



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**MARCAÇÃO DO IOMAZENIL COM 123/131 IODO PARA
USO COMO NEUROTRAÇADOR EM
MEDICINA NUCLEAR**

MARIANE FONSECA PETRONI

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

**Orientadora:
Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva**

**São Paulo
2002**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**MARCAÇÃO DO IOMAZENIL COM 123/131 IODO PARA
USO COMO NEUROTRAÇADOR EM MEDICINA
NUCLEAR**

MARIANE FONSECA PETRONI



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

Orientadora

D^{ra} Constancia Pagano Gonçalves da Silva

São Paulo

2002

Aos meus pais, *in memoriam*.

**Marino, que me mostrou o caminho a seguir
e que está sempre comigo.**

**Alcina, que com sua firmeza de espírito,
foi a mão que sempre me guiou.**

Ao meu irmão, Alexandre.

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente Dr. Cláudio Rodrigues pela oportunidade de desenvolver este trabalho.
- À D^{ra} Constancia Pagano Gonçalves da Silva, gerente do Centro de Radiofarmácia, pela orientação, constante apoio e grande amizade.
- À D^{ra} Nilda P. S. de Pereira, chefe da Divisão da Garantia da Qualidade do Centro de Radiofarmácia pela inestimável colaboração e amizade em todas as fases deste estudo.
- Ao Msc. Jair Mengatti, chefe da Divisão de Produção do Centro de Radiofarmácia, pelo apoio e oportunidade no desenvolvimento deste trabalho.
- À D^{ra} Emiko Muramoto pela colaboração na realização dos ensaios biológicos.

- À Msc. Marycel F. Barboza, que me introduziu nesta área, pelo constante apoio, amizade durante todo o período de realização deste trabalho.
- A todos os colegas, funcionários técnicos e administrativos, que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.
- Aos colegas e amigos da Farmácia do Instituto da Criança do HC/FMUSP, representados por D^{ra} Cleide Harue Maluvayshi e D^f José Antônio Fonseca dos Santos. O meu muito obrigada pelo apoio na difícil fase de conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	1
Abstract.....	3
1. Introdução.....	5
2. Objetivos.....	12
3. Parte Experimental.....	13
3.1 Materiais	13
3.1.1 Reagentes e Soluções.....	13
3.1.2 Equipamentos	14
3.1.3 Animais.....	15
3.1.4 Outros.....	15
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Caracterização do Precursor do Iomazenil.....	16
3.2.2 Perfil Cromatográfico do Precursor.....	16
3.2.3 Marcação do Iomazenil do $^{123/131}\text{I}$	17
3.2.4 Otimização das condições de análise por cromatografia em camada delgada para avaliação da pureza radioquímica do produto.....	18
3.2.5 Determinação da Pureza Radioquímica	19
3.2.6 Otimização das condições de marcação	21
3.2.7 Estudo de estabilidade do produto marcado <i>in vitro</i>	22
3.2.8 Avaliação da reação otimizada de marcação com ^{123}I -IEN- CNEN/RJ	23
3.2.9 Avaliação da reação otimizada de marcação com ^{123}I -IPEN- CNEN-SP	24
3.2.10 Ensaio Biológicos	25
3.2.10.1 Distribuição Biológica – Ensaio I	25
3.2.10.2 Distribuição Biológica – Ensaio II	26
3.2.10.3 Captação Cerebral.....	28
4. Resultados	29
4.1 Caracterização do Precursor do Iomazenil	29
4.1.1 Análise elementar	29
4.1.2 Espectrofotometria de absorção no infravermelho	29
4.1.3 Perfil cromatográfico do bromoprecursor obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
4.1.4 Otimização das condições de análise para cromatografia em camada delgada para avaliação da pureza radioquímica do produto	34
4.2 Reação de Marcação	35

4.2.1 Otimização das condições de marcação	35
4.2.2 Avaliação da reação de marcação com ^{123}I IEN-CNEN/RJ...	40
4.2.3 Avaliação da reação de marcação com ^{123}I IPEN-CNEN/SP	43
4.2.4 Estabilidade do produto marcado	44
4.3 Estudos biológicos	45
4.3.1 Distribuição Biológica - Ensaio I	45
4.3.2 Distribuição Biológica – Ensaio II.....	46
4.3.3 Captação Cerebral.....	51
5. Discussão	53
6. Conclusão	61
7. Bibliografia	63

MARCAÇÃO DO IOMAZENIL COM ^{123}I / ^{131}I IODO PARA USO COMO NEUROTRAÇADOR EM MEDICINA NUCLEAR

MARIANE FONSECA PETRONI

Resumo

O Iomazenil, um benzodiazepínico análogo ao Flumazenil, foi marcado com ^{123}I e ^{131}I para possibilitar investigações por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) de receptores benzodiazepínicos centrais em cérebros humanos.

Inicialmente, o precursor químico do iomazenil (bromobenzodiazepina), foi caracterizado por: Análise Elementar, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho. Estabeleceu-se também, o perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE).

Com a finalidade de otimizar os parâmetros da reação de marcação do iomazenil, inicialmente utilizou-se o ^{131}I .

Os seguintes parâmetros foram estudados: temperatura, tempo, massa de precursor e atividade.

Utilizando-se as condições de reação de marcação preconizadas pela literatura, otimizaram-se as condições de análise por Cromatografia em Camada Delgada avaliando-se diversos suportes cromatográficos. Desta análise, concluiu-se que o suporte proposto pela literatura⁽¹³⁾, é o mais adequado.

Uma vez estabelecidas as condições otimizadas da reação de marcação e determinação da pureza radioquímica, foram realizados os estudos de estabilidade do produto marcado com ^{131}I .

Em seguida, foram avaliadas soluções de ^{123}I provenientes de duas procedências: ^{123}I – IEN – CNEN/RJ e ^{123}I – IPEN – CNEN/SP, sendo que este último revelou resultados satisfatórios.

Deram-se então, os ensaios biológicos utilizando-se o iomazenil marcado com ^{131}I .

Foram realizados os seguintes ensaios: toxicidade, distribuição biológica em camundongos e captação cerebral.

Estes estudos indicaram que o produto marcado é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, possibilitando a obtenção de imagens de receptores benzodiazepínicos cerebrais.

MARCAÇÃO DO IOMAZENIL COM 123/131 IODO PARA USO COMO NEUROTRAÇADOR EM MEDICINA NUCLEAR

MARIANE FONSECA PETRONI

Abstract

Iomazenil, a benzodiazepine analogue of Flumazenil, was labeled with ^{131}I and ^{123}I to enable SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) investigations of central benzodiazepine receptors in human brain.

First, the bromoprecursor was characterized by means of elemental analysis and infrared spectrophotometry.

The chromatography of this chemical was performed by means of HPLC-High Performance Liquid Chromatography.

In order to optimize the labeling parameters of the Iomazenil, Iodine ^{131}I was first used.

The following parameters were investigated: temperature, time period, amount of precursor and radioactivity.

The labeling parameters described in the literature ⁽¹³⁾ were used during this study.

Several chromatograms were evaluated; as a result, the chromatogram proposed by the literature ⁽¹³⁾ achieved the best performance.

After the establishment of the best labeling parameters and the determination of the radiochemical purity, the stability of the ¹³¹I-Iomazenil was studied.

Studies using ¹²³I solutions from IEN/CNEN and IPEN/CNEN, were done and the last one showed the best result.

Biological investigations were done using iomazenil labeled with ¹³¹I.

Toxicity, biological distribution and cerebral uptake in mice were evaluated.

This study showed that this labeled product cross the blood brain barrier, allowing benzodiazepine brain receptor imaging.

1. Introdução

Em 1878 Langley postulou a existência, nos tecidos, de substâncias envolvidas na resposta a agentes farmacológicos⁽¹⁾. Estas substâncias são moléculas de proteínas ou glicoproteínas localizadas na superfície da membrana celular e atualmente, são conhecidas como receptores e amplamente aceitos como responsáveis por mediar a ação entre neurotransmissores, fármacos e constituintes celulares a fim de que seja produzida uma resposta farmacológica⁽²⁾.

Em outras palavras, é necessário que as moléculas dos fármacos fiquem ligadas às proteínas de membrana para que o funcionamento destas seja alterado.

Portanto, as moléculas de um fármaco precisam estar ligadas a constituintes especiais das células a fim de que haja resposta.

O entendimento da natureza desses sítios de ligação, bem como dos mecanismos pelos quais a associação de uma molécula de um fármaco com um sítio de ligação leva a uma resposta fisiológica, constitui o maior objetivo da pesquisa farmacológica.

Quatro tipos de proteínas estão normalmente envolvidas como alvos primários: enzimas, moléculas transportadoras, canais iônicos, receptores.

Sabe-se que alguns outros tipos de proteínas funcionam como alvos para os fármacos, e deve ser lembrado que existem muitos fármacos cujos sítios de ação ainda não foram analisados em detalhe.

Assim, o termo receptor tende a ser usado de modo abrangente. Entretanto, alguns autores o usam para referir-se a qualquer molécula-alvo com a qual um fármaco deve combinar-se a fim de provocar seus efeitos específicos.

Desta forma, em farmacologia, é mais apropriado reservar o termo receptor para interações do tipo reguladora, onde o ligante pode funcionar como agonista (ativando o receptor) ou como antagonista⁽³⁾.

Para que um fármaco seja de algum modo útil tanto como instrumento terapêutico quanto diagnóstico, ele deve agir seletivamente. Em outras palavras, deve mostrar um alto grau de seletividade de ligação ao sítio.

O principal impulso da pesquisa farmacológica, recentemente, tem sido caracterizar, em termos moleculares, o sítio de ação primário de diferentes fármacos⁽⁴⁾.

Com os avanços tecnológicos ocorridos no final do século passado e início deste século, tem sido possível caracterizar bioquimicamente a estrutura de uma variedade de receptores, assim como estudar suas interações com agentes farmacológicos, neurotransmissores e outros.

Usando radiotraçadores específicos e técnicas computadorizadas de aquisição de imagens, é possível ‘visualizar’ a distribuição de diversos receptores^(5,6).

Os radiofármacos específicos devem ser seletivos no perfil de ligação de seu receptor, serem captados rapidamente pelo órgão alvo e permanecer metabolicamente estável no sítio de ligação por um tempo adequado, para permitir a aquisição de imagens ou de informações confiáveis e precisas sobre o receptor.

Estes princípios têm sido atualmente aplicados para permitir a visualização e medição da função neuroreceptora *in vivo* utilizando-se PET (Tomografia por Emissão de Pósitron) e SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único)⁽⁷⁾.

Esta técnica fornece o único meio de investigar anormalidades neuroquímicas em psiquiatria, bem como estudar o mecanismo de ação de substâncias neurolépticas⁽⁸⁾, como os benzodiazepínicos (BZD). Estes são eficientes fármacos ansiolíticos/hipnóticos e sua atividade é mediada via receptores BZD⁽⁹⁾. Os receptores BZD estão acoplados aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), os quais são os maiores receptores inibitórios no cérebro⁽⁹⁾.

