

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PREPARAÇÃO DO COMPLEXO L-ASPARAGINA -TECNÍCIO.
ESTUDO DO ACÚMULO DO PRODUTO MARCADO COM ^{99m}Tc EM ANIMAIS
PORTADORES DE CARCINOMA DE WALKER-258

Sagramor C. de Chaves e Melo Persano

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de "Doutor - Área Tecnologia Nuclear".

Orientador: Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva

São Paulo
1981

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia
Autarquia associada a Universidade de São Paulo

PREPARAÇÃO DO COMPLEXO L-ASPARAGINA-TECNÉCIO.
ESTUDO DO ACÚMULO DO PRODUTO MARCADO
COM ^{99m}Tc EM ANIMAIS PORTADORES DE CARCINOMA
DE WALKER-256

Sagramor C. de Chaves e Melo Persano

*Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Doutor.
Área - Tecnologia Nuclear.*

Orientador

Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva



1981

AOS MEUS PAIS

Ao Fernando
Rafael, Mauro e Sandro

	PÁGINA
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Radiofarmacêuticos Localizadores de Tumores ...	1
1.2. A Asparagina	5
1.3. O Tecnécio	10
1.3.1. Generalidades	10
1.3.2. Estados de Oxidação	12
II. PROPOSIÇÃO	20
III. MATERIAIS E MÉTODOS	22
III.1. Materiais	22
III.1.1. Reagentes e Soluções Empregadas	22
III.1.2. Animais	23
III.1.3. Equipamentos	23
III.2. Métodos	24
III.2.1. Estudo dos Redutores e Caracterização dos <u>Estados</u> de Oxidação do Tecnécio	24
III.2.1.1. Medidas Ópticas	24
III.2.1.2. Medidas Potenciométricas	24
III.2.1.3. Medidas Cromatográficas	25
III.2.2. Padronização dos Parâmetros Adequados à <u>Complexa</u>	

ção da L-asparagína com Tecnécio-99.	26
III.2.2.1. A Preparação do Complexo	26
III.2.2.2. Análise do Complexo	27
III.2.2.3. Estudo da Estabilidade do Complexo..	27
III.2.2.4. Espectros na Região do Infravermelho	27
III.2.2.5. Análise Cinética da Reação em Tempe ratura Ambiente	27
III.2.3. Padronização dos Parâmetros Adequados à Marcação de L-Asparagína com ^{99m} Tc. Determinação da Pure za Radioquímica	29
III.2.4. Ensaios de Distribuição Biológica	30
III.2.4.1. Distribuição Biológica em Animais Sa dios	30
III.2.4.2. Distribuição Biológica em Animais Portadores de Carcinoma de Walker 256	31
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
IV.1. Caracterização dos Estados de Oxidação do Tecnécio	32
IV.1.1. Espectrofotometria na Região do Visível e Ultra violeta	32
IV.1.2. Medidas Potenciométricas	35
IV.1.3. Medidas Cromatográficas	39
IV.2. Padronização dos Parâmetros Adequados à Preparação do Complexo L-Asparagína ^{99m} Tc.	60
IV.2.1. Preparação do Complexo	60
IV.2.2. Estudo da Estabilidade do Complexo	66
IV.2.3. Espectro de Absorção no Infra-Vermelho	69
IV.2.4. Análise Cinética da Reação	71
IV.3. Preparação da L-Asparagína Marcada com Tecnécio-99m	72
IV.4. Ensaios de Distribuição Biológica	75

IV.4.1. Animais Normais	75
IV.4.2. Distribuição Biológica em Ratos Portadores de Carcinoma de Walker 256	79
V. CONCLUSÕES	86
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

