



DK8714296

ISSN 0101-3084

**CNEN/SP**

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

**PREPARAÇÃO DE L-ASPARAGINA-<sup>99m</sup>Tc**

**Helena Okada Silva, Constância Pegano Gonçalves da Silva e Nilda Petrona Sosa  
de Pereira**

**PUBLICAÇÃO IPEN 102**

**MAIO/1986**

**SÃO PAULO**

PUBLICAÇÃO IPEN 102



ISSN 0101-3084

MAIO/1986

## PREPARAÇÃO DE L-ASPARAGINA-<sup>99m</sup>Tc

Helena Okada Silva, Constância Pagano Gonçalves da Silva e Nilda Petrona Sosa de Pereira

DEPARTAMENTO DE TÉCNICA DE PROCESSAMENTO

CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO - BRASIL

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**

**INIS Categories and Descriptors**

**C45**

**ASCORBIC ACID  
ASPARAGINE  
CHROMATOGRAPHY  
LABELLED COMPOUNDS  
LABELLING  
RADIOPHARMACEUTICALS  
TECHNETIUM 99  
TUMORS**

## PREPARAÇÃO DE L-ASPARAGINA-<sup>99m</sup>Tc

Helena Okada Silva, Constância Pagano Gonçalves da Silva e Nilda Petrona Sosa da Pereira

### RESUMO

Dada a importância da incorporação de asparagina marcada com radionúclídeos em tumores sensíveis à asparagina, estabeleceram-se parâmetros para a preparação do complexo L-asparagina-<sup>99m</sup>Tc.

Os estudos de marcação foram realizados com seguintes redutores para o íon <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>: cloreto estânico, ácido ascórbico, cloreto estânico e ácido ascórbico, ascorbato estânico.

O rendimento máximo de marcação, da ordem de 95%, é obtido quando se utilizam como agentes redutores o ascorbato estânico ou o sistema cloreto estânico e ácido ascórbico.

### PREPARATION OF <sup>99m</sup>Tc-L-ASPARAGINE

### ABSTRACT

The interrelationship between technetium-99m, different reducing agents and the L-asparagine is studied. The maximum labelling yield, about 95%, is obtained by using the following molar ratios for ligand to reducing agents: L-asparagine: stannous ascorbate, 150:1; the system L-asparagine:ascorbic acid, 50:1, and L-asparagine:stannous chloride, 800:1. This radiopharmaceutical is used for visualization of dependent asparagine tumours.

### INTRODUÇÃO

Alguns aminoácidos marcados com elementos radioativos tem sido usados no diagnóstico médico de tumores sensíveis<sup>(9,15)</sup> e em especial, a L-asparagina tem se mostrado útil nesses estudos<sup>(1,2,4,6,10,12)</sup>.

A asparagina de fórmula NH<sub>2</sub>CO-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH é um aminoácido não essencial, encontrada como constituinte de muitas proteínas e hidrolisada em meio ácido quente.

Neste trabalho, estabeleceram-se os parâmetros para a preparação de asparagina marcada com <sup>99m</sup>Tc, após estudos de diferentes redutores para o íon pertecnato(<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>).

### PARTE EXPERIMENTAL

Os estudos de marcação foram realizados com os seguintes redutores: cloreto estânico<sup>(9)</sup>, ácido ascórbico<sup>(7,11)</sup>, cloreto estânico e ácido ascórbico<sup>(13)</sup>, ascorbato estânico<sup>(3)</sup>.

**MATERIAIS**

1.  $^{99m}\text{Tc}$ , em forma de pertecnetato, obtido em solução salina, por eluição de um gerador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  (IPEN-TEC).
2. L-asparagina monohidratado (PM=150,1) de procedência Sigma, recristalizada em água antes do uso.
3. Cloreto estano dihidratado PA,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PM=225,6) de procedência Merck com título de pureza maior que 95%. titulado segundo método descrito na Farmacopéia Brasileira, 2ª edição.
4. Ácido L(+)-ascórbico PA (PM=176,12) de procedência Merck.
5. Hidróxido de amônio PA (PM=17,03) de procedência Merck.
6. Solução de cloreto de sódio 0,9%.