Estudos sistemáticos têm sugerido diversas anormalidades do GABA e nos complexos receptores BZD/GABA e tais alterações podem estar presentes

em condições neuropsiquiátricas como esquizofrenia, epilepsia, ansiedade, insônia dentre outras^(6,12).

Em um número significativo de estudos realizados com animais identificou-se um papel importante para o sistema GABAérgico, tanto na expressão como no ‘aprendizado’ da ansiedade⁽⁴⁾. Existe um número bem menor de estudos realizados com seres humanos. Atualmente, uma das linhas de pesquisa mais interessantes é o estudo do funcionamento do sistema GABAérgico na ansiedade e nos distúrbios a ela relacionados. Esse tipo de pesquisa tem sido possível graças às mais recentes técnicas de geração de imagem do cérebro, especialmente as já citadas, PET e SPECT. Os estudos sugerem que existe alguma disfunção do sistema GABAérgico em pacientes que sofrem de ansiedade.

Conquanto os princípios básicos que governam a ligação dos fármacos aos receptores, bem como o mecanismo de ação dos antagonistas já tivesse sido relatado há muitos anos, nos anos 60 o processo de ligação foi pela primeira vez estudado diretamente pelo uso de moléculas de fármacos radioativos⁽³⁾.

Tais métodos são amplamente utilizados para a investigação de receptores de diversos tipos. As principais exigências para o método são que o ligante, que pode ser agonista ou antagonista para os receptores que estão sendo estudados, tem que se ligar com alta afinidade e especificidade, não deve apresentar resposta farmacológica e seu tempo de metabolização deve ser compatível com

o tempo de aquisição das imagens. Ainda, o ligante deve ser marcado com um radioisótopo adequado que proporcione uma radioatividade específica suficiente para permitir a medida de quantidade muito pequena de ligação fármaco-receptor.

Esta metodologia também é usada para investigar a distribuição dos receptores em estruturas como o cérebro.

Desde que o flumazenil foi descrito pela primeira vez como potente antagonista benzodiazepínico por Hunkeler e col.⁽¹¹⁾, inúmeros estudos clínicos com este fármaco têm sido realizados. Diversos ensaios com flumazenil marcado com ^3H e ^{11}C em camundongos, ratos, babuínos e voluntários humanos têm demonstrado a seletividade deste fármaco por receptores benzodiazepínicos (13).

Como já citado, anormalidades do sistema GABAérgico estão relacionadas a algumas condições neuropsiquiátricas e alterações na densidade destes receptores têm sido descritas em crises convulsivas em epilepsia, doença de Huntington, doença de Alzheimer, dependência por álcool, encefalopatia hepática e ansiedade; dado que a integridade funcional e a concentração do complexo-receptor benzodiazepínico são fatores de controle importante da função cerebral.

Na década de 80, Schubiger e col.⁽¹³⁾ desenvolveram o iomazenil, um traçador para SPECT marcado com ^{123}I útil na obtenção de imagens de

receptores BZD. Este ligante, um análogo ao flumazenil, é altamente seletivo e demonstra uma afinidade dez vezes superior ao flumazenil marcado com ^{11}C , um agente utilizado em PET.

Westera e col.⁽¹⁴⁾, demonstraram que os parâmetros cinéticos e de biodistribuição do iomazenil – ^{123}I são comparáveis ao flumazenil – ^{11}C , este dado demonstra que o SPECT representa uma alternativa viável em relação ao PET, este de custo mais elevado.

Abi-Dargham e col.⁽¹⁵⁾, investigaram a reprodutibilidade dos dados obtidos por SPECT, examinando por duas vezes seis indivíduos num intervalo de uma semana. Com base na variabilidade de 10-17% dos resultados, concluiu-se que as medidas de captação regional de iomazenil – ^{123}I é um procedimento reprodutível.

Foged e col.⁽¹⁶⁾, citaram o metabolismo rápido deste radiotraçador no plasma em função de um grupamento etiléster presente na molécula do benzodiazepínico. Esta é rapidamente hidrolisada por esterases inespecíficas presentes no sangue; entretanto, a integridade da molécula é mantida por tempo suficiente para a obtenção de imagens no seu sítio de ligação.

O sucesso do mapeamento por PET dos receptores BZD utilizando-se o flumazenil – ^{11}C , a contínua importância dos benzodiazepínicos como agentes ansiolíticos/hipnóticos na prática clínica e a intensa pesquisa básica sobre o papel dos benzodiazepínicos no tratamento de diversas anomalias, torna clara a

importância da marcação do iomazenil com ^{123}I para mapeamentos com SPECT de receptores BDZ/GABA em cérebros humanos⁽¹³⁾. A vantagem do flumazenil (antagonista benzodiazepínico com alta afinidade para o receptor e sem maiores efeitos farmacológicos intrínsecos) como agente mapeador, foi combinada com as propriedades ideais do ^{123}I , um radionuclídeo produzido em ciclotron, com meia-vida curta (13,2 horas), emissor gama baixa energia (159 keV - 83%), para se obter um novo agente mapeador cerebral⁽¹³⁾, o iomazenil - ^{123}I . Além disso, apesar dos equipamentos para SPECT apresentarem menor sensibilidade e resolução, se comparados aos equipamentos para PET, a relativa simplicidade e custos menores dos radioisótopos e equipamentos, torna a SPECT uma técnica mais viável e de grande potencial para aplicações clínicas⁽⁸⁾.

Portanto, iomazenil - ^{123}I é o primeiro traçador para SPECT a ser utilizado em investigações clínicas de receptores benzodiazepínicos. É desejável que ele esteja disponível a neurologistas e psiquiatras a fim de investigar o envolvimento destes receptores em desordens neurológicas, usando um método relativamente acessível e fácil⁽¹³⁾.

2. Objetivos

Tendo em vista a importância do iomazenil – ^{123}I para obtenção de imagens de receptores benzodiazepínicos, este trabalho teve por objetivo:

1. Otimização das condições de marcação do iomazenil com iodo radioativo.
2. Estudos biológicos do radiofármaco em animais de laboratório.

Para alcançar esses objetivos realizou-se:

- estudo de caracterização química do precursor do iomazenil – bromobenzodiazepina (etil-5,6-dihidro-7-bromo-5-metil-6-oxo-4H-imidazo[1,5a][1,4]benzodiazepina-3-carboxilato).
- adequação da metodologia de marcação do iomazenil com ^{131}I e ^{123}I .
- Escolha de técnica conveniente para determinação da pureza radioquímica.

3. Parte Experimental

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e Soluções

- Precursor – bromobenzodiazepina – gentilmente cedido pelo Paul Scherrer Institute/Suíça
- Na¹³¹I – Nordion Canadá
- Na¹²³I – IEN/CNEN-RJ
- Na¹²³I – IPEN/CNEN-SP
- Ácido acético glacial – Merck
- Clorofórmio – Merck
- Hidróxido de amônio – Merck
- Acetato de etila – Merck
- Metanol – Merck
- Solução glicosada 5% - Baxter

Cabe salientar que todos os reagentes apresentam grau analítico. Exceto o metanol – Merck que apresenta grau adequado à cromatografia líquida.

3.1.2. Equipamentos

- Contador Gama Packard Cobra CR-276
- Radiocromatógrafo a gás – Automatic TLC- Linear Analyser
- Cromatógrafo Líquido Waters 600
- Waters 486 Turnable Absorbance Detector
- Coluna Waters μ Bondapak C₁₈ 125 Å 10 μ m 3,9 x 300 mm
- Balança analítica – Denver Instruments M – 220
- Manta de aquecimento – SH – 1 Fe-Co - IPEN
- Calibrador de Dose – Capintec, Inc. – CRC – 35R
- Centrífuga – Hitachi – Himac CF 7D2
- Monitor portátil de radiação 7013 – IPEN
- Câmara de Cintilação – Gamma Technical Co. Ltda Typ. MB 9420

3.1.3. Animais

- Camundongos – *Swiss* – Biotério do IPEN/CNEN – SP
- Ratos – *Wistar* – Biotério do IPEN/CNEN – SP

3.1.4. Outros

- Fitas Acilit[®] - pH 0 – 6 – Merck
- Filtro Millex[®] 0,45 µm - Milipore[®]
- Placas silicagel 60 /vidro – Merck
- Suporte cromatográfico silicagel IB – F – *Baker Flex*
- Suporte cromatográfico silicagel 60 – *aluminum sheets* – Merck
- Suporte cromatográfico ITLC/SG – Gilman Sciences
- Papel cromatográfico Whatman 3 MM
- Frascos de vidro com fundo cônico – Wheaton

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização do precursor do iomazenil

Para avaliação da integridade química do precursor, foram realizados:

- Análise Elementar.
- Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho.

3.2.2. Perfil cromatográfico do precursor

Com o intuito de se estabelecer os parâmetros ideais para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram realizadas diversas análises variando-se o fluxo e parâmetros de atenuação característicos do cromatógrafo e adequados à coluna. Este estudo permitiu a caracterização do perfil cromatográfico do precursor.

O sistema de solventes utilizado foi o preconizado pela literatura⁽¹³⁾: metanol/água (45:55).

3.2.3. Marcação do iomazenil com $^{123/131}\text{I}$

O método de marcação utilizado, foi o de substituição de halogênio a partir de um precursor (bromobenzodiazepina), baseado nos trabalhos de Schubiger e colaboradores⁽¹³⁾.

As marcações foram realizadas em cabine de segurança tipo *glove box* com proteção de chumbo, sistema de exaustão e pressão negativa monitorada por meio de manômetro.

As reações deram-se em recipiente cônico de vidro, hermeticamente fechado com rosca de vedação de teflon, segundo a literatura⁽¹³⁾.

A solução radioativa de iodeto e atividade superior a 55,5 MBq (1,5mCi) conforme literatura⁽¹³⁾, é evaporada á securo; após resfriamento do resíduo obtido, é adicionada uma solução de 1,5mg de bromobenzodiazepina dissolvidos em 100µL de ácido acético glacial. A mistura é então aquecida a uma temperatura de 155°C por 60 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, esta mistura é reconstituída em 10 mL de água bidestilada.

3.2.4. Otimização das condições de análise por cromatografia em camada delgada para avaliação da pureza radioquímica do produto.

Para este estudo, 4 (quatro) tipos de suporte (fase fixa), utilizados em cromatografia em camada delgada, foram avaliados:

- sílicagel/vidro, conforme literatura⁽¹³⁾;
- sílicagel/alumínio;
- sílicagel/plástico (*Baker Flex*);
- papel (*Whatman 3MM*);
- ITLC/SG.

Foram usados os sistemas de solventes preconizados pela literatura⁽¹³⁾:

- sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)
- sistema B clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

3.2.5. Determinação da Pureza Radioquímica

A pureza radioquímica do produto foi avaliada por cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de sílicagel/vidro de 5x20cm, em duplicata, para dois diferentes sistemas de solventes de acordo com a literatura (13).

Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

A amostra a ser analisada, é aplicada cuidadosamente com o auxílio de um capilar de vidro num ponto específico do suporte cromatográfico, distante aproximadamente 2,5 cm de uma das bordas da placa. A placa, é então colocada verticalmente em cubas de vidro contendo previamente o sistema de solventes. Por capilaridade, o solvente percorre toda a placa no sentido vertical, de baixo para cima, separando as espécies químicas de acordo com a polaridade de cada uma delas.