AGRADEÇO

- Ao Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni pelas facilidades oferecidas no início deste trabalho experimental.
- Ao Eng^o Hernani A.L. Amorim, Superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- A Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, orientadora, pela assistência, apoio e dedicação durante a elaboração desta tese.
- Ao Dr. José Carlos Prado pela colaboração e discussões relativas ao trabalho.
- Ao Dr. David Ehrlich, Superintendente do Centro de Pesquisa Haroldo Levy, da Fundação Antonio Prudente, por proveitosas discussões a respeito do tema deste trabalho.
- A Dra. Marilda Meirelles de Oliveira, Chefe do Departamento de Farmacologia do Instituto Biológico de São Paulo, bem como a Dra. Maria Regina Sampaio e Farmacêutico Bioquímico José Alfredo de Aragão, membros daquele Departamento, pelos ensinamentos e auxílio na parte referente ao transplante de tumores.
- Ao M.Sc. Antonio S. Gouvea e Físico Carlos Henrique Mesquita na assistência prestada durante a elaboração dos cálculos.
- Ao Centro de Engenharia Química do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela colaboração nas análises.

S U M Á R I O

Descreve-se neste trabalho a preparação do complexo da L-asparagina com tecnécio, visando à obtenção de um produto marcado para utilização em medicina nuclear.

Primeiramente, estuda-se a redução do anion pertecnetato $^{99}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ com hidrazina e caracterizam-se os estados de oxidação do tecnécio por espectrofotometria de absorção no visível e no ultravioleta (UV) e cromatografia.

Os espectros de absorção no visível e UV mostram que enquanto a solução de pertecnetato de amônio $^{99}\text{TcO}_4^-$ (Tc+VII) apresenta picos de absorção característicos em 244, 248 e 290 nm, após a reação de redução aparecem pilcos característicos de Tc+IV em 330 e 495-530 nm.

As medidas polarográficas quando se usa solução de hidróxido de sôdio 0,1N eletrólito suporte mostram potencial de meia onda, $E_{1/2} = -0,82\text{V}$ para o tecnécio +VII, enquanto que pela adição de quantidades crescentes de hidrazina este valor se desloca para valores mais positivos mostrando a redução do Tc+VII para estados de oxidação mais baixos.

A análise cromatográfica confirma os dados obtidos pela polarografia, evidenciando o estado de oxidação +IV para o tecnécio reduzido pela hidrazina.

O tecnécio-99 reduzido pela hidrazina mostra-se capaz de se incorporar à L-asparagina formando um composto cristalino de PF = $118,6^\circ\text{C}$. A análise por espectrofotometria de absorção no infravermelho mostra que os grupos comprometidos na ligação com o metal são os grupos amino e carboxila.

A preparação de L-asparagina marcada com tecnécio-99m usando como redutor hidrazina à temperatura de 60°C e 30 minutos de reação permite obter rendimento superior a 95%, sendo que o produto marcado pode ser apresentado sob esta forma radiofarmacêutica adequada.

Os ensaios de distribuição biológica em ratos da raça Wistar, pesando 50-60 gr, normais e portadores de carcinoma de Walker 256 mostram que o radiofarmaco concentra-se seletivamente no tumor, é excretado rapidamente pelos rins e não apresenta afinidade significativa por qualquer órgão, sendo adequado à formação da imagem tumoral.

S U M M A R Y

Preparation of L-asparagine complexes with technetium. Accumulation study of the ^{99m}Tc -labeled compound by lymphosarcoma Walker-256 bearing animals.

The purpose of this study is to prepare technetium chelated to L-asparagine in order to obtain a potentially useful radiopharmaceutical in nuclear medicine.

The reduction of pertechnetate anion ($^{99}\text{TcO}_4^-$ and $^{99m}\text{TcO}_4^-$) using hydrazine as a reducing agent is studied with use of polarographic spectrophotometric and chromatographic methods.

Spectrophotometric determination shows that the aqueous solution of ammonium ^{99m}Tc pertechnetate absorbs at 244, 248 and 290 nm. However after reduction the species absorbs at 330 and near 495-530 nm.

Polarographic measurements performed with 0,1 N NaOH electrolyte show a half-wave potential $E_{1/2} = -0,82$ V for technetium +VII. After the addition of increasing amounts of hydrazine into a solution containing Tc+VII, the half wave potential shifts to more positive values, indicating the reduction of Tc+VII to lower valence states.