**MARCAÇÃO COM  $^{99m}\text{Tc}$** 

Inicialmente, prepararam-se as seguintes soluções:

1. L-asparagina ( $\text{L-NH}_2\text{Asp}$ )  $2 \times 10^{-1}\text{M}$ , em solução de cloreto de sódio 0,9%.
2. Ácido ascórbico ( $\text{H}_2\text{Asc}$ ) em diferentes concentrações em HCl 1N.
3. Cloreto estano dihidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) em diferentes concentrações em HCl 1N.
4.  $\text{H}_2\text{Asc}$  obtido por dissolução em diferentes concentrações na solução 3.
5. Ascorbato estano ( $\text{Sn}_2\text{Asc}$ ) preparado a partir de 500mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em HCl 0,25N e alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 9 a 10. O hidróxido de estanho assim obtido foi lavado em água e ressuspenso em 8ml de  $\text{H}_2\text{Asc}$  (300mg/ml). A suspensão foi filtrada através de filtro Millipore 0,22 $\mu\text{m}$  e liofilizada por 16 horas.

Prepararam-se amostras contendo 0,98ml de solução de L-asparagina, que foram nitrogenadas por 30 minutos e às quais adicionou-se ou 0,02ml de HCl 1N ou redutores em diversas concentrações. O pH das preparações foi de 3,5.

As soluções assim preparadas foram filtradas por filtro Millipore 0,22 $\mu\text{m}$ . Adicionou-se então a cada preparação solução de pertecnetato de sódio- $^{99m}\text{Tc}$  com atividade de  $3,7 \times 10^7\text{Bq}$ . Decorridos 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição de  $^{99m}\text{Tc}$ , retiraram-se amostras e determinou-se a pureza radioquímica pelo sistema "Michrom"<sup>(5,15)</sup>. Utilizaram-se fitas de dimensões 1cm x 6cm de papel Whatman 3MM recoberto de Sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) de procedência Merck e solvente NaCl 0,9% para separação do tecnécio reduzido hidrolisado e do produto marcado e  $\text{TcO}_4^-$  livre. Fitas de papel Whatman nº 1 e solvente acetona foram usados para separação do  $\text{TcO}_4^-$  livre e do produto marcado e o tecnécio reduzido hidrolisado.

As medidas de atividade correspondentes a asparagina- $^{99m}\text{Tc}$ ,  $\text{TcO}_4^-$  livre e tecnécio reduzido hidrolisado foram feitas em cintilador gama de 240 amostras (ANS-Abbot Laboratories).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas I, II e III mostram os valores percentuais correspondentes à amida marcada, tecnécio reduzido hidrolisado e pertecnetato livre, em diferentes sistemas redutores para o íon  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ .

Persano<sup>(10)</sup> descreve, em seus estudos de espectrofotometria, que o tecnécio reduzido se incorpora à L-asparagina e a complexação se dá nos grupamentos carboxila e aminico. Explorando este aspecto, prepararam-se as soluções em pH 3,5 onde a concentração do aminoácido na forma anfótera é cerca de 30 vezes maior que na forma ácida, sendo que os pKas para semineutralização de cada um dos prótons dissociados da asparagina monohidratada são 2,02 e 8,80.

Pode-se verificar que a estrutura molecular de asparagina  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$  não contém grupamento redutor. No sistema sem redutor, como era de se esperar há predominância de pertecnetato, indicando que não houve mudança no estado de oxidação do tecnécio (Tabela I).

A fim de reduzir Tc + VII para o estado de oxidação mais baixo para ser incorporado à asparagina, adicionou-se ao meio, íon de  $\text{Sn}^{2+}$  na suposição de uma redução quantitativa de Tc + VII para Tc + IV e uma possível formação de quelato bimetálico (14).

A adição de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  na razão molar 1:400 (Tabela I), provoca redução quantitativa do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . No entanto, cerca de 40% da espécie reduzida é não reativa<sup>(9)</sup>, indicando um excesso da concentração do redutor. Com o aumento da diluição do redutor, pode-se observar, na Tabela I, que a redução não é mais quantitativa, aumentando a percentagem do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e também diminuindo aquela do Tc reduzido hidrolisado.

Salariá e colaboradores<sup>(11)</sup> estudando a redução de pertecnetato a tecnécio + IV com ácido ascórbico, concluíram que em soluções ligeiramente ácidas em temperatura ambiente, a redução ocorre muito lentamente. Hodara e colaboradores<sup>(7)</sup> demonstraram que para a redução eficiente do pertecnetato com ácido ascórbico é necessário meio ácido clorídrico 2N e temperatura de 70°C.

Como podemos observar na Tabela II, o ácido ascórbico em pH 3,5 não consegue reduzir pertecnetato.

Numa tentativa de estabilizar o Tc reduzido com baixas concentrações de  $\text{Sn}^{2+}$ , adicionou-se o ácido ascórbico<sup>(13)</sup>. Observa-se na Tabela II que o rendimento de marcação mais alto foi aquele em que as relações dos redutores  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e ácido ascórbico para a asparagina foram de 1:800 e 1:500, respectivamente.

