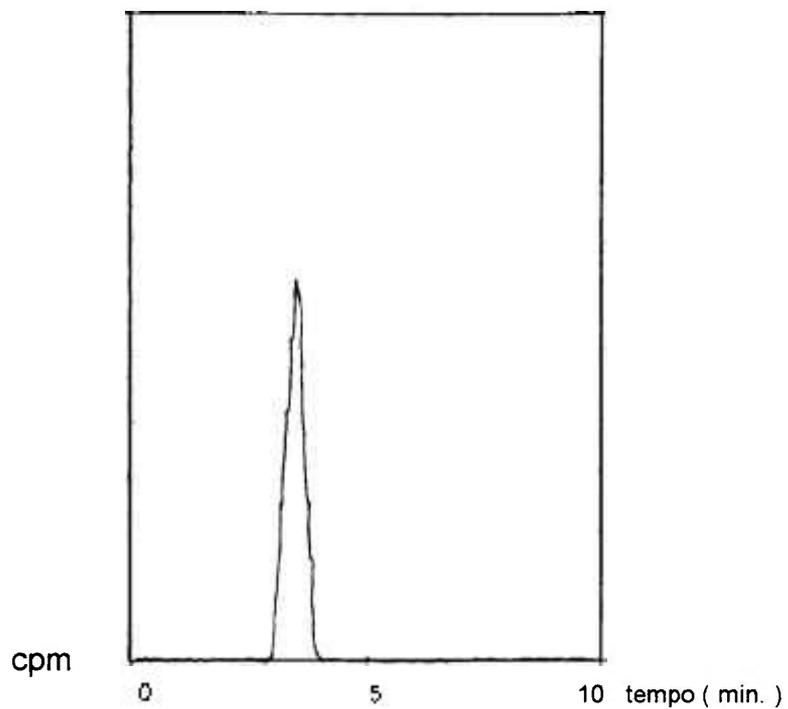


FIGURA 4.1 - Espectro de CLAE do iodo radioativo (^{131}I)

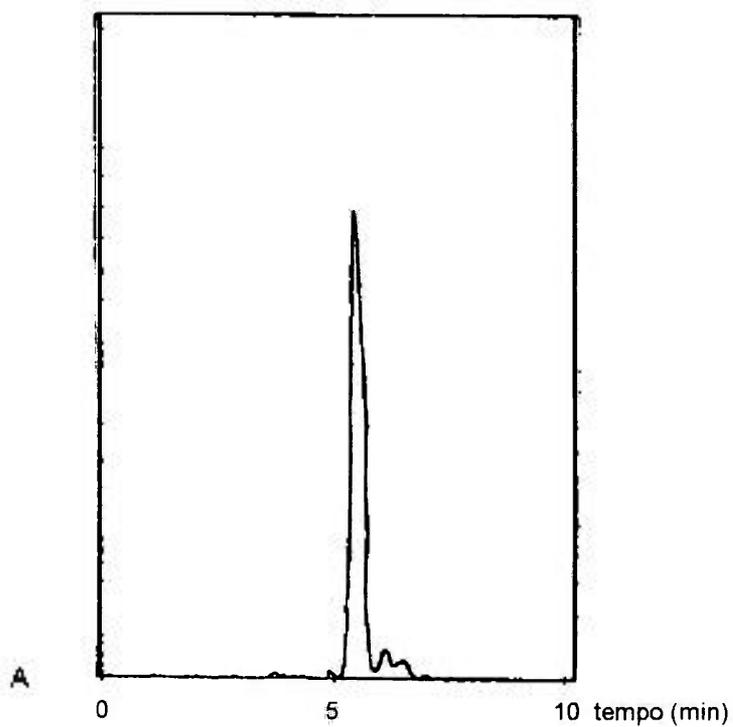


FIGURA 4.2 - Espectro de CLAE do sal IPPA. (Absorbância = A)

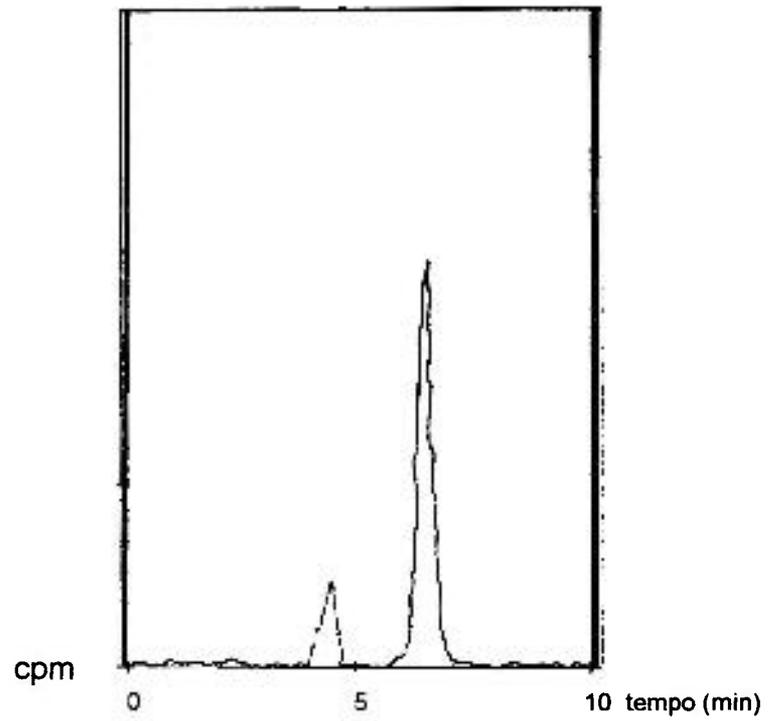


FIGURA 4.3 - Espectro de CLAE obtido da marcação do IPPA com ^{131}I , nas condições proposta pela literatura.⁽⁵⁾