Chromatographic determinations are in good agreement with polarographic analysis, emphasizing the Tc+IV valence state for technetium reduced with hydrazine.

The reduced ^{99}Tc by hydrazine shows ability of being incorporated into L-asparagine forming a crystalline compound with melting point $118,6^\circ\text{C}$.

Infrared absorption spectrometry shows that amino and carboxyl groups are bound to the metal in this complex. The yield of ^{99m}Tc incorporation into L-asparagine using hydrazine as the reducing agent at 60°C in 30 minutes is up to 95%.

The labeled complex can be presented as a radiopharmaceutical product.

Tissue distribution performed in groups of normal and bearing lymphoma Walker 256 Wistar rats (50-60) shows that the radiopharmaceutical concentrates selectively in the tumor and is fastly excreted by the kidney and it doesn't have significant affinity for any organ, being so adequate for the formation of tumoral images.

I. INTRODUÇÃO

I.1. PRODUTOS RADIOFARMACÊUTICOS LOCALIZADORES DE TUMORES

A literatura descreve uma variedade de tumores malignos e benignos de aparência e comportamento bastante diversos. Conseqüentemente, é improvável que seja idealizado um único radiofármaco capaz de detectar todas essas lesões.

Usualmente, o diagnóstico tumoral é feito por dois métodos: o primeiro depende das funções próprias do tecido normal não atacado pelo tecido maligno. Neste caso, o radiofármaco não se localiza no tumor e, durante o mapeamento, ele aparece como um nódulo frio ou seja uma área de baixa atividade dentro do órgão. A dificuldade deste tipo de diagnóstico é que o nódulo frio é não específico, originado por qualquer desordem que bloqueia a função normal do órgão. Outra dificuldade é que ocorre interferência de radioatividade no nódulo frio devido ao tecido que o rodeia. Um exemplo deste tipo de diagnóstico é a detecção de tumores de fígado com Rosa Bengala marcada com Iodo-131, em que a massa tumoral aparece como uma zona de menor atividade de dentro da massa de maior atividade, representada pelo tecido normal.

O outro método para a detecção de tumores é a visualização do próprio tumor, por meio das características próprias do neoplasma não encontradas no tecido normal. O tumor é assim visto como uma área de alta atividade ou "mancha quente", com resolução relativamente melhor que as áreas frias.

Alguns agentes de uso corrente são específicos para um tipo de tumor, enquanto outros são captados por uma grande variedade de neoplasmas e também por algumas desordens benignas. As características necessárias a um radiofármaco capaz de localizar tumores envolve aspectos tanto físicos quanto químicos e biológicos. A escolha do composto químico é mais difícil, não só devido à pequena quantidade de trabalho publicado a respeito, como também por causa das diferenças de necessidades biológicas entre o tumor e cada órgão. Para desenvolver um composto ideal quanto ao seu aspecto biológico, é necessário conhecer tanto a fisiologia e patologia dos tumores e lesões, quanto os mecanismos de concentração dos compostos usados normalmente na prática

médica.

Para POTCHEN⁽⁶⁰⁾ e colaboradores os mecanismos que concorrem para o aumento do tempo de permanência do radiofármaco no tumor incluem: aumento do volume sanguíneo de alguns tipos de tumores, aumento da permeabilidade vascular para macromoléculas devido ao aumento da microvasculatura na região do tumor, pinocitose de proteínas pelas células neoplásicas e diminuição da drenagem linfática.

Para SUBRAMANIAN⁽⁶¹⁾ e colaboradores as características tumorais que contribuem para formação da imagem no mapeamento são: aumento da atividade metabólica do tecido neoplásico em relação ao tecido normal, alteração do fluxo sanguíneo e da microvasculatura tumoral e a presença de antígenos.

A) Aumento da atividade metabólica do tecido neoplásico em relação ao tecido normal. Neste caso, os radiofármacos entram nas células tumorais como substratos metabólicos.