Outro agente redutor utilizado foi o ascorbato estano. O íon de  $\text{Sn}^{2+}$  quando incorporado ao ácido ascórbico em solução saturada, minimiza a decomposição química causada pela oxidação do  $\text{Sn}^{2+}$  a  $\text{Sn}^{4+}$ , a presença de elementos traços e formação de solução coloidal<sup>(14)</sup>. A Tabela III mostra que o melhor resultado é aquele em que a relação de ascorbato estano para asparagina é de 1:150.

Pode-se concluir, portanto que a preparação do complexo L-asparagina- $^{99m}\text{Tc}$  apresentou melhor rendimento de marcação, cerca de 94% quando se utilizam ascorbato estano em relação ao ligante na proporção 1:150 e o sistema redutor cloreto estano e ácido ascórbico em relação à amida de 1:800 e 1:50, respectivamente.

O estudo da estabilidade do complexo realizado à temperatura ambiente até 2 horas após a preparação do complexo, indicou que o produto é estável, não se verificando o aumento da percentagem de pertecnetato livre ou de tecnécio reduzido (Tabela II e III).

Tabela I

Controle Radioquímico da Preparação de L-asparagina-<sup>99m</sup>Tc (função do tempo - Sistema "Michrom")

Tempo(min)

SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O/Asparagina	30'			60'			90'			120'		
	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)
Sem redutor	1,22	0,72	98,06	1,42	0,30	98,28	1,35	0,25	98,39	1,50	0,23	98,26
1:50	8,64	86,01	5,35	11,18	84,68	4,14	16,51	81,47	2,02	20,30	78,91	0,50
1:200	55,19	43,54	1,27	44,46	54,63	0,91	45,02	53,70	1,28	43,55	55,05	1,40
1:400	56,67	42,56	0,77	51,17	47,86	0,97	65,70	33,56	0,74	58,01	40,24	1,75
1:800	52,47	45,93	1,60	57,46	40,45	2,09	60,87	37,41	1,72	54,88	43,15	1,97
1:1600	55,91	41,10	3,19	60,06	35,43	4,51	67,97	26,30	5,73	55,35	37,33	7,32

Tabela II

Controle Radioquímico da Preparação de L-asparagina-<sup>99m</sup>Tc (função do tempo - Sistema "Michrom")

Tempo(min)

SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O/Asparagina	30'			60'			90'			120'		
	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O — H <sub>2</sub> Ascórbico 1:50	0,77	0,85	98,38	0,72	2,48	96,80	1,32	0,45	98,23	0,42	0,81	98,77
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:200 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:50	72,79	24,33	1,88	64,63	33,43	2,14	72,64	25,14	2,22	67,88	29,94	2,18
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:400 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:25	78,96	19,24	1,80	77,63	20,75	1,62	80,43	17,66	1,89	80,68	17,70	1,62
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:400 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:50	92,41	5,18	2,41	84,64	11,56	3,86	89,59	7,01	3,45	88,76	8,26	2,98
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:400 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:100	68,91	34,80	1,29	60,36	38,14	1,50	66,43	32,23	1,34	69,67	28,83	1,50
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:800 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:25	76,27	17,74	5,99	80,40	11,90	7,70	85,31	7,28	7,41	84,22	7,96	7,82
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:800 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:50	90,98	7,49	1,58	94,38	3,68	1,54	94,89	3,94	1,37	94,14	4,57	1,29
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:800 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:75	87,48	9,43	3,09	89,94	7,87	2,19	91,48	6,78	1,74	90,47	7,59	1,94
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1:800 H <sub>2</sub> Ascórbico 1:100	81,48	14,11	4,05	87,45	8,21	4,34	86,70	6,95	6,35	86,68	8,50	4,82

Tabela III

Controle Radioquímico da Preparação de L-asparagina-<sup>99m</sup>Tc (função do tempo - Sistema "Michrom")

Tempo(min)