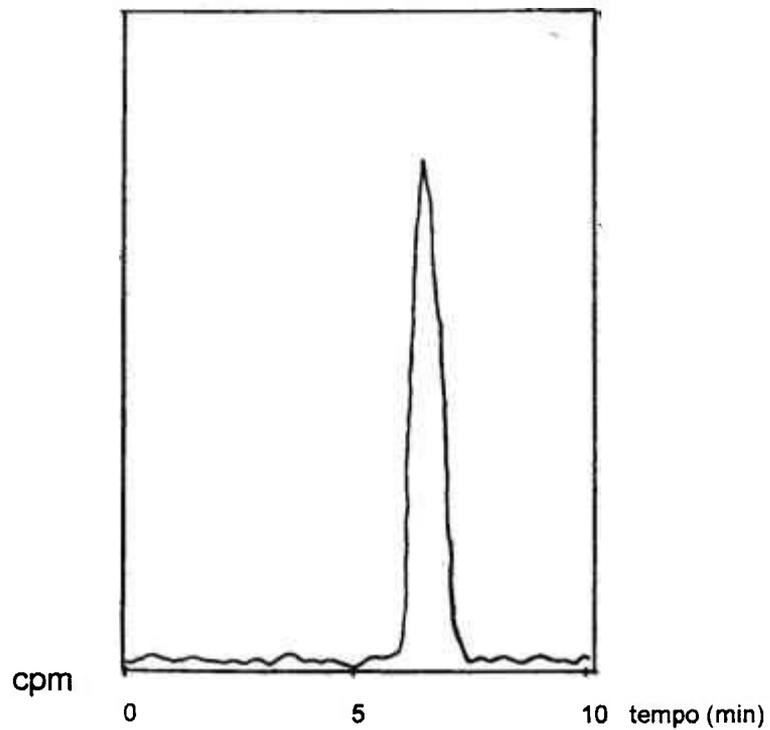


FIGURA 4.4 - Espectro obtido da marcação do IPPA com ^{131}I , após otimização.

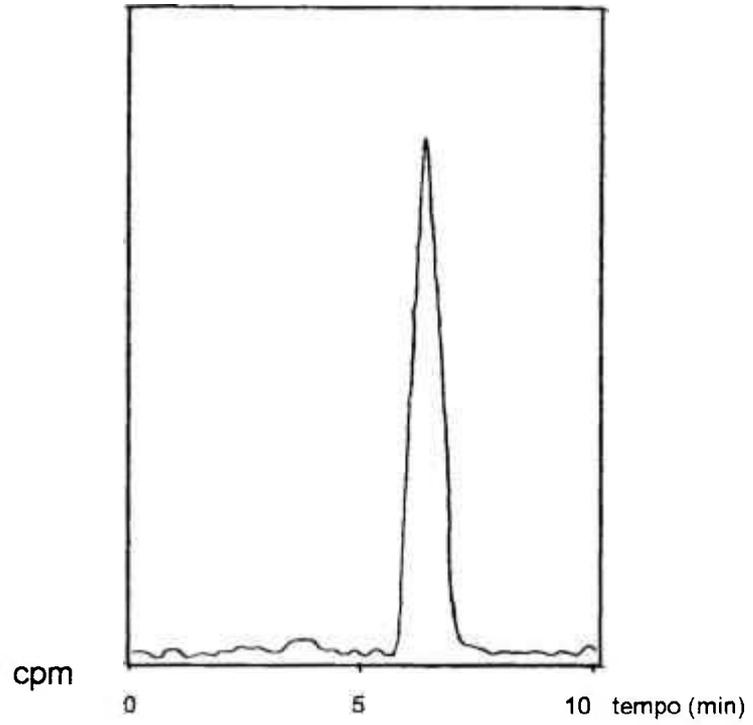


FIGURA 4.5 - Espectro obtido do IPPA - ^{131}I no primeiro dia de marcação.

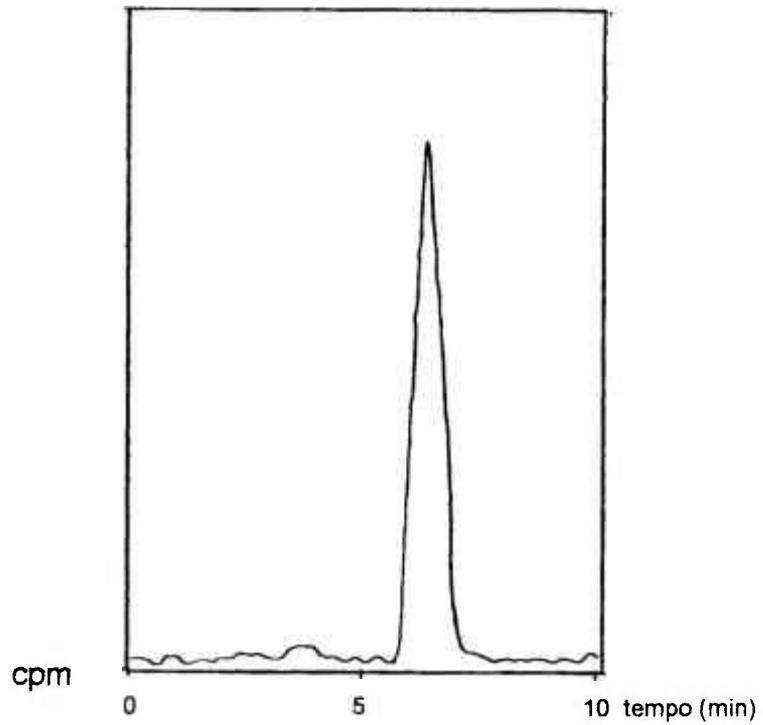


FIGURA 4.6 - Espectro obtido do IPPA - ^{131}I no sétimo dia de marcação

4.4- ESTUDOS BIOLÓGICOS

4.4.1 - Distribuição biológica em camundongos

Nas tabelas 4.2 e 4.3 estão relacionados os resultados de captação do produto IPPA -¹³¹I nos diferentes órgãos e tecidos. Os resultados estão expressos em porcentagem de dose por órgão e porcentagem de dose por grama de órgão.

A porcentagem da dose em relação ao sangue podem ser observados na tabela 4.4.

Na figura 4.7 podemos observar a curva sanguínea obtida nos experimentos com camundongos em função do tempo.

Na figura 4.8 está expressa a porcentagem da dose administrada presente no coração em função do tempo (minuto).