Após o desenvolvimento da cromatografia e subsequente evaporação do solvente, as placas são delicadamente marcadas com lápis em segmentos de 1 cm. Estes são raspados cuidadosamente com auxílio de espátula. O 'pó' de sílicagel obtido de cada segmento é transferido para tubos apropriados para a realização da contagem da radioatividade das amostras num contador gama.

Quando a contagem da radioatividade é realizada num radiocromatógrafo, após a evaporação dos solventes, as placas são diretamente colocadas no aparelho para subsequente varredura automática

Nestas condições, o Rf (fator de retenção) para cada espécie química em cada sistema de solventes é:

- Sistema de solventes A: acetato de etila/NH₄OH (200:1)
Iomazenil marcado = 0,3
Iodeto (I) = 0,0 + outras impurezas
- Sistema de solventes B: CHCl₃/CH₃COOH/H₂O (65:35:5)
Iomazenil marcado = 1,0; Iodeto (I) = 0,04 e
outras impurezas = 0,4

3.2.6. Otimização das condições de marcação

Foram avaliados os seguintes parâmetros de marcação:

- tempo de reação: 15, 30, 45 e 60 minutos.
- temperatura de reação: 120°C, 135°C, 155°C e 170°C.
- massa de precursor: 0,5 mg, 1,0 mg e 1,5 mg
- atividade: 185, 370 e 555 MBq (5, 10 e 15 mCi)

Para cada parâmetro de marcação foram realizados 6 (seis) experimentos.

3.2.7. Estudo de estabilidade do produto marcado *in vitro*.

Este estudo se deu após a otimização das condições de marcação do iomazenil – ^{131}I .

A pureza radioquímica foi avaliada nas 24, 72 e 120 horas após a marcação, por cromatografia em camada delgada conforme capítulo 3.2.5.

3.2.8. Avaliação da Reação Otimizada de Marcação com ^{123}I – IEN – CNEN/RJ.

A solução radioativa, iodeto (^{123}I) em NaOH 0,1N – de procedência IEN-CNEN/RJ, e com atividade de 880 MBq (23,8 mCi) em 0,5 mL, foi evaporada à secura. A seguir adicionou-se uma solução contendo 1,5 mg de bromoprecursor dissolvido em 100 μL de ácido acético glacial. A mistura foi então aquecida a 170°C por 60 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, esta mistura foi dissolvida em 10 mL de água bidestilada. O pH foi medido com fitas indicadoras para faixa de pH entre 0 e 6. A pureza radioquímica do produto foi avaliada por cromatografia em camada delgada conforme capítulo 3.2.5.

A contagem radioativa das amostras foi determinada num radiocromatógrafo a gás.

Iniciaram-se os experimentos com ^{123}I enviado pelo IEN/CNEN – RJ pois na ocasião o IPEN/CNEN – SP não produzia este radioelemento.

3.2.9. Avaliação da Reação Otimizada de Marcação com ^{123}I – IPEN – CNEN/SP.

A solução radioativa, iodeto (^{123}I) em NaOH 0,1N – de procedência IPEN – CNEN/SP e com atividade de 296 – 555 MBq (8,0 - 15 mCi) num volume de 1,0 mL, foi evaporada à secura por dois métodos diferentes que podemos designar por:

- direto: a evaporação da solução radioativa foi realizada no próprio banho no qual se deu a reação, e cuja temperatura foi previamente estabilizada em 170°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$);
- indireto: banho de água a 90°C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), utilizando-se uma manta de aquecimento auxiliar.

Em seguida adicionou-se uma solução contendo 1,5 mg de bromoprecursor dissolvido em 100 μL de ácido acético glacial. A mistura foi então aquecida a 170°C por 60 minutos . Após resfriamento a temperatura ambiente, esta mistura foi dissolvida em 10 mL de água bidestilada. O pH foi medido com fitas indicadoras de pH entre 0 e 6.

A pureza radioquímica do produto foi avaliada por cromatografia em camada delgada conforme capítulo 3.2.5.

3.2.10. Ensaios Biológicos

3.2.10.1. Distribuição Biológica – Ensaio I

Para este ensaio procedeu-se à marcação do iomazenil – ^{131}I otimizada. O produto foi reconstituído com uma solução glicosada a 5% e filtrada através de uma membrana filtrante Millex[®] de 0,45 μm .

A atividade foi ajustada em 1,13 MBq/0,1mL (30,5 μCi /0,1mL). O controle de pureza radioquímica foi realizado conforme capítulo 3.2.5.

O produto foi administrado por via endovenosa na veia caudal em 12 (doze) camundongos fêmeas – *Swiss* – adultas sem utilização de anestesia previa como segue:

- 8 (oito) animais receberam um volume de 0,2 mL – 2,26 MBq (61,1 μCi);
- 4 (quatro) animais receberam um volume de 0,4 mL – 4,52 MBq (122,2 μCi).

Dos animais que receberam 0,2 mL do produto, 3 (três) foram sacrificados 10 (dez) minutos após a administração da dose. Seus órgãos – córtex, cerebelo, tireóide e glândulas salivares – foram retirados e a radioatividade medida num contador gama. Os demais ficaram em observação por 48 horas em gaiolas apropriadas locadas em biotério com temperatura, iluminação e umidade controladas e recebendo alimentação *ad libitum*.

A glândula tireóide dos animais não foi previamente bloqueada.

3.2.10.2. Distribuição Biológica – Ensaio II

Para este ensaio procedeu-se à marcação do iomazenil – ^{131}I otimizada .

O produto foi reconstituído com uma solução glicosada a 5% e filtrado através de uma membrana filtrante Millex[®] de 0,45 μm .

A atividade foi ajustada em 1,35 MBq (36,5 $\mu\text{Ci}/0,1\text{mL}$), pH da solução: $5,5 \pm 0,5$.

O controle de pureza radioquímica foi realizado conforme capítulo 3.2.5.

Administrou-se por via endovenosa um volume de 0,1 mL, 1,35 MBq (36,5 mCi) do produto em veia caudal em 12 (doze) camundongos fêmeas – *Swiss* – adultas, previamente pesadas e devidamente identificadas por números.

Os animais foram divididos em grupos de 3 (três) animais e cada grupo sacrificado num determinado tempo após a administração do produto conforme tabela 3.1.

A glândula tireóide dos animais não foi previamente bloqueada.

Tabela 3.1. Tempo de sacrifício após administração do produto marcado

Animal	Tempo (min.)
1,2 e 3	60
4,5 e 6	30
7,8 e 9	15
10,11 e 12	5

Os seguintes órgãos foram retirados e a radioatividade medida num contador gama: córtex, cerebelo, tireóide, pulmão, coração, fígado, estômago, baço, rins, intestinos, músculo e rabo.

Retirou-se, de cada animal, uma amostra de 1,0 mL de sangue para avaliação da radioatividade sangüínea. As porcentagens de dose administrada presentes nos diversos órgãos e no sangue foram determinadas em relação a um padrão e medidas em contador gama, mantendo-se a mesma geometria e tempos de contagem das amostras.

3.2.10.3. Captação Cerebral

Foram realizadas imagens cintilográficas em ratos machos - *Wistar* – utilizando-se o produto marcado, iomazenil – ^{131}I .

Para este ensaio o produto reacional foi reconstituído em solução glicosada a 5% e filtrado através de uma membrana filtrante Millex[®] de 0,45 μm .

A pureza radioquímica foi avaliada conforme capítulo 3.2.5.

Animal A: este animal teve sua glândula tireóide previamente bloqueada com uma solução de iodeto de potássio a 10%.

Animal B: este animal teve sua glândula tireóide removida cirurgicamente (tireóidectomia) no dia anterior ao ensaio.

Cada animal recebeu por via endovenosa, através de veia peniana, 55,5 MBq (1,5 mCi/mL) do produto.

As imagens foram obtidas a partir do momento da administração até 5 minutos após.

4. Resultados

4.1. Caracterização do precursor do iomazenil

4.1.1. Análise Elementar

Na tabela 4.1 está relacionada, em termos percentuais, a composição do bromoprecursor.

Tabela 4.1. Composição percentual do bromoprecursor

Elemento	experimental(%)	teórico(%)
Carbono	49,7	49,5
Hidrogênio	3,8	3,4
Nitrogênio	12,2	12,2

4.1.2. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho

A Figura 4.1 exibe o espectro no infravermelho do bromoprecursor obtido pelo grupo de Schubiger e colaboradores.

A Figura 4.2 exibe o espectro no infravermelho obtido no laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Dr - Com zochia z. ep. in
Ru - 19-7792.
Stab. - - Kambolle. i. U.
18. 9 96 W. K. K. K.

Ch 5742. 146 c
8901/72 (17) 1189

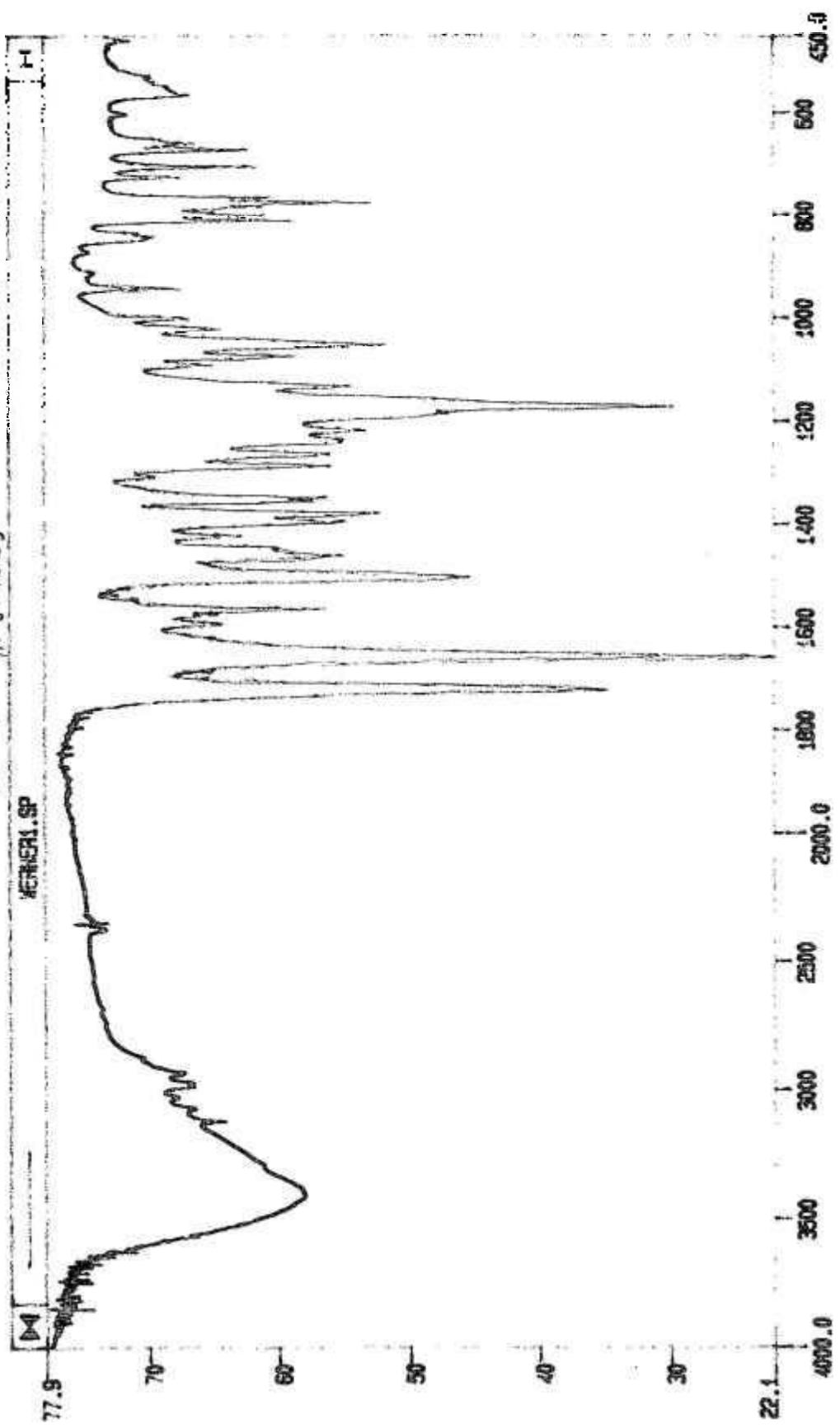


Figura 4.1: Espectro no Infravermelho do bromoprecursor obtido por Schubiger e colaboradores.