Para Mc CREADY e TROTT⁽⁵⁷⁾ a única característica histológica que poderia ser usada para marcar tumores seria a diferença de concentração de ácido desoxirribonucleico (DNA) entre o tumor e o tecido normal. Porém, o próprio DNA marcado não é capaz de produzir imagens "in vivo". Geralmente, as diferenças morfológicas são tão pequenas que é necessária muita experiência para reconhecê-las. Resta então a possibilidade de usar alguma característica do metabolismo tumoral, fisiológica ou da cinética celular, aspectos ainda pouco conhecidos. Um dos primeiros nuclídeos usados para a detecção de tumores foi o ^{32}P na forma de fosfato. A razão de seu emprego baseou-se no fato de que pensava-se ocorrer aumento da taxa de renovação de ácidos nucleicos nos tumores. Porém, sabe-se atualmente que o aumento da síntese do DNA não é característico de todos os tumores e que as modificações vasculares tem seu papel na localização do ^{32}P . Devido às suas características físicas, emissor β^- de alta energia (1,71 MeV), o ^{32}P não é conveniente para formação de imagem e avaliação de lesões superficiais.

Outro radionuclídeo, o selênio-75 administrado como selenito ou incorporado a aminoácidos entra rapidamente na síntese protéica, ligando-se a proteínas intracelulares. Seus aspectos inconvenientes são meia vida física (120 dias) e biológica (65 dias) elevadas. Além disto, o selênio é captado por tecidos normais como fígado e pâncreas.

Os tumores apresentam também modificação na cinética celular que, por sua vez, varia com o tipo de tumor. O crescimento tumoral resulta

em uma alteração tanto na produção como na perda de células. Assim, em um tumor que dobra de tamanho rapidamente, deve estar ocorrendo tanto uma rápida proliferação das células tumorais, quanto uma diminuição na perda de células. A prática tem mostrado que os tumores concentram alguns aminoácidos de maneira suficiente a permitir formação de imagem. Os tumores necessitam de substratos específicos para o seu crescimento, representados por aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos, que servem à síntese das proteínas, nucleoproteínas e lipídeos (ROTEMBERG⁽⁶⁹⁾ e colaboradores, SANDERS e KUHL⁽⁷⁸⁾, TATOR⁽⁸³⁾).

O aparecimento de ciclotrons abriu novas possibilidades à produção de radionuclídeos emissores gama dos principais componentes das matérias vivas, a saber: ^{15}O ($t_{1/2} = 2,05$ min.), ^{11}C ($t_{1/2} = 20,4$ min.), ^{13}N ($t_{1/2} = 10,0$ min.) e ^{18}F ($t_{1/2} = 109,7$ min.). Devido à alta atividade específica, esses radioisótopos podem ser usados para marcar substâncias que se encontram naturalmente em concentração muito baixa nos organismos vivos. Entretanto, por causa da meia-vida muito curta desses radionuclídeos e em virtude das técnicas usuais em marcação, a incorporação deles a compostos químicos torna-se difícil. Assim, no caso do ácido aspártico - ^{11}C , embora recomendado para a detecção de tumores, a incorporação de ^{11}C ao aminoácido ainda é difícil. Porém, já tem sido feita a síntese da gentamicina - ^{13}N , que foi capaz de revelar adenocarcinoma e linfosarcoma em cães (HAYES e EDWARDS⁽⁴⁷⁾). A literatura também relata um certo número de análogos fluorados de aminoácidos, capazes de agir como antimetabólitos, como fluorfenilalanina, fluortriptofano, fluortirosina e fluor,3 (3,4-dihidroxifenil) L-alanina (fluorDOPA). (ATKINS⁽⁷⁾, BLAU⁽¹⁶⁾ e colaboradores e TUBIS⁽⁸⁴⁾).

B) Alteração no fluxo sanguíneo.