TABELA 4. 2 - Porcentagem da dose administrada de IPPA - ¹³¹I por órgão avaliado

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE IPPA - ¹³¹ I POR ÓRGÃO										
	CORAÇÃO	PULMÃO	FÍGADO	TIREÓIDE	ESTÔMAGO	RINS	BAÇO	MÚSCULO	INT.DEL	INT. GRO.	
1	3,12 ± 0,88	5,49 ± 0,94	33,13 ± 2,15	0,13 ± 0,03	0,98 ± 0,07	3,57 ± 0,35	0,64 ± 0,07	20,56 ± 3,91	4,66 ± 0,44	0,73 ± 0,07	
2	2,83 ± 0,25	2,60 ± 0,60	31,85 ± 4,35	0,11 ± 0,01	0,73 ± 0,08	3,08 ± 0,81	0,45 ± 0,11	19,58 ± 3,05	3,82 ± 1,07	0,65 ± 0,09	
5	2,52 ± 0,47	1,71 ± 0,04	18,68 ± 1,37	0,10 ± 0,04	1,00 ± 0,40	3,08 ± 0,99	0,48 ± 0,09	19,74 ± 0,82	2,95 ± 0,86	0,60 ± 0,05	
10	1,98 ± 0,09	1,59 ± 0,23	15,54 ± 1,56	0,19 ± 0,02	0,76 ± 0,20	2,17 ± 0,42	0,24 ± 0,06	17,94 ± 0,99	1,67 ± 0,20	0,59 ± 0,02	
15	1,52 ± 0,26	1,45 ± 0,19	14,15 ± 0,98	0,64 ± 0,22	1,00 ± 0,29	1,93 ± 0,19	0,16 ± 0,08	19,88 ± 2,72	1,53 ± 0,01	0,72 ± 0,25	
30	1,47 ± 0,28	1,42 ± 0,19	13,66 ± 1,18	1,11 ± 0,27	1,02 ± 0,09	1,58 ± 0,29	0,16 ± 0,04	19,61 ± 4,51	1,85 ± 0,14	1,32 ± 0,19	
60	0,51 ± 0,08	0,71 ± 0,07	9,44 ± 1,73	2,59 ± 0,60	1,73 ± 0,42	1,49 ± 0,14	0,16 ± 0,03	11,33 ± 1,03	1,96 ± 0,16	1,87 ± 0,16	
120	0,28 ± 0,05	0,79 ± 0,13	7,57 ± 0,26	2,71 ± 0,05	1,91 ± 0,09	0,89 ± 0,07	0,13 ± 0,04	8,65 ± 0,20	1,38 ± 0,22	1,17 ± 0,12	
1440	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,01	1,58 ± 0,25	2,45 ± 0,99	0,33 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,03 ± 0,01	1,79 ± 0,61	0,58 ± 0,17	0,87 ± 0,05	

TABELA 4.3 - Percentagem da dose administrada de IPPA - ¹³¹I por grama de órgão

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE IPPA - ¹³¹ I POR GRAMA DE ÓRGÃO									
	CORAÇÃO	PULMÃO	FÍGADO	RINS	BAÇO	MÚSCULO	INT.DEL	INT. GRO.		
1	23,63 ± 3,29	16,41 ± 1,55	23,97 ± 2,99	8,21 ± 0,79	5,38 ± 0,57	1,46 ± 0,34	1,11 ± 0,29	0,70 ± 0,29		
2	17,64 ± 3,11	6,13 ± 0,40	19,40 ± 3,39	7,29 ± 1,82	4,16 ± 0,22	1,38 ± 0,34	1,41 ± 0,49	0,51 ± 0,17		
5	14,31 ± 1,98	6,17 ± 0,48	17,35 ± 1,40	6,29 ± 1,93	3,59 ± 0,91	1,31 ± 0,32	0,83 ± 0,24	0,62 ± 0,08		
10	13,79 ± 0,24	5,40 ± 0,56	13,14 ± 0,60	3,36 ± 0,58	2,43 ± 0,17	1,32 ± 0,07	0,74 ± 0,08	0,42 ± 0,11		
15	10,64 ± 0,30	5,61 ± 0,31	12,53 ± 0,35	3,45 ± 0,01	2,19 ± 0,28	1,32 ± 0,19	0,97 ± 0,01	0,70 ± 0,16		
30	6,62 ± 0,38	3,76 ± 0,23	12,15 ± 2,67	3,61 ± 0,50	1,37 ± 0,16	1,31 ± 0,27	1,69 ± 0,73	1,38 ± 0,33		
60	3,47 ± 0,21	3,15 ± 0,05	6,62 ± 0,41	3,67 ± 0,45	1,45 ± 0,43	0,61 ± 0,05	2,00 ± 0,58	1,06 ± 0,32		
120	1,38 ± 0,15	2,35 ± 0,24	4,19 ± 0,55	2,45 ± 0,33	1,11 ± 0,16	0,60 ± 0,09	1,64 ± 0,18	1,38 ± 0,04		
1440	0,37 ± 0,10	0,63 ± 0,05	1,01 ± 0,12	0,37 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,07	0,32 ± 0,03	0,91 ± 0,06		

TABELA 4.4 - Porcentagem de dose administrada de IPPA -¹³¹I por sangue total e sangue por ml.

TEMPO (min)	SANGUE TOTAL	SANGUE POR ml
1	22,09 ± 2,50	7,72 ± 1,00
2	19,50 ± 1,60	6,27 ± 0,97
5	18,25 ± 1,40	6,39 ± 0,70
10	15,79 ± 1,45	6,86 ± 0,83
15	15,98 ± 0,61	5,50 ± 0,89
30	12,00 ± 1,75	4,97 ± 0,11
60	10,62 ± 1,20	2,42 ± 0,67
120	5,03 ± 0,40	1,93 ± 0,47
1440	0,74 ± 0,12	0,28 ± 0,07

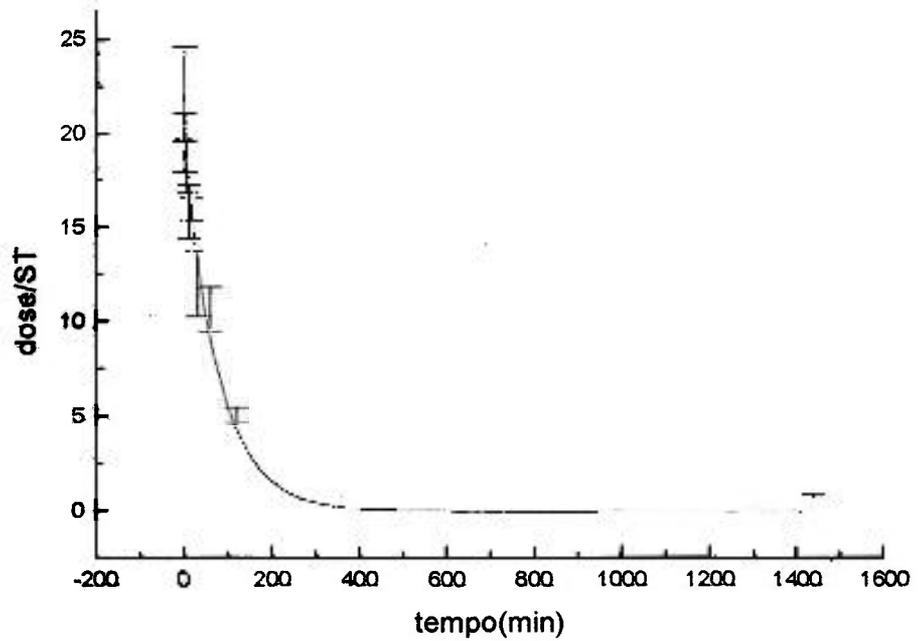


FIGURA 4.7 - Curva sanguínea (sangue total - ST) em função do tempo (minutos)