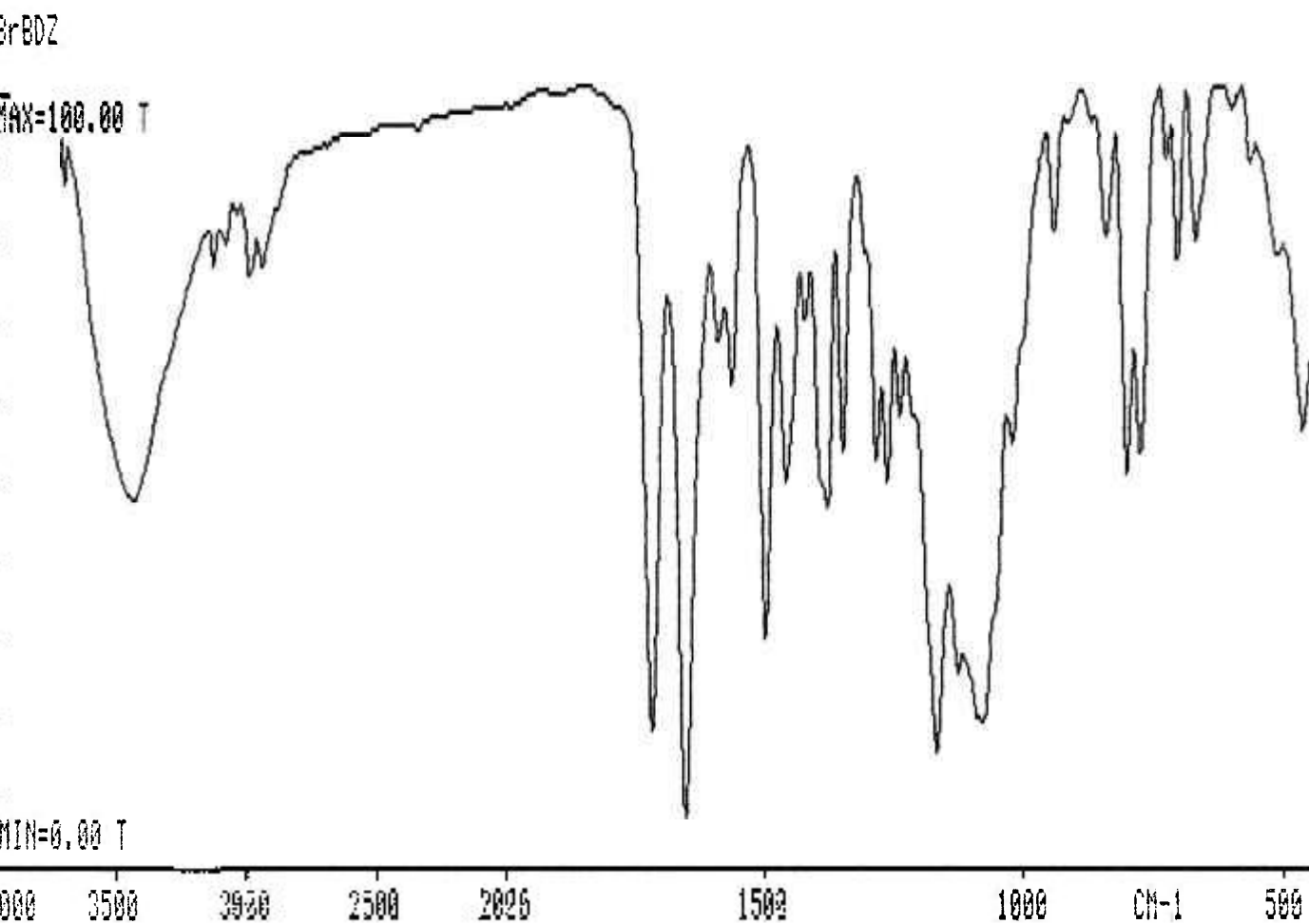


Figura 4.2: Espectro no Infravermelho do bromoprecursor obtido no Laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.1.3. Perfil Cromatográfico do bromoprecursor obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Condições:

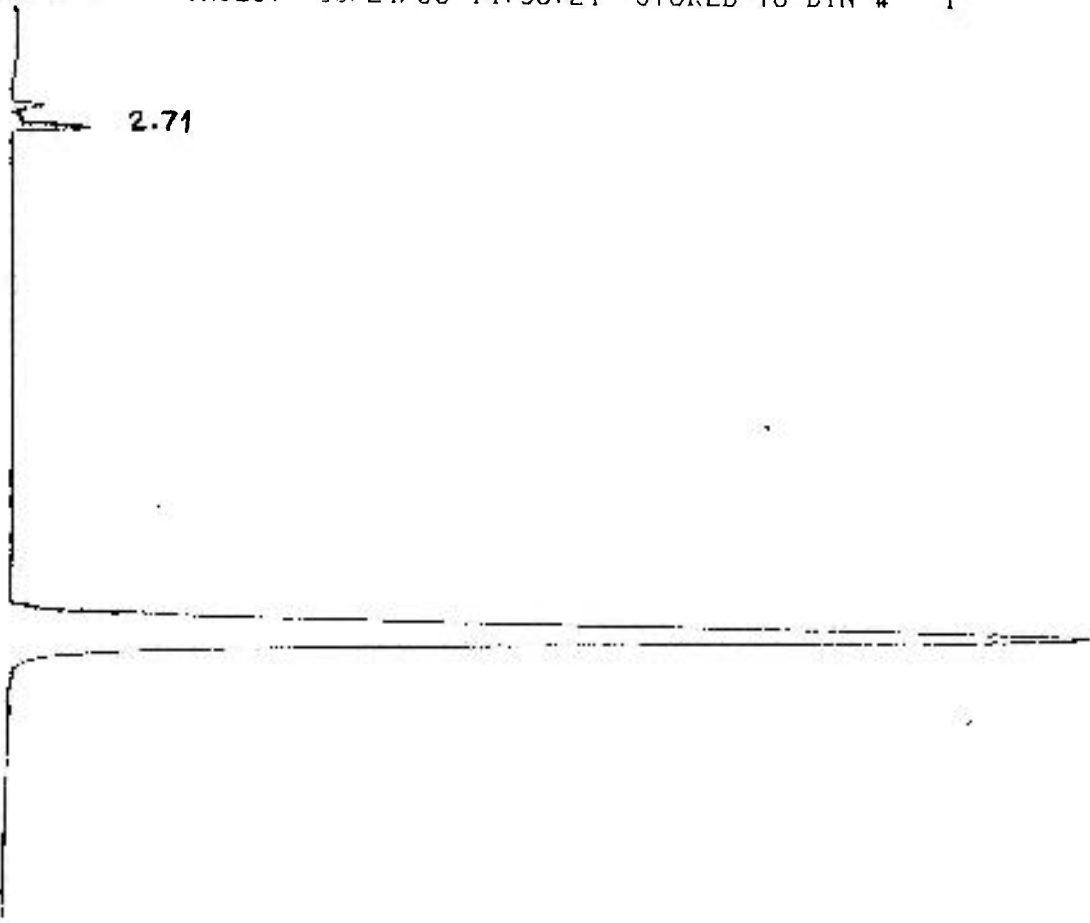
- coluna Waters μ Bondapak C₁₈ 125Å 10 μ 3,9 x 300 mm.
- Fluxo: 1 mL/min.
- 1860 PSI
- sistema de solventes: CH₃OH/H₂O (45:55)
- solução de precursor: 1,5 mg em 100 μ L de ácido acético glacial

O perfil cromatográfico obtido é mostrado na Figura 4.3.

Onde:

- Pico 1 em 1,57 - água (não indicado)
- Pico 2 em 2,71 - ácido acético
- Pico 3 em 17,03 - precursor

CHANNEL A INJECT 08/24/00 14:53:24 STORED TO BIN # 1



DATA SAVED TO BIN # 1

Figura 4.3: Perfil Cromatográfico do bromoacetonitrila obtido por GC-ATF

4.1.4. Otimização das condições de análise para cromatografia em camada delgada para avaliação da pureza radioquímica do produto.

A Tabela 4.2 mostra os valores de pureza radioquímica, em termos percentuais, obtidas a partir da avaliação de cada suporte cromatográfico conforme 3.2.4.

Tabela 4.2 : Porcentagem de pureza radioquímica para cada tipo de suporte cromatográfico

Suporte	%	
Papel	73,7 ± 1,3 (A)	sem resolução (B)
SG 60/alumínio	62,4 ± 0,6 (A)	65,4 ± 1,8 (B)
SG/plástico	92,9 ± 0,5 (A)	96,1 ± 0,6 (B)
SG 60/vidro	96,3 ± 0,4 (A)	98,1 ± 0,1 (B)
ITLC	Sem resolução	

Onde: Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

4.2. Reação de Marcação

4.2.1. Otimização das Condições de Marcação

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores de pureza radioquímica para cada sistema de solventes em função dos tempos e temperatura de reação. Neste estudo utilizou-se 1,5 mg de bromoprecursor.

Tabela 4.3. Porcentagem de Pureza Radioquímica em função do tempo e temperatura

Tempo (min.)	Temperatura (°C)				sistema de solventes
	120	135	155	170	
15	Sem resolução	Sem resolução	61,0 ± 14,7	Sem resolução	A
	Sem resolução	Sem resolução	67,7 ± 15,9	Sem resolução	B
30	Sem resolução	Sem resolução	90,3 ± 4,7	95,4 ± 0,9	A
	Sem resolução	Sem resolução	93,8 ± 3,0	96,6 ± 1,5	B
45	Sem resolução	Sem resolução	93,8 ± 3,5	97,2 ± 0,2	A
	Sem resolução	Sem resolução	91,7 ± 3,0	98,7 ± 0,3	B
60	Sem resolução	74,7 ± 19,7	96,1 ± 0,9	97,5 ± 1,1	A
	83,8 ± 7,4	87,8 ± 11,8	96,5 ± 1,1	98,2 ± 0,6	B

Onde: Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam, em termos percentuais, o perfil de pureza radioquímica em função da temperatura nos dois sistemas de solventes utilizados. A reação se deu em 60 minutos conforme literatura ⁽¹³⁾.