Sn <sub>2</sub> Ascorbato	30'			60'			90'			120'		
	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)	Rendimento de marcação (%)	Tc reduzido hidrolisado (%)	TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (%)
1:15	68,45	31,11	0,44	76,77	22,69	0,54	76,37	22,61	1,02	76,68	22,56	0,76
1:20	79,21	23,19	0,60	82,62	16,88	0,50	83,09	15,93	0,98	65,39	34,06	0,55
1:30	82,10	16,65	1,25	84,50	14,47	1,03	81,91	16,78	1,31	84,25	15,03	0,72
1:50	86,82	10,69	2,49	81,91	15,23	2,96	87,54	9,85	2,61	84,10	12,98	2,92
1:100	90,88	8,05	1,07	92,84	5,86	1,30	91,14	7,16	1,40	92,40	6,20	1,40
1:125	90,33	7,93	1,74	85,64	9,54	5,82	90,50	7,22	2,28	83,84	14,37	1,79
1:150	91,51	3,80	1,69	94,89	3,90	1,41	93,00	4,29	2,71	94,97	2,91	2,12
1:200	91,07	7,57	1,36	92,63	6,02	1,35	93,93	4,74	1,33	92,74	6,04	1,22

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGHILERI, L. J. Cr-L-asparagine accumulation by tumours: the influence of L-asparaginase treatment. *J. Nucl. Biol. Med.*, 14:150-2, 1970.
2. ANGHILERI, L. J. Aspartic acid and asparagine complexes with chromium (Cr): their nature and properties. *J. Nucl. Biol. Med.*, 15:98-102, 1971.
3. BARBOSA, M. R. F. F.; ALMEIDA, M. A. T. M.; SILVA, C. P. G. Preparação do ascorbato estano, redutor do íon pertecnetato usado na marcação de compostos com  $^{99m}\text{Tc}$ . In: MEDICINA nuclear: temas livres apresentados no 6º encontro brasileiro, São Paulo, SP, 15-17 agosto, 1985.
4. BELL, R. L. Nuclear cardiology: radiopharmaceuticals that localize in viable myocardium. *J. Tenn. Med. Assoc.*, 67(9):748-52, 1974.
5. COLOMBETTI, L. C.; MOERLIEN, S.; PATEL, G. C.; PINSKI, S. M. Rapid determination of oxidation state of unbound  $^{99m}\text{Tc}$  and labeling yield in  $^{99m}\text{Tc}$  labeled radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, 17:805-9, 1976.
6. GELBARD, A. S.; CLARKE, L. P.; LAUGHLIN, J. S. Enzymatic synthesis and use of  $^{13}\text{N}$  labeled L-asparagine for myocardial imaging. *J. Nucl. Med.*, 15(12):1223-5, 1974.
7. HODARA, I.; SILVERMAN, C.; BALOUKA, I. The electrochemical and chemical reduction of pertecnetate. *Radiochim. Acta*, 18(2):67-71, 1972.
8. KARUBE, Y.; MAEDA, T.; IMOTO, T.; OHYA, M.; SUGATA, S.; KONO, A.; OKANO, H.; MATSUSHIMA, Y. Evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled amino acids as radiopharmaceuticals. III<sup>1</sup>.  $^{99m}\text{Tc}$  complexes of ligands related to ethylenediamine-N, N-diacetic acid for tumor visualization. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(7):2529-33, 1982.
9. OWUNWANNE, A.; MARINSKI, J.; BLAU, M. Charge and nature of technetium species produced in the reduction of pertecnetate by stannous ions. *J. Nucl. Med.*, 18(11):1099-105, 1977.
10. PERSANO, S. C. C. M. Preparação do complexo L-asparagine-tecnécio. Estudo do acúmulo do produto marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  em animais portadores de carcinoma de Walter-256. São Paulo, 1981. (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CNEN/SP)
11. SALARIA, G. B. S.; RULFS, C. L.; ELVING, P. J. Spectrophotometric studies of lower oxidation states of technetium. *Talanta*, 10:1159-63, 1963.
12. SILVA, H. O.; PEREIRA, N. P. S.; SILVA, C. P. G. Preparação de L-NH<sub>2</sub> asparagina- $^{99m}\text{Tc}$ . In: MEDICINA nuclear: temas livres apresentados no 6º encontro brasileiro, São Paulo, SP, 15-17 agosto, 1985.
13. TOFE, A. J. & FRANCIS, M. D. In vitro stabilization of a low-tin bone-imaging agent ( $^{99m}\text{Tc}$ -Sn-HEDP) by ascorbic acid. *J. Nucl. Med.*, 17:820-5, 1976.
14. TUBIS, M. & WOLF, W. *Radiopharmacy*. New York, Wiley-Interscience, 1976. p.217-23.
15. YANO, M. Accumulation in tumours of  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled sulphur-containing aminoacids and sugars. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiopharmaceuticals and labelled compounds: proceedings of an international conference held in Tokyo, 22-26 October, 1984*. Vienna, 1985. p.281-90. (Proceedings series)