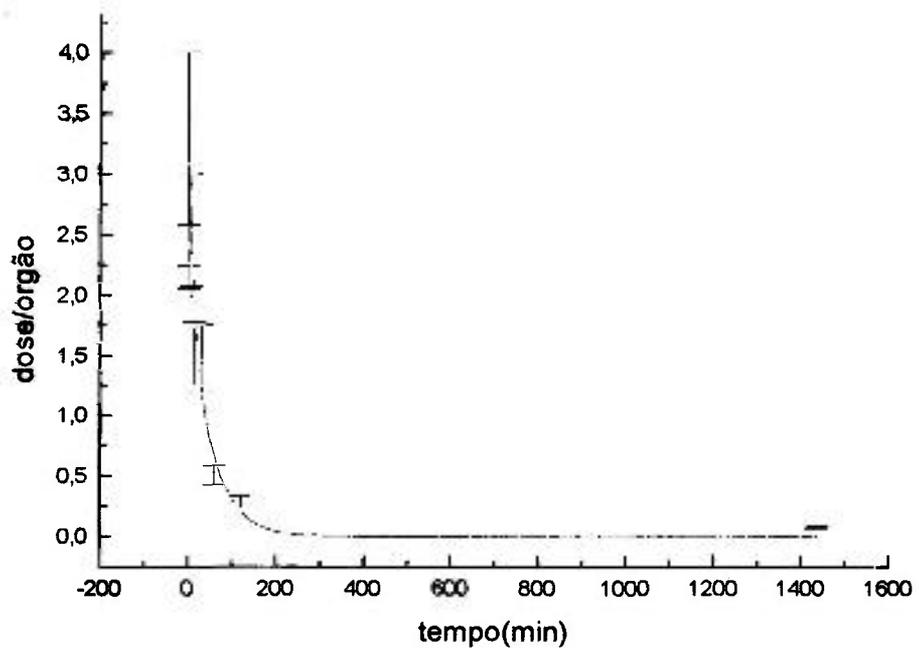


FIGURA 4.8 - Curva que expressa a porcentagem da dose administrada presente no coração em função do tempo (minuto).

4.2- Imagens Cintiligráficas em Cães

As imagens foram adquiridas e observadas de 5 em 5 minutos durante um período de 40 minutos.

A figura 4.9 mostra as imagens sequenciais obtidas de 5 em 5 minutos por meio de imagens planares.

Podemos observar na figura 4.10 as imagens feitas do corpo total do cão.

Na figura 4.11, vemos a imagem de captação máxima no coração aos 5 minutos após administração endo venosa do IPPA-¹³¹I.