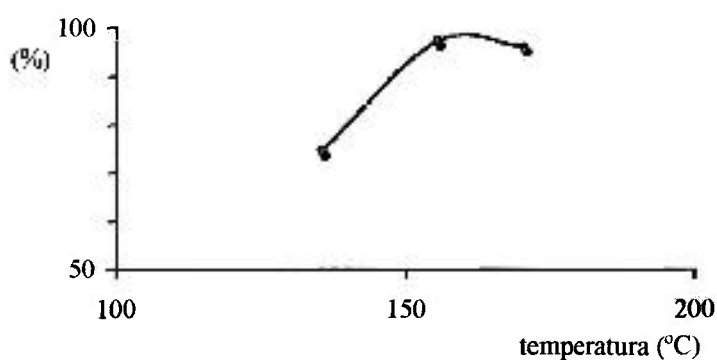


Figura 4.4: Pureza radioquímica em função da temperatura utilizando-se o sistema de solventes A (acetato de etila/hidróxido de amônio - 200:1).

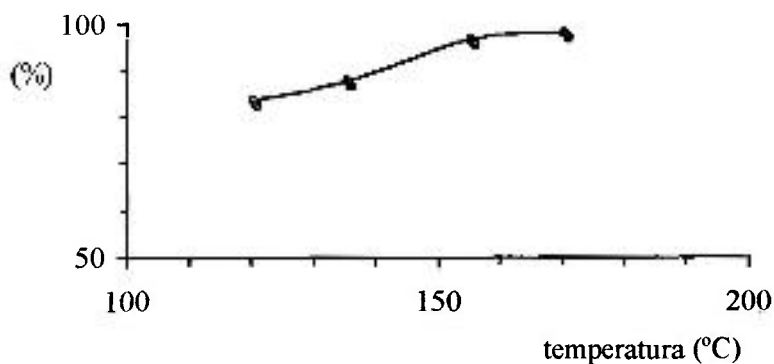


Figura 4.5: Pureza radioquímica em função da temperatura utilizando-se o sistema de solventes B (clorofórmio/ácido acético/água - 65:35:5).

As Figuras 4.6. e 4.7 apresentam, em termos percentuais, o perfil de pureza radioquímica em função do tempo nos dois sistemas de solventes utilizados. A reação se deu a 155°C conforme literatura⁽¹³⁾.

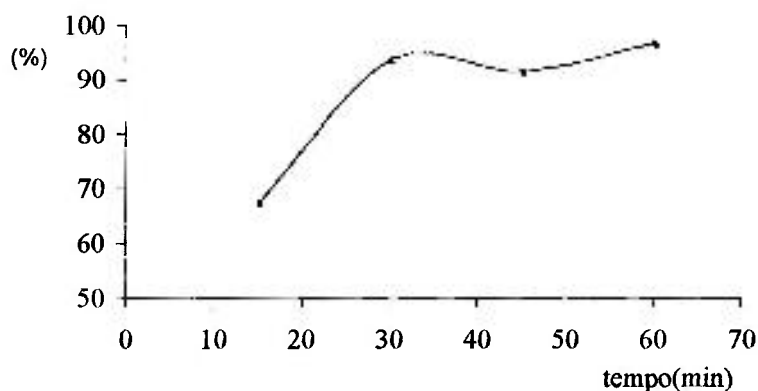


Figura 4.6: Pureza radioquímica em função do tempo utilizando-se o sistema de solventes A (acetato de etila/hidróxido de amônio - 200:1).

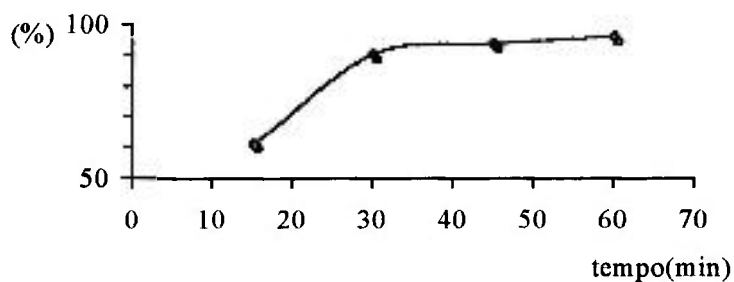


Figura 4.7: Pureza radioquímica em função do tempo utilizando-se o sistema de solventes B (clorofórmio/ácido acético/água – 65:35:5).

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores de pureza radioquímica em função da massa de precursor. A reação se deu em 60 minutos a 155°C.

Tabela 4.4. Porcentagem de Pureza Radioquímica em função da massa de bromoprecursor

Massa de precursor (mg)	Pureza Radioquímica (%)	Sistemas de solventes
0,5	95,7 ± 3,3	A
	96,6 ± 2,6	B
1,0	94,1 ± 0,5	A
	94,1 ± 1,2	B
1,5	96,1 ± 0,8	A
	96,5 ± 1,1	B

Na Tabela 4.5 são apresentados os valores de pureza radioquímica em função da atividade. A reação se deu em 60 minutos a 155°C.

Tabela 4.5. Porcentagem de Pureza Radioquímica em função da atividade

Atividade (MBq)	Pureza Radioquímica (%)	Sistema de solventes
185 MBq (5mCi)	95,2 ± 2,1	A
	96,3 ± 2,1	B
370 MBq (10 mCi)	94,3 ± 1,7	A
	95,5 ± 1,5	B
555 MBq (15mCi)	96,2 ± 0,9	A
	97,4 ± 0,7	B

Onde: Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

4.2.2. Avaliação da reação de marcação com ^{123}I – IEN – CNEN/RJ

A Figura 4.9 mostra o perfil cromatográfico obtida num radiocromatógrafo a gás. O sistema acetato de etila/hidróxido de amônio – 200:1 foi utilizado como fase móvel.

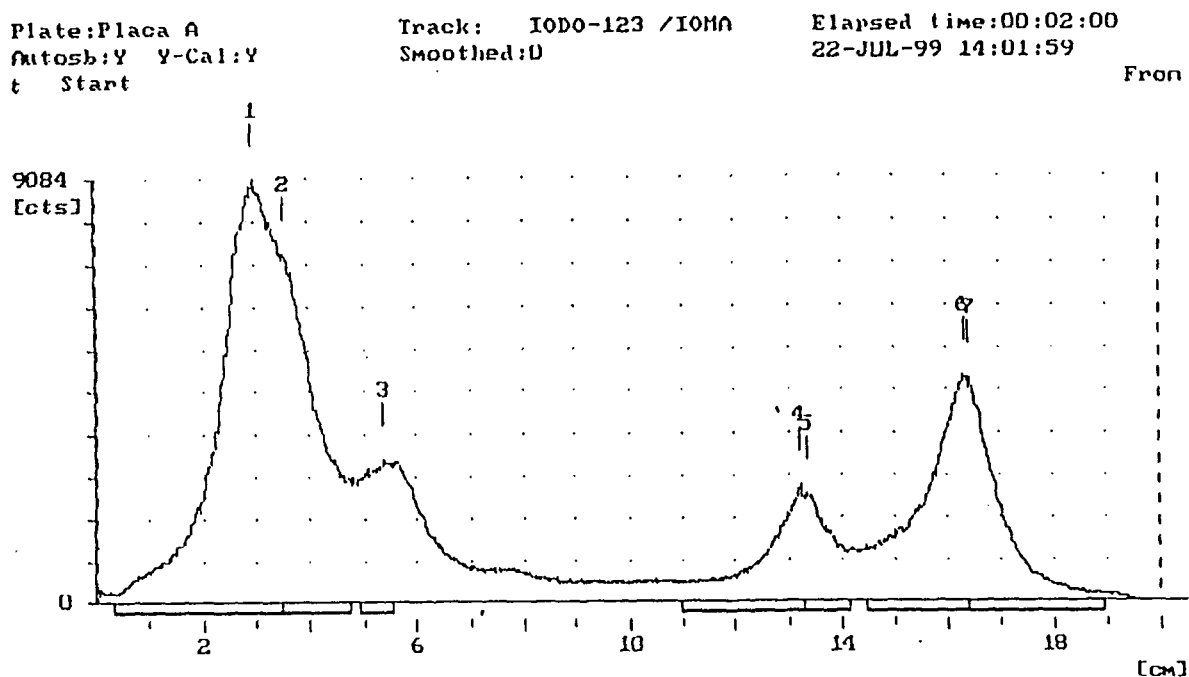


Figura 4.9: Perfil do produto marcado sob condições otimizadas e usando acetato de etila/hidróxido de amônio 200:1 como fase móvel.

A Figura 4.10 mostra o perfil cromatográfico obtida num radiocromatógrafo a gás. O sistema clorofórmio/ácido acético/água – 65:35:5 foi utilizado como fase móvel.

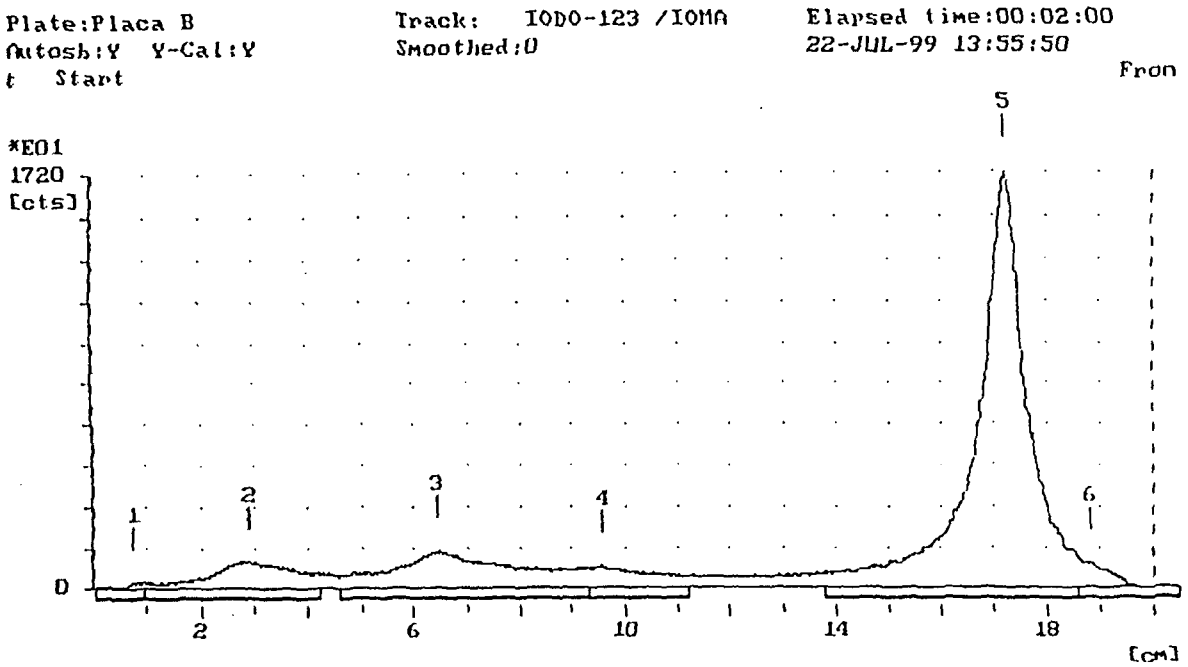


Figura 4.10: Perfil do produto marcado sob condições otimizadas e usando clorofórmio/ácido acético/água 65:35:5 como fase móvel.