O espaço vascular dentro dos tumores é cerca de três vezes aquele do tecido suporte normal. Este é um fator não específico, que resulta no aumento da concentração da maioria dos traçadores na área tumoral. Porém, a prática tem mostrado que nem todos os chamados tumores vasculares mostram uma concentração adequada dos marcadores vasculares comuns, como glóbulos vermelhos marcados com ^{51}Cr . (PATTERSON e Mc CREADY⁽⁶³⁾).

GULLINO⁽⁴³⁾ verificou que os tumores transplantados de ratos contêm aproximadamente 2,5 vezes mais espaço intersticial do que o fígado. Assim, as células tumorais estariam muito mais expostas à captação de nutrientes e outras substâncias através da membrana vascular do que as células normais, sendo o "pool" intersticial bastante significativo para a concentração transitória de material radioativo. A alteração do fluxo sanguíneo é o

fator principal na localização de agentes para mapeamento de tumores ósseos, a saber: ^{85}Sr , $^{87\text{m}}\text{Sr}$, ^{18}F e pirofosfato $^{201\text{m}}\text{Tc}$. Nestes casos, o mecanismo mais provável deve incluir maior vascularidade, metaplasia óssea e invasão óssea.

C) Alteração da microvasculatura

A permeabilidade da microvasculatura resulta na entrada de macromoléculas para o espaço intersticial. Este deve ser o fator responsável pela concentração transitória de vários agentes em lesões, por exemplo ^{67}Ga e ^{111}In ligam-se às proteínas plasmáticas logo após a administração intravenosa, sendo que a substância ligada à proteína é capaz de entrar para o espaço intersticial através dos poros da microvasculatura. (HAYES⁽⁴⁶⁾).

D) Presença de antígenos associados aos tumores

Com o descobrimento e isolamento de antígenos celulares tumorais, o desenvolvimento de anticorpos marcados parece promissor como agente diagnóstico tumoral altamente específico.

GULLINO⁽⁴³⁾ considera também os efeitos de pH como um fator importante. O autor verificou que o pH do fluido intersticial de tumores transplantados é de 0,3 a 0,4 unidades de pH mais baixas que o tecido normal. Porém, até o presente, não existem indicações seguras que tal diferença de pH possa aumentar a captação de agentes localizadores de tumores, ainda que GLICKSON⁽³⁹⁾ e colaboradores observaram um aumento na captação de ^{67}Ga por células L 1210 com a diminuição do pH.

Os agentes tumorais de uso corrente, como ^{67}Ga , ^{111}In , ^{206}Bi e as terras raras são sujeitos à hidrólise e podem existir na forma de hidróxidos em pH fisiológico ou próximo. Nestes valores de pH predominam as espécies $\text{Ga}(\text{OH})_3$ e $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$. A existência de pH mais baixo no tumor favorece a espécie $\text{Ga}(\text{OH})_3$, sugerindo assim um aumento na captação de gálio pelo tecido tumoral. Por outro lado, o Índio mesmo estando na forma de hidróxido em pH fisiológico, apresenta menor captação que o gálio.

Quanto à escolha do radionuclídeo, deve-se considerar o tipo de radiação emitida, intervalo de energias de fótons e meia-vida. Para McCREADY e TROTT⁽⁵⁷⁾ os radionuclídeos mais úteis deveriam ter as seguintes características: energia moderada de fótons, meia-vida curta e baixa proporção de radiação não penetrante, isto é, elétrons, pósitrons e raios-X me-

res que 15eV. Além destas, deve-se considerar se o radionuclídeo é capaz de se incorporar ao composto químico que se deseja.

I. . A ASPARAGINA

A asparagina é a amida do ácido monoaminodicarboxílico, de fórmula $\text{NH}_2\text{CO} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$, tendo sido isolada pela primeira vez, por DAMODARAN⁽²⁸⁾ e colaboradores em 1932, da edestina.

A asparagina, representada como Asp (NH_2), pode existir em duas formas isoméricas L e D. Ocorre naturalmente em várias raízes e sementes no estado livre, podendo ser isolada por maceração e extração com água quente. (FLORKIN e SOTZ⁽³⁴⁾, BELL⁽⁹⁾ e colaboradores).