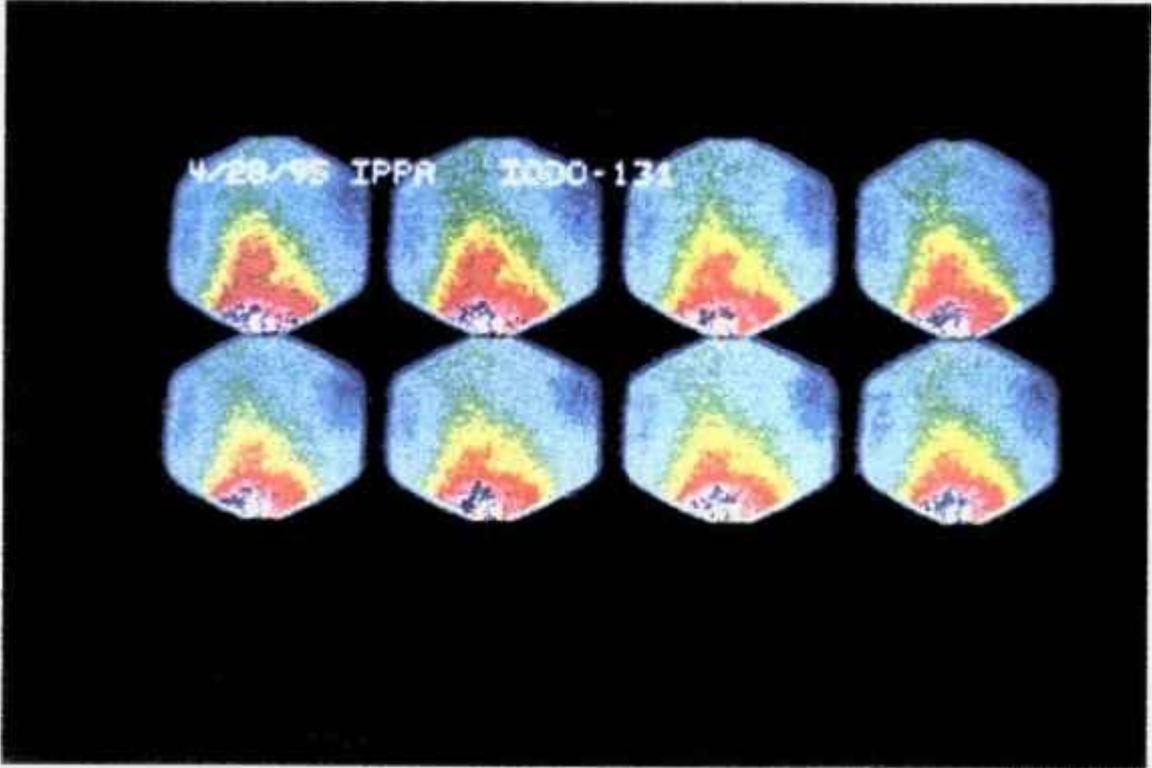


FIGURA 4.9 - imagens cintilográficas sequências em cão

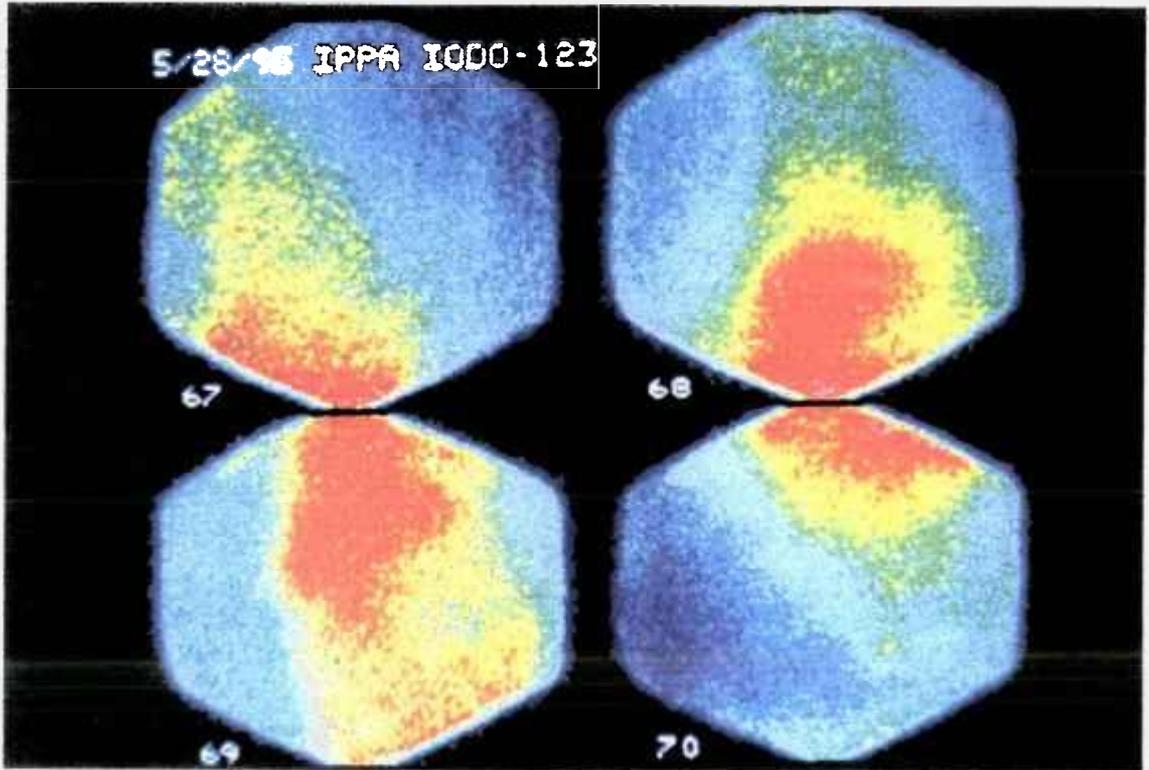


FIGURA 4.10 - Imagem cintilográfica do corpo inteiro do cão.

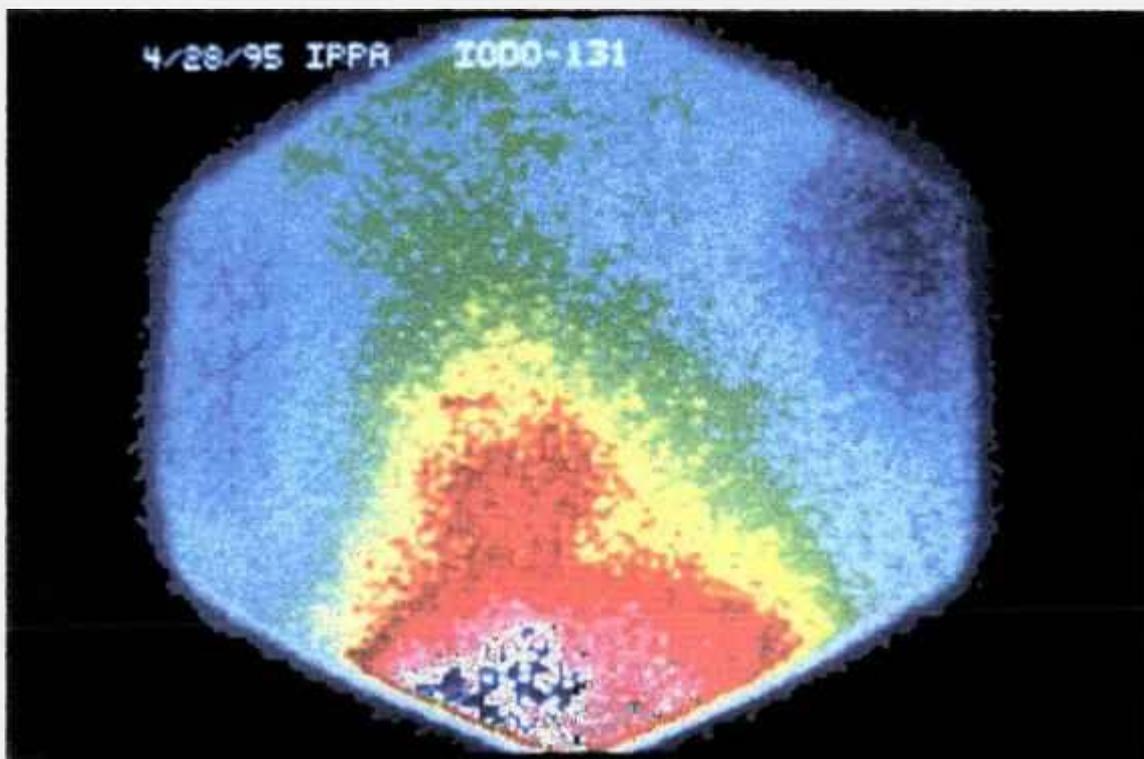


FIGURA 4.11 - Imagem cintilográfica do cão - pico máximo de absorção (5 minutos), após administração endo-venosa do IPPA - ^{131}I .

5- DISCUSSÃO

O desenvolvimento deste trabalho tem por finalidade realizar a marcação do ácido graxo com o radioiodo visando um bom rendimento de marcação e um alto grau de pureza do produto marcado e alta reprodutibilidade da técnica.

Neste trabalho, o método de marcação proposto foi o desenvolvido por Dougan e col. ⁽⁵⁾ o qual se mostrou eficiente para a marcação do ácido graxo IPPA com ^{123/131}I. Não procuramos avaliar outros métodos pois o escolhido era simples, de fácil manipulação e apresentava bons resultados.

Para a marcação de ácidos graxos um dos principais problemas foi a dissolução deste sal antes da reação. No método proposto por Dougan e col ⁽⁵⁾ utiliza-se a solução de TDP (tween 80, dextrose e propanodiol) para a dissolução do IPPA, que mostrou-se adequada não alterando suas propriedades além da sua completa dissolução. Outra vantagem apresentada pelo TDP é que além de ser um emulsificador suave também poderia ser injetado em pacientes.