A Figura 4.10 mostra o perfil cromatográfico obtida num radiocromatógrafo a gás. O sistema clorofórmio/ácido acético/água – 65:35:5 foi utilizado como fase móvel.

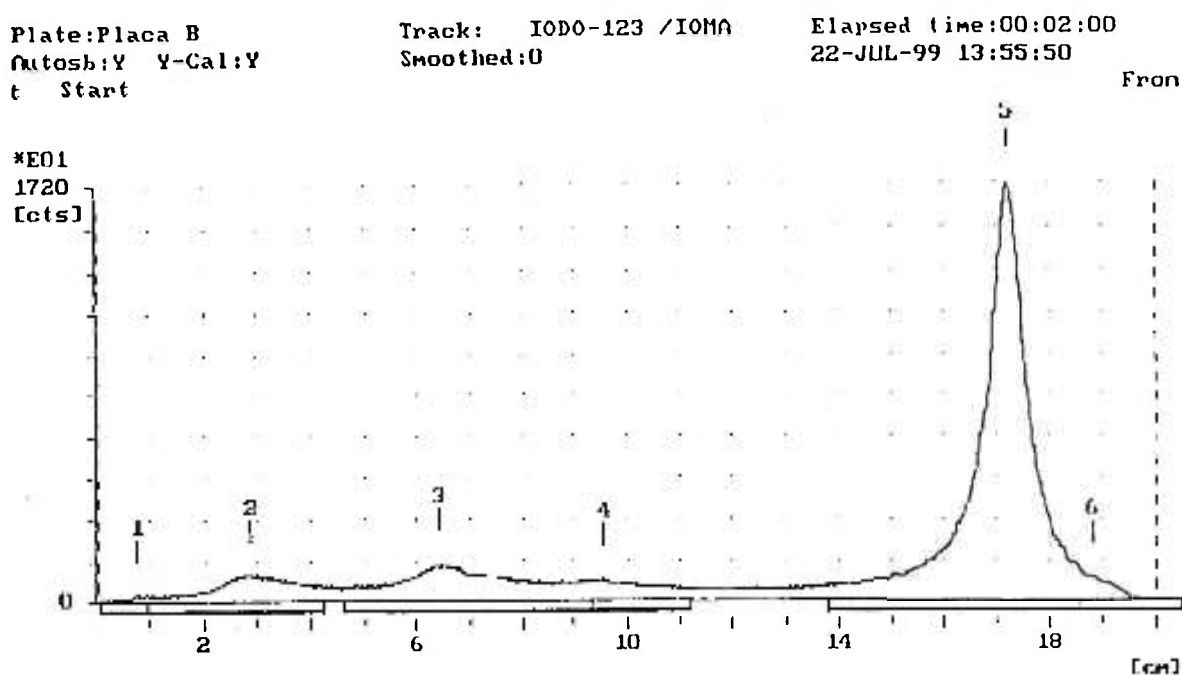


Figura 4.10: Perfil do produto marcado sob condições otimizadas e usando clorofórmio/ácido acético/água 65:35:5 como fase móvel.

O valor de pureza radioquímica obtidos a partir de cromatografia em camada delgada, realizada conforme 3.2.5 e utilizado o sistema de solventes clorofórmio/ácido acético/água 65:35:5 como fase móvel foi:

$$59,0 \pm 0,4$$

4.2.3. Avaliação da reação de marcação com ^{123}I – IPEN – CNEN/SP

A Tabela 4.6 apresenta os valores de pureza radioquímica, em termos percentuais, obtidos a partir de do processo de evaporação direta da solução de iodeto de sódio radioativo, conforme 3.2.9 e a análise cromatográfica conforme 3.2.5.

Tabela 4.6: Pureza radioquímica do iomazenil – ^{123}I por evaporação direta

(%)	Sistema de solventes
$78,8 \pm 5,4$	A
$81,4 \pm 6,8$	B

O valor de pureza radioquímica, em termos percentuais do iomazenil ^{123}I obtido por evaporação indireta foi:

$$95,0 \pm 0,3$$

O sistema de solventes utilizado foi o (A).

Onde: Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

4.2.4. Estabilidade do produto marcado

A Tabela 4.7 apresenta os valores de pureza radioquímica obtidas 24, 72 e 120 horas após a marcação do iomazenil com ^{131}I ..

Tabela 4.7: Estabilidade do produto marcado

Tempo (horas)	(%)	Sistema de solventes
24	$97,5 \pm 0,1$	A
	$98,0 \pm 0,3$	B
72	$93,5 \pm 0,1$	A
	$94,1 \pm 0,3$	B
120	$89,8 \pm 0,1$	A
	$90,3 \pm 0,3$	B

Onde: Sistema A: acetato de etila/hidróxido de amônio (200:1)

Sistema B: clorofórmio/ácido acético/água (65:35:5)

4.3. Estudos Biológicos

4.3.1. Distribuição Biológica – Ensaio I

A Tabela 4.8 apresenta a porcentagem de dose administrada do produto marcado em cada um dos órgãos analisados.

Tabela 4.8: Porcentagem de dose administrada de iomazenil – ^{131}I nos órgãos.

Córtex	0,91± 0,18
Cerebelo	0,13± 0,02
Tireóide	0,09± 0,01
Glândulas salivares	0,49± 0,14

4.3.2. Distribuição Biológica – Ensaio II

As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os resultados de captação do iomazenil – ^{131}I nos órgãos e tecidos estudados. Os resultados estão expressos em porcentagem de dose por órgão e porcentagem de dose por grama de órgão, respectivamente.

Os dados de porcentagem da dose administrada em relação ao sangue são apresentados na Tabela 4.11.

A Figura 4.11 exhibe a curva que expressa a porcentagem da dose administrada presente no córtex cerebral em função do tempo (minutos).

Tabela 4.9: Porcentagem de dose administrada de iomazenil – ^{131}I por órgão

TEMPO	PORCENTAGEM DA DOSE DE ^{131}I – IOMAZENIL POR ÓRGÃO										
(min.)	córtex	cerebelo	tireóide	pulmão	coração	fígado	estômago	baço	rim	intestino	músculo
5	1,43 ± 0,14	0,25 ± 0,04	0,08 ± 0,02	1,08 ± 0,28	0,40 ± 0,09	13,75 ± 0,95	0,91 ± 0,15	0,22 ± 0,08	9,94 ± 0,82	7,18 ± 1,41	0,24 ± 0,00
15	1,13 ± 0,07	0,24 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,76 ± 0,17	0,37 ± 0,06	10,49 ± 1,47	0,84 ± 0,11	0,15 ± 0,02	5,93 ± 1,47	8,00 ± 0,80	0,14 ± 0,02
30	0,64 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,06 ± 0,03	1,93 ± 0,03	1,31 ± 0,30	0,03 ± 0,01	1,08 ± 0,47	5,74 ± 0,81	0,02 ± 0,01
60	0,38 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	1,22 ± 0,21	0,96 ± 0,35	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,03	5,34 ± 0,62	0,01 ± 0,01

Tabela 4.10: Porcentagem de dose administrada de iomazenil – ¹³¹I por grama de órgão

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE ¹³¹ I – IOMAZENIL POR GRAMA DE ÓRGÃO										
	córtex	cerebelo	tireóide	pulmão	coração	fígado	estômago	baço	rim	intestino	músculo
5	4,55 ± 0,71	3,90 ± 0,38	8,93 ± 3,54	4,76 ± 0,46	3,04 ± 0,36	9,72 ± 0,54	1,90 ± 0,19	2,25 ± 0,43	27,64 ± 2,79	2,96 ± 0,22	2,13 ± 0,55
15	3,97 ± 0,35	3,30 ± 1,06	6,18 ± 0,26	3,00 ± 0,56	2,16 ± 0,36	6,12 ± 1,00	1,64 ± 0,30	1,63 ± 0,11	15,72 ± 5,17	2,28 ± 0,13	1,23 ± 0,35
30	1,97 ± 0,07	1,09 ± 0,25	3,84 ± 1,35	0,53 ± 0,11	0,46 ± 0,14	1,37 ± 0,26	2,47 ± 0,53	0,39 ± 0,12	3,42 ± 1,76	2,45 ± 0,61	0,17 ± 0,05
60	1,10 ± 0,15	0,61 ± 0,05	6,67 ± 4,10	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,94 ± 0,19	2,11 ± 0,54	0,25 ± 0,04	0,50 ± 0,14	2,16 ± 0,21	0,13 ± 0,07

Tabela 4.11: Porcentagem da dose administrada de iomazenil – ^{131}I no sangue total

Tempo (min.)	Sangue total (%)
5	$15,14 \pm 0,57$
15	$15,86 \pm 1,36$
30	$2,16 \pm 0,31$
60	$1,17 \pm 0,39$

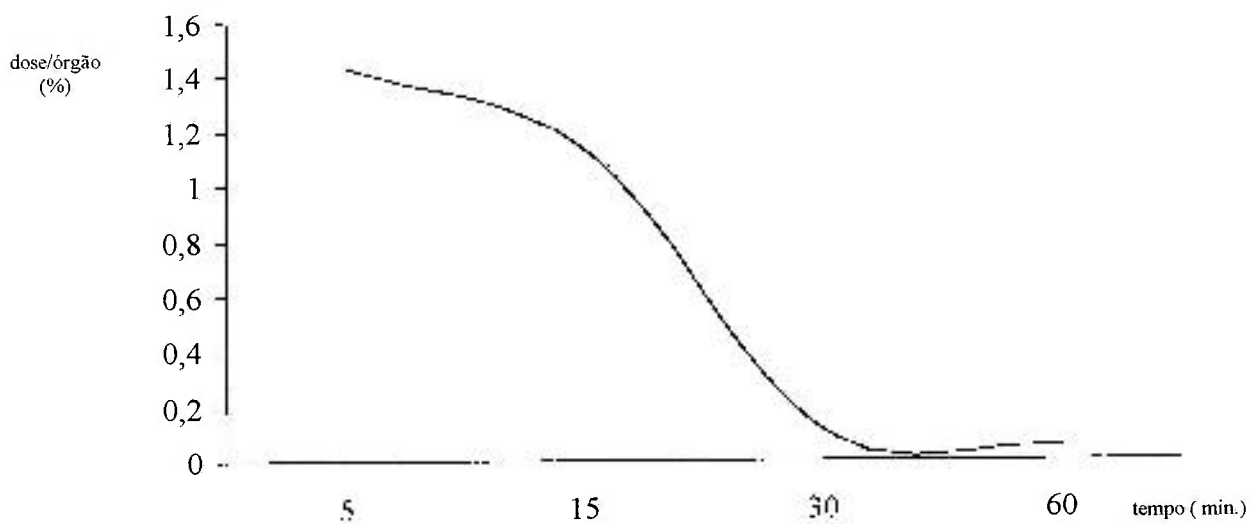


Figura 4.11: Curva que expressa a porcentagem da dose administrada presente no córtex em função do tempo (minutos).