A preocupação de estudar outros meios de dissolução do IPPA foi também questionada, mas ao se avaliar vários métodos proposto por vários autores onde utilizaram principalmente metanol e ácido sulfúrico para a dissolução e reação do IPPA percebeu-se que estes solventes poderiam causar a esterificação do IPPA. ^(21,23)

De início a marcação foi realizada como descrita pelos autores, sem nenhuma alteração. Analisando os resultados podemos notar que a pureza radioquímica bem como o rendimento de marcação foi bem abaixo daqueles obtidos pelos autores e também dos resultados desejáveis, onde 80-89% de pureza radioquímica indica que há uma grande porcentagem de ^{131}I livre. Os resultados podem ser confirmados pelo espectro de CLAE apresentado na figura 4.3.

Para melhorar a pureza radioquímica e os rendimentos de marcação foi realizada a otimização das condições de marcação alterando-se dois parâmetros, tempo e temperatura de reação.

A princípio tentamos avaliar a possibilidade de diminuir o tempo de marcação utilizado por Dougan e col. ⁽⁵⁾ obtivemos bons rendimentos de marcação com 30 minutos de reação, como pode ser observado na Figura 4.4.

O tempo de reação para as marcações com ^{123}I , um dos radioisótopos mais utilizados, é um dos parâmetros que deve ser avaliado uma vez que, o tempo de meia vida é relativamente curto de 13,3 horas.

Na produção do ^{123}I uma das reações mais utilizadas para a produção de rotina é a que utiliza o alvo enriquecido de ^{124}Te , $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$. Além do ^{123}I obtido desta reação há presença de uma porcentagem de ^{124}I que não deve ultrapassar acima de 1% pois este radioisótopo quando presente acarreta a produção de imagens de qualidade inferior devido a alta energia de 603 KeV e

tempo de $\frac{1}{2}$ vida de 4,3 dias; provocando também altas doses de radiação ao paciente. ^(24,25,29)

Em nosso Instituto desenvolveu-se um trabalho onde definiu-se que para se obter um ^{123}I de qualidade para uso *in vivo*, o mesmo teria de ser utilizado até 21 horas após a irradiação do alvo e os níveis de ^{124}I deveria permanecer abaixo de 4,5%. ⁽²⁰⁾

Como já mencionado acima os resultados obtidos com 30 minutos de reação foram bons, mas ainda poderíamos melhorar. Portanto resolvemos variar a temperatura de reação juntamente com a diminuição do tempo de reação.

A temperatura de reação torna-se um parâmetro de importante análise uma vez que a marcação do IPPA é realizada pelo método de substituição nucleofílica por troca isotópica, e requer uma fonte energética como o calor para que isso ocorra. ⁽⁸⁾

Associando a temperatura e o tempo de reação observa-se ótimos resultados de marcação, onde à uma temperatura de 120°C em 30 minutos de reação a pureza radioquímica é de 98%.

Os resultados obtidos com temperaturas superiores à 150°C embora esperados como melhores, pois que em várias citações da literatura encontramos que quanto maior a temperatura de reação e menor o tempo, melhor a porcentagem de pureza radioquímica. Em nosso trabalho este tipo de

resultado não foi conseguido, e 92% de pureza radioquímica foi obtida com 150°C / 30 minutos . Nestas condições seria necessário uma etapa de purificação em resina, diminuindo desta forma o rendimento de marcação.

Cabe lembrar que temperaturas abaixo de 100°C não foram avaliadas devido ao IPPA ter ponto de fusão de aproximadamente 94,5°C.⁽³¹⁾

Os compostos aromáticos halogenados, como é o caso do IPPA, são relativamente inertes a substituição nucleofílica, a menos que sejam ativados pela presença de grupos separadores de elétrons como metais e complexos metálicos.⁽⁸⁾

Os sais de cobre utilizados neste método de marcação (Cu II) na presença de excesso de agente redutor, como o ácido ascórbico ou cloreto estanoso, tem por finalidade produzir CuI *in situ* permitindo a formação do complexo intermediário aromático-Cu-iodo que facilita a troca isotópica nucleofílica, ou seja, a troca de I por $^{*}I$.^(6,8,16)

Para a avaliação dos resultados obtidos utilizou-se o método de CLAE e a cromatografia ascendente em papel. Tais sistemas cromatográficos foram testados tanto para o radioiodo como para o sal IPPA.

O emprego da técnica de cromatografia ascendente em papel para a determinação da porcentagem radioquímica é analisada com cautela pois nem sempre separa todas as espécies radioquímicas presentes na marcação. A

utilização de CLAE é necessária para os estudos de padronização das condições de marcação.

Em nossos estudos verificou-se que a cromatografia ascendente em papel separou as espécies radioquímicas presentes com resolução adequada, quando comparada ao CLAE. Portanto, esta pode ser a técnica de controle radioquímico de escolha para uso rotineiro deste radiofármaco.

Após se estabelecer as condições ideais para a marcação avaliou-se a estabilidade do produto marcado.

A estabilidade do IPPA marcado foi avaliada do 1º dia até 7º dia de marcação. Com base nos resultados obtidos tanto pela cromatografia ascendente em papel como pela CLAE nota-se que as únicas espécies encontradas foram a do iodo radioativo e a da substância marcada, permanecendo com a mesma pureza radioquímica do 1º ao 7º dia.

Uma vez definidas as condições de marcação deu-se continuidade aos estudos de biodistribuição biológica do IPPA-¹³¹I em camundongos, o que possibilitou viabilizar o grau de seletividade do composto por órgãos e tecidos afins.

Em nossos experimentos biológicos realizados com camundongos, podemos observar no tempo 1 minuto tem-se o pico máximo da captação no músculo cardíaco de 23,63% da dose administrada de IPPA - ¹³¹I por grama,

Este resultado é comprovado por vários autores que em camundongos demonstram que aos 2 minutos ou menos tem-se a absorção máxima no coração.⁽¹⁹⁾

Machulla e col.⁽¹⁸⁾, observaram que a absorção do IPPA pelo tecido cardíaco não depende do tipo de radiohalogênio (I,Br), mas da posição da substituição no anel benzênico. Os resultados demonstrados por estes autores indicam que a captura do ácido graxo pelo tecido do miocárdio depende principalmente do efeito estérico. A influência fisiológica da polaridade da cadeia causada pela introdução do halogênio pode ser resultado do efeito mesomérico do halogênio ligado a compostos aromáticos.⁽⁴⁾

Em relação aos resultados apresentados, nota-se que a 1 minuto após a administração da dose de IPPA - ¹³¹I temos 7% da dose presente no sangue por ml (tabela 4.4). Estes resultados foram obtidos e apresentados por Machulla e col.⁽¹⁸⁾, em experimentos realizados em camundongos.

Para calcular a porcentagem da dose administrada em relação ao sangue total do animal bem como a porcentagem presente no músculo do animal, utilizou-se dos dados observados por Kung, F.H e col⁽¹⁴⁾, onde demonstraram que o sangue equivale a 7% do peso corpóreo do animal. Estes cálculos permite-nos chegar a valores compatíveis aos órgãos complexos.

O IPPA - ¹³¹I administrado endovenosamente é rapidamente clareado da circulação (figura 4.7), apresentando 1 minuto $22,09 \pm 0,09$ % da dose administrada.

O radiofármaco apresenta um decaimento sanguíneo mais lento após 1 minuto; supõem-se que deva ser devido aos metabólitos, que após o processo de β - oxidação permanecem mais tempo na circulação ($22,09 \pm 2,50$ % e $15,09 \pm 0,61$ %, 1 e 15 minutos respectivamente).

No organismo, encontra-se ainda retido cerca de quase 60% (15 minutos) da dose administrada que por degradação enzimática esta atividade reduz para aproximadamente 20% após 120 minutos. Isto indica que o radiofármaco foi eliminado praticamente por via renal, uma vez que no decorrer de todo estudo a atividade presente nos intestinos não excedeu à 2,55% em 120 minutos.

Podemos observar também que a taxa da relação coração / sangue (3,06 em 1 minuto e 2,81 em 2 minutos) bem como a relação do coração / músculo (16,18 em 1 minuto e 12,78 em 2 minutos) indica um favoritismo para o coração, isto é, seu valor elevado satisfaz o critério de qualidade do IPPA - ^{131}I como um bom radiofármaco para detecção do miocárdio.

Os resultados obtidos na distribuição biológica do radiofármaco em camundongos, evidenciaram que além do miocárdio, o fígado é um importante local de β - oxidação de ácidos graxos. Portanto, a atividade presente no fígado, um órgão não alvo para este estudo, é explicada e confirmada por resultados expressos na literatura comparando com nossos resultados(tabela 2 e 3).⁽¹⁸⁾

Um fator que poderia limitar a utilização dos ácidos graxos radioiodados é o fato da metabolização dos compostos pela célula do miocárdio e do tecido hepático. Esta rápida metabolização via β - oxidação acarreta em altos níveis de radioatividade sanguínea. ⁽²³⁾

A vantagem de se utilizar ácidos graxos insaturados como o IPPA, não alifáticos como o IHA, é evitar níveis altos de atividade sanguínea não havendo a necessidade de correção sanguínea apresentada por vários autores. A atividade presente na circulação sanguínea é proveniente dos metabólitos, sendo uma pequena fração representada pelo radioiodeto livre. ^(18,20,22,26)

Todo radioiodeto liberado catabolicamente é acumulado no estômago e na glândula da tireóide. A administração do IPPA-¹³¹I resulta em baixos níveis de radioatividade nestes órgãos, ao redor de 1-2% da dose administrada por grama de tecido (tabela 2), sem nenhuma alteração durante o período do estudo, mostrando que há pouca liberação de iodo livre. ⁽¹⁸⁾

As imagens planares em projeções anteriores, iniciaram-se logo após administração da dose de IPPA-¹³¹I e foram observadas de 5 em 5 minutos durante um período de 40 minutos. Observou-se uma captação satisfatória no músculo cardíaco constatando que este radiofármaco é adequado para cintilografias do miocárdio.

No referente ao fígado, houve uma captação considerável mas que não interfere nas imagens obtidas do coração.

6- CONCLUSÃO

A marcação do IPPA com ^{131}I após os estudos de otimização das condições de marcação, foi considerada adequada para uso na rotina.

A análise por CLAE permitiu identificar as espécies radioquímicas presentes, o ^{131}I e o IPPA - ^{131}I . A cromatografia ascendente em papel foi realizada juntamente com a CLAE; isto possibilitou padronizar a cromatografia ascendente em papel como técnica de rotina sendo eficiente e de baixo custo.

Os estudos de distribuição biológica do produto marcado determinou um rápido clareamento sanguíneo do composto. Além de uma captação satisfatória do IPPA - ^{131}I no coração.

Os níveis baixos de radioatividade no estômago e na glândula da tireóide nos permitiu afirmar a estabilidade do IPPA - ^{131}I *in vivo*.

As imagens cintilográficas obtidas do cão confirmam a permanência curta mas adequada no coração do IPPA - ^{131}I , permitindo à identificação do músculo cardíaco.

Podemos concluir que o ácido graxo marcado com ^{131}I mostrou bons resultados que o introduziriam aos ensaios realizados pela classe médica em cintilográficas do miocárdio. Estudos posteriores seriam necessários uma vez que o ^{123}I é o radioisótopo de escolha para imagens em gama cameras.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO, J. L. Q. **Final Report of the fellowship in the KERNFORSCHUNGSALASE GmbH (GERMANY)**, during the period of 09 August till 17 December, 1982.
2. COENEN, H. H.; HARMAND, M. F.; KLOSTER, G. AND STOCKLIN, G. 15 - (p -(⁷⁵ Br) Bromophenyl) Pentadecanoic Acid: Pharmacokinetics and Potential as Heart Agent. *J. Nucl. Med.* 22: 891-896, 1981.
3. COUNSELL, R. E.; KORN, N. Biochemical and Pharmacological Rationales in Radiotracer Design. In: COLOMBETTI, L. G., ed. **Principles of Radiopharmacology**. Volume I, , 1988, p. 189-213.
4. DEWANJEE, M. K. Function of Muscle Cells and Myocardial Imaging. In: COLOMBETTI, L. G., ed. **Principles of Radiopharmacology**. Volume III, , 1988, p. 66-69.
5. DOUGAN, H.; LYSTER, D. M. AND VINCENT, S. Efficient Production of 15-(para-(¹²³I) iodophenyl) Pentadecanoic Acid. *Appl. Radiat. Isto.*, vol.37, n°8, pp 919-921, 1986.
6. EERSELS, J. L. H.; CRISTEN, F. G. J.; ENSING, G. J.; HERSCHEID, J. D. M. A simple and efficient method to remove free radioiodide from - *I - radiopharmaceuticals. *Eur. J. of Nucl. Med.* 22: 1185-1186, 1995.