4.3.3. Captação Cerebral

As Figuras 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 exibem as imagens cintilográficas obtidas conforme descrito no capítulo 3.2.10.3.

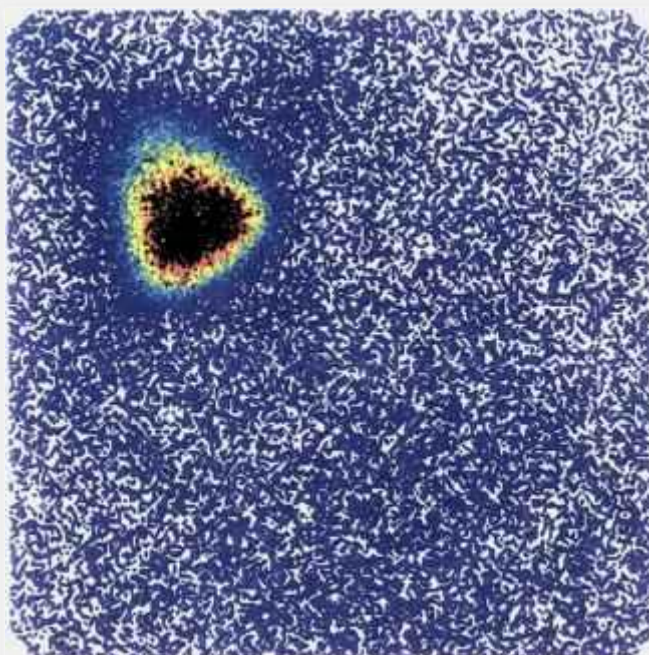


Figura 4.12: Imagem cintilográfica cerebral de rato 5 minutos após a administração do iomazenil – ^{131}I . Animal com a glândula tireóide presente.

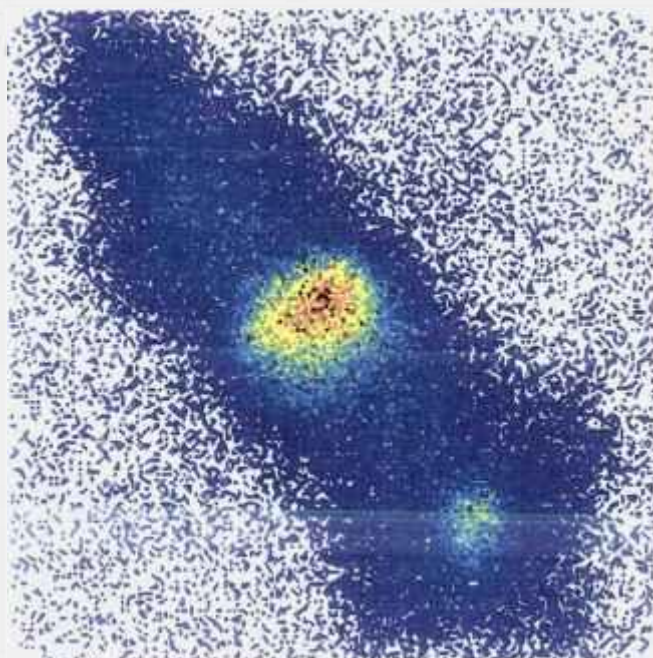


Figura 4.13: Imagem cintilográfica do fígado e bexiga de rato 5 minutos após a administração do iomazenil – ^{131}I . Animal com a glândula tireóide presente.

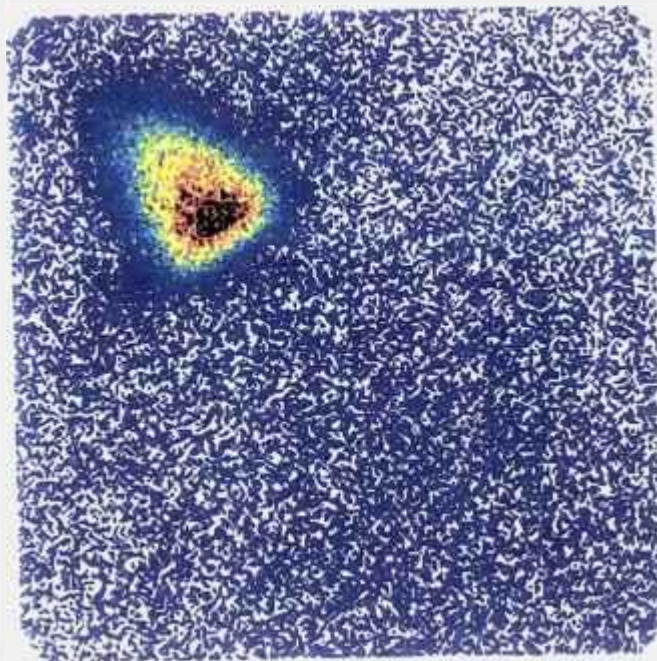


Figura 4.14: Imagem cintilográfica cerebral de rato 5 minutos após a administração do iomazenil – ^{131}I . Animal sem glândula tireóide.

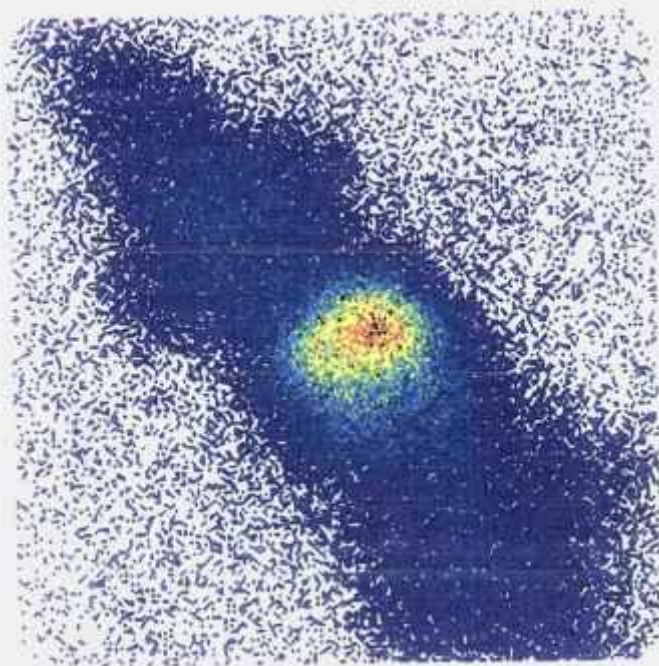


Figura 4.15: Imagem cintilográfica do fígado de rato 5 minutos após a administração do iomazenil – ^{131}I . Animal sem glândula tireóide .

5. Discussão

Visando a obtenção de um novo radiofármaco para uso em Medicina Nuclear, estudou-se o processo de marcação do iomazenil com ^{123}I .

O ponto de partida foi a marcação proposta por Schubiger e colaboradores⁽¹³⁾. Nesta reação utiliza-se um benzodiazepínico como precursor que apresenta em sua estrutura molecular um átomo de bromo na posição 7 do anel aromático que está acoplado ao anel incomum de sete átomos, estrutura esta, característica dos benzodiazepínicos.

A reação de marcação deste precursor consiste em substituir o bromo presente por um átomo de iodo radioativo.

Uma vez que o bromoprecursor é o reagente principal para o sucesso da reação de marcação, foram realizados estudos de caracterização deste composto. Estudos estes de fundamental importância para garantir a identidade e integridade química do composto.

De posse de uma análise espectrofotométrica no infravermelho realizada na Suíça, foi possível comparar o perfil obtido em análise realizada no laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Foram detectadas pequenas diferenças, mas estas atribuídas aos equipamentos e condições nas quais foram realizadas as análises.

Entretanto, o espectro obtido apresenta os picos característicos da substância.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou um perfil satisfatório e as diferenças obtidas nos tempos de retenção preconizados pela literatura⁽¹³⁾ são atribuídas as diferenças nas dimensões na coluna utilizada.

Desta forma, as condições de fluxo foram adequadas à coluna. O sistema de solventes utilizado foi o proposto Schubiger e colaboradores⁽¹³⁾. Uma vez comprovada a integridade química do precursor, deu-se início a realização da reação de marcação do iomazenil com ^{131}I , cuja escolha baseou-se em suas características como meia-vida de 8 dias e disponibilidade para utilização em quantidades adequadas. Nesta fase do trabalho, ainda não estava disponível o ^{123}I em quantidades e características exigidas para os ensaios.

Desta forma, num primeiro momento, realizamos um número significativo de reações de marcação conforme Schubiger e colaboradores⁽¹³⁾, isto foi fundamental para se demonstrar a reprodutibilidade da reação de marcação e adaptação das condições disponíveis em nossas instalações. Paralelamente, avaliamos diversos suportes utilizados em cromatografia em camada delgada. A finalidade desta avaliação se apóia na necessidade de se optar por um sistema cromatográfico viável economicamente e de fácil disponibilidade.

Entretanto, apenas o suporte cromatográfico preconizado pela literatura⁽¹³⁾ mostrou ser capaz de oferecer análises cromatográfica com resolução adequada.

O sistema de solventes⁽¹³⁾ foi mantido nesta avaliação pois, neste caso, estão perfeitamente adequados às características químicas dos componentes a serem identificados e às propriedades dos suportes cromatográficos escolhidos.

Assim, adotou-se como metodologia para determinação da pureza radioquímica, as condições preconizadas por Schubiger e colaboradores⁽¹³⁾.

Uma vez estabelecida a metodologia para determinação da pureza radioquímica, deu-se início a otimização das condições da reação.

Este estudo fundamenta-se no fato de que as condições experimentais diferem, em alguns aspectos, das condições preconizadas pela literatura⁽¹³⁾.

Apesar dos ensaios terem sido realizados com ^{131}I , o radioisótopo indicado para marcação deste produto é o ^{123}I , cuja meia-vida é de 13,3 horas. Desta forma, é desejável a obtenção de bons rendimentos de marcação num intervalo de tempo menor de reação.

Foram avaliados o tempo e a temperatura da reação, e também a massa de bromoprecursor e a atividade utilizada.

Observando-se atentamente a tabela 4.2, pode-se verificar os resultados obtidos com as condições preconizadas pela literatura⁽¹³⁾: 155°C por 60 minutos não são tão favoráveis como os resultados obtidos com a elevação da temperatura e diminuição do tempo de reação. Os resultados também mostram que para temperaturas inferiores a 155°C e tempo de reação menor que 45 minutos, a análise cromatográfica torna-se inviável e não há separação clara das

espécies químicas. A cromatografia apresenta um ‘arraste’, sem picos definidos e quando presentes, de baixa de resolução.

Desta forma, os resultados indicam, como condições apropriadas, que a reação deve se dar numa temperatura de 170°C durante 45 a 60 minutos. Nestas condições de reação, obteve-se porcentagens de pureza radioquímica satisfatórias.