7. EISSENHUST, M.; LEHMANN, W. D. AND SUTTERLE, A. Metabolism of 15-(4'-[¹²³I]iodophenyl) pentadecanoic Acid ([¹²³I]IPPA) in the Rat heart; Identification of new metabolites by high pressure liquid chromatography and fast atom bombardment - mass spectrometry. **Nucl. Med. Biol.**, Vol.20, nº6, pp 747-754, 1993.
8. GODOY, N.; REVECO, P.; MENA, P. Y GIL, M. C. Síntesis de Marcación y Biodistribución de N-Isopropil ¹³¹I-p-iodoanfetamina (¹³¹IAMP). **Comisión Chilena de Energía Nuclear Nucleotécnica**, año 6, nº10, abril 1986.
9. GUYTON, A. C. Músculo Cardíaco; o coração como Bomba. In: GUYTON, A. C. ed. **Tratado de Fisiología Médica.**, 1987, p. 143-157.
10. HRADILEK, P.; KRONROD, L.; BECICOVÁ, M.; PERESZLENYOVÁ, E.; KASALICKY, J. Radioiodinated Fatty Acids for Myocardial Scanning. **J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters** 144/ 2/ 151-161/1990.
11. KAISER, K. P.; GEUTING, B.; GROßMANN, K.; VESTER, E.; LOSSE, B.; ANTAR, M.A; MACHULLA, H. -J.; AND FEINENDEGEN, L. E. Tarcer Kinetics of 15-(ortho-^{123/131} I-phenyl)-pentadecanoic Acid (oPPA) and 15-(para-^{123/131} I-phenyl)-pentadecanoic Acid (pPPA) in Animals and Man. **J. Nucl. Med.** 31: 1608-1616, 1990.
12. KNAPP, F. F.; KROPP, J. Iodine-123-labelled fatty acids for myocardial single-photon emission tomography: current status and future perspectives. **Eur. J. Nucl. Med.** 22: 361-381, 1985.

13. KNAPP, Jr, F. F.; RESKE, S. N.; AMBROSE, K. R.; KROPP, J.; KOHLEN, S.; KOLKMEIER, J.; GOODMAN, M. M.; CUNNINGHAM, E. B. Formation of Polar Products from Radioiodinated 15- (p - Iodophenyl - 3 - (R,S-)Methylpentadecanoic Acid (BMIPP) by Isolated Langendorff Rat Hearts. **Nuc. Compact**, 21: 133-138, 1990.
14. KUNG, H. F.; TRANSPORSCH, M. AND BLAU, M. A new Brain Perfusion Imaging Agent: [I-123] HIPDM : N, N, N' - Trimethyl - N' - (2-hydroxy-3-Methyl-5-iodobenzyl)-1,3-Propanediamine. **J. Nucl. Med.** 24: 66-72, 1983.
15. LEVER J. R. Radioiodinated Compounds. In: BUCHANAN, W. S. ed. **Principles of Nuclear Medicine**, 1995, p. 199-213.
16. LINDLEY, J. Tetrahedron Report Number 163 Copper Assisted Nucleophilic Substitution of Aryl Halogen. **Tetrahedron** Vol. 40, n°9, pp 1433-1456, 1984.
17. MACHULLA, H. -J. Radioactive Labeling of Fatty Acids for Metabolic Studies. In: LAMBRECHT, R. M.; MORCOS, N. ed. **Applications of Nuclear and Radiochemistry**. New York, 1982, p. 325-341.
18. MACHULLA, H. -J.; DUTSCHKA, K.; BEUNINGEN, D. V.; CHEN, T. Developmente of 15-(p-¹²³I-phenyl)Pentadecanoic Acid for in-vivo diagnosis of the myocardium. **J. Radioanal. Chem.** 65, 279-286, 1981.
19. MACHULLA, H. -J.; KNUST, E. J. Recent Developments in the field of ¹²³I-radiopharmaceuticals. **Nucl. Med.** 23: 111-8, 1984.
20. MACHULLA, H. -J.; KNUST, E. J.; VYSKA, K. Radioiodinated Fatty Acids for Cardiological Diagnosis. **Appl. Radiat. Isot.** vol. 37, n°8, pp 777-788, 1986.

21. MACHULLA, H. -J.; KNUST, E. J.; VYSKA, K.; WOLF, M. Effects of Propionic Acid and 2-Br. Palmitic Acid on uptake of fatty acids in heart tissue of mice. J. Radioanal. **Nucl. Chem.**, Lettres 136/4/247-256, 1989.
22. MACHULLA, H. -J.; MARSMANN, M. AND DUTSCHKA, K. Biochemical Concept and Synthesis of a Radioiodinated Phenylfatty Acid for in vivo Metabolic Studies of the Myocardium. **Eur. J. Nucl. Med.** , 171-173, 1980.
23. MACHULLA, H. -J.; MARSMANN, M.; DUTSCHKA, K. Synthesis of Radioiodinated Phenylfatty Acids for studying Myocardial Metabolism. **J. of Radioanal. Chem.**, vol.56, nº1-2, 253-261, 1980.
24. MAHUNKA, I.; ANDÓ, L.; MIKECZ, P.; TCHELTSOV, A. N.; SUVOROV, I. A. Iodine - 123 Production at a small Cyclotron for Medical Use. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, Letters 213 (2) 135 - 142, 1996.
25. MESTINIK, S. A. C.; MENGATTI, J.; NIETO, W.; YANAGAWANA, S. I.; SUMIYA, L. C. A.; SILVA, C. P. G.; OSSO Jr, J. A. Production of ¹²³I using the CV-28 Cyclotron at IPEN - CNEN / SP. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, Letters 175(2) 75-80, 1993.
26. OTTI, C. A; BROWN, L. E.; WIELAND, D. M. AND BEIERWALTES, W. H. Radioiodinated Fatty Acids for myocardial Imaging: Effects of Chain Length. **J. Nucl. Med.** 22: 613-618, 1981.
27. SATO, M. K. - **Síntese, marcação e estudos biológicos do ácido 16-¹³¹I-hexadecanoico para cintilografias do miocárdio.** São paulo, 1988. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / CNEN - USP.
28. SEEVERS, R. H.; COUNSELL, R. E. Radioiodinated Tcheniques for Small Organic Molecules. **Chem. Rev.** 82, 575-590, 1982.

29. STOCKLIN, G. Bromine-77 and Iodine-123 Radiopharmaceuticals. *Int. j. of Appl. Radiation and Isotopes*, vol. 28, pp 131-147, 1977.
30. STOCKLIN, G.; QAIM, S. M. AND ROSCH, F. The Impact of Radioactivity on Medicine. *Raciochemica Acta* 70/71, 249-272, 1995.
31. VERBRUGGEN, R. F. Preparation of 15-(p-(¹²³I) iodophenyl) Pentadecanoic Acid and 15-(p-¹²³I) iodophenyl)-3-Methyl pentadecanoic Acid by means of Sn. *Appl. Radiat. Isto*. Vol. 39, n°10, pp 1097-1098, 1988.
32. WACKERS, F. J. Th. The maze of myocardial perfusion imaging protocols in 1994. *J. Nucl. Cardiology*, vol. I, number 2, 180-188.