Em relação à massa de precursor e a atividade utilizadas, os dados mostrados na tabela 4.4 sugerem não haver dependência. A literatura⁽¹³⁾ refere à interferência no rendimento da reação apenas quando se utilizam massas inferiores a 0,5 mg de bromoprecursor.

Uma vez estabelecidas as condições otimizadas para a reação de marcação, procedeu-se a avaliação da estabilidade do produto marcado.

Para tanto, determinou-se a pureza radioquímica do iomazenil marcado 24, 72 e 120 horas após a marcação. Em 24 horas não houve decréscimo significativo na pureza radioquímica. Os dados indicam um decréscimo em torno de 4% a cada 48 horas.

Entretanto, cabe salientar que em se tratando de um produto que deve ser marcado com ^{123}I , apresenta-se virtualmente estável durante o período de utilização pós-marcação e que provavelmente não excederá a 24 horas, em função da meia-vida curta do radioisótopo em questão.

Estabelecidas as condições da reação de marcação e estabilidade do produto marcado com ^{131}I , passou-se aos estudos destas condições com ^{123}I .

Foram avaliados os radioisótopos de duas procedências: ^{123}I produzido pelo IEN/CNEN – RJ e ^{123}I produzido pelo IPEN/CNEN – SP.

Os resultados obtidos a partir da reação de marcação do iomazenil com ^{123}I produzido pelo IEN/CNEN – RJ, mostraram-se pouco satisfatórios, obtendo-se um percentual baixo de pureza radioquímica. Isto se deve, provavelmente, ao fato desta solução de Na^{123}I apresentar um alto teor de iodato (IO_3^-) superior a 50%.

O perfil cromatográfico mostrado na figura 4.8 visualiza a situação, na qual o pico característico do iomazenil marcado não se destaca nestas condições, aparecem picos desconhecidos na frente do solvente e um pico proeminente na origem, na qual se concentram as espécies químicas com polaridade negativa, como I^- e IO_3^- .

Com relação aos dados obtidos a partir da reação de marcação com ^{123}I produzido pelo IPEN/CNEN – SP, podemos observar valores mais satisfatórios de pureza radioquímica se compararmos com os valores obtidos a partir da reação de marcação com ^{131}I .

Entretanto, como se pode observar em 4.2.3, temos duas situações distintas que revelam porcentagem de pureza radioquímica distintas.

Como descrito em 3.2.3, esta solução deve ser evaporada a secura, pois o bromoprecursor é suscetível a hidrólise e a reação deve ocorrer num meio no qual este processo não seja favorecido. Para tanto, procede-se a evaporação completa da solução de $\text{Na}^{123/131}\text{I}$. Somente após este procedimento pode-se dar seguimento ao processo de marcação.

Desde que as soluções de Na^{123}I exigem um processo de evaporação mais longo por se apresentarem menos concentradas, ou seja maiores volumes, foram avaliadas duas maneiras de realizar este procedimento, descrito em 3.2.9.

Analisando-se os dados, verificaram-se valores que sugerem que a evaporação da solução de Na^{123}I é um passo importante no sucesso da reação de marcação do iomazenil. Assim, o processo de evaporação da solução de iodeto radioativo deve ser melhor investigado.

Neste ponto, deu-se início aos ensaios biológicos do iomazenil. Para esta fase do trabalho, optou-se pela utilização do ^{131}I devido a sua disponibilidade.

Estes ensaios tiveram por objetivo avaliar o comportamento *in vivo* do iomazenil.

Os benzodiazepínicos apresentam alta lipossolubilidade, distribuem-se extensivamente em todos os tecidos e atravessam a barreira hemaencefálica com relativa facilidade. Os benzodiazepínicos também se ligam extensivamente a proteínas plasmáticas e teciduais, atingindo taxas de ligação de 82% a 98%. A biotransformação dos benzodiazepínicos ocorre principalmente por ação de

enzimas dos microsossomos hepáticos, isoenzimas pertencentes ao sistema do citocromo P – 450⁽⁴⁾.

Parte do fármaco é eliminada intacta pelos rins, e parte metabolizada.

Essas informações permitiram estabelecer o comportamento do iomazenil num modelo animal.

O primeiro passo foi avaliar se o produto marcado não se apresentava tóxico, uma vez que a purificação do produto por cromatografia líquida como preconizado⁽¹³⁾ não seria possível dadas as características do equipamento disponível.

A contagem da radioatividade nos órgãos revelou captação cerebral compatível com o ‘modelo animal adotado’. Os animais permaneceram sob observação, não mostraram nenhum tipo de ‘mudança comportamental’, indicando a inexistência de toxicidade aparente.

O estudo do metabolismo e biodistribuição do iomazenil marcado com ¹³¹I exhibe resultados promissores, uma vez que a distribuição pelos órgãos ao longo do tempo revela coerência com o esperado de um benzodiazepínico típico. Estes dados podem ser claramente observados nas Tabelas 4.9 e 4.10.

A curva que expressa a porcentagem da dose administrada presente no córtex em função do tempo (Figura 4.11) mostra a permanência no cérebro e indica que o período apropriado para captação da imagem deve ser nos primeiro 15 minutos após administração, com pico entre 5 e 10 minutos. Após este

intervalo de tempo, o iomazenil marcado sai rapidamente do tecido cerebral, principalmente em virtude da ação de esterases inespecíficas que hidrolisam o grupamento éster presente na molécula. Este é sabidamente o ponto vulnerável deste radiofármaco. Entretanto, este comportamento é esperado.

De posse dessas informações, procedeu-se aos estudos de captação. Para tanto, foram realizadas cintilografias de ratos para avaliação por imagem da distribuição do iomazenil marcado com ^{131}I no tecido cerebral.

Observando-se a imagem obtida do animal com glândula tireóide presente (Figura 4.12), pode-se notar a captação apropriada do iomazenil – ^{131}I pelo tecido cerebral. A alta densidade radioativa se deve a presença da glândula tireóide que apresenta certa taxa de captação. A posição anatômica escolhida para realização da cintilografia faz com que o cérebro se sobreponha a glândula tireóide.

Entretanto, observando-se a imagem obtida do animal tireoidectomizado, tem-se uma imagem mais clara da região cerebral (Figura 4.14) .

As imagens revelam também, captação esperada no fígado (Figuras 4.13 e 4.15), onde o iomazenil é metabolizado e bexiga (Figura 4.13) sítio de excreção.

6. Conclusão

- O precursor do iomazenil foi caracterizado adequadamente. Embora o espectro obtido por Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho indicasse algumas diferenças nas bandas quando comparado com o realizado pelo fornecedor do bromoprecursor. Entretanto, elas foram relacionadas a diferenças nas condições da análise.
- A pureza radioquímica foi determinada empregando-se Cromatografia em Camada Delgada utilizando-se dois sistemas de solventes para separação das espécies de interesse.
- A otimização das condições de marcação revelou que a temperatura de reação deve ser de 170°C e o tempo de reação 60 minutos. Entretanto, a partir de 40 minutos de reação os valores de pureza radioquímica são satisfatórios.
- O produto marcado mostrou-se estável por 24 horas, apresentando queda na pureza radioquímica em torno de 4% a cada 48 horas.
- Os estudos biológicos apresentaram resultados satisfatórios, indicando biodistribuição compatível com o comportamento farmacocinético dos benzodiazepínicos. No modelo animal utilizado, o produto marcado atinge rapidamente o cérebro,

permanece no sítio tempo suficiente para aquisição das imagens, mas é rapidamente hidrolisado por esterases inespecíficas.

- As imagens cintilográficas realizadas em ratos mostraram adequada captação cerebral, com tempo de permanência adequado para aquisição das imagens.

7. Bibliografia

1. Taylor, P.; Insel, PA. Molecular basis of pharmacological selectivity. In: Pratt, W.B.; Taulor. P.; eds. **Principles of drug action: the basis of Pharmacology**. Churchill Livingstone. p.1-103, 1990.

2. Sedvall, G.; Garde, L.; Persson, A.; Wiesel, F. Imaging of neurotransmitter receptors in the living human brain. **Arch. Gen. Psychiat.** v.43, p. 995 – 1005, 1986.

3. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. Guanabara Koogan. p. 4 – 11, 1996.

4. Bernik, M.A. **Benzodiazepínicos – Quatro Décadas de Experiência**. Edusp. p. 19 – 20, 1996.

5. Maziere, B.; Maziere, M. Where have we got to with neuroreceptor mapping of the human brain? **Eur. J. Nucl. Med.** v.16, p. 817-835, 1990.

6. Sybirska, E.; al-Tikriti, M.; Zoghbi, SS.; Baldwin, R.M.; Johnson E.W.; Innis, R.B. SPECT imaging of the benzodiazepine receptor: autoradiographic

comparison of receptor density and radioligand distribution. **Synapse**. v.12, p. 119-128, 1992.

7.Holman, B.L.; Devous, M.D. Functional brain SPECT: the emergence of a powerful clinical method. **J. Nucl. Med.** v. 33, p. 1888-1905, 1992.

8.Bussatto, G.F.; Pilowsky, L.S. Neuroreceptor imaging with PET and SPET: research and clinical applications. In: **Cambridge Medical Reviews: Neurobiology and Psychiatry**. Cambridge University Press. v.3, 1994.

9.Haefely, W.; Kyburz, E.; Gerecke, M.; Mohler, H. Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure-activity relationship of their agonists and antagonists. In: **Advances in Drug Research**. Academic Press Inc. v. 14, p 165 – 322, 1985.

10.Richard, J.G.; Mohler, H. Benzodiazepine receptors. **Neuropharmacology**. v.23, p. 233-242,1984.

11.Hunkeler, W.; Mohler, H.; Pieri, L. Selective antagonists of benzodiazepines. **Nature**. v. 290, p. 514-516,1981.

12.Savic, I.; Roland, Sedvall, G.; *et al.*. *In vivo* demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. **Lancet**. v. 2, p 863 – 866, 1988.

13.Beer, H.F.; Blaunenstein P.A.; Hasler P.H.; Delaloye B.; Riccabona G.; Bangerl, I.; Hunkeler, W.; Bonetti, E.P.; Pieri, L.; Richards, J.G.; Schubiger, P.A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Iodine –123 – Ro 16-0154: A new imaging agent for SPECT investigations of Benzodiazepine receptors. **J. Nucl. Med.** v. 31, p. 1007-1014, 1990.

14.Westera, G.; Buck A.; Burger, C.; Leenders, K.L.; von Schulthess, G.K.; Schubiger A.P. Carbon – 11 and iodine – 123 labelled iomazenil: a direct PET – SPET comparison. **Eur J. Nucl. Med.** v.23, p. 5-12, 1996.

15.Abi-Dargham, A.; Gandelman, M.; Zoghbi, S.S. Reproducibility of SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine – 123 – iomazenil. **J. Nucl. Med.** v.36, p. 167-175,1995.

16.Foged, C.; Halldin, C.; Hiltunen. Development of ¹²³I – labeled NNC 13-8241 as a radioligand for SPECT visualization of benzodiazepine receptor binding. **Nucl. Med. Biol.** v. 23, p. 201-209, 1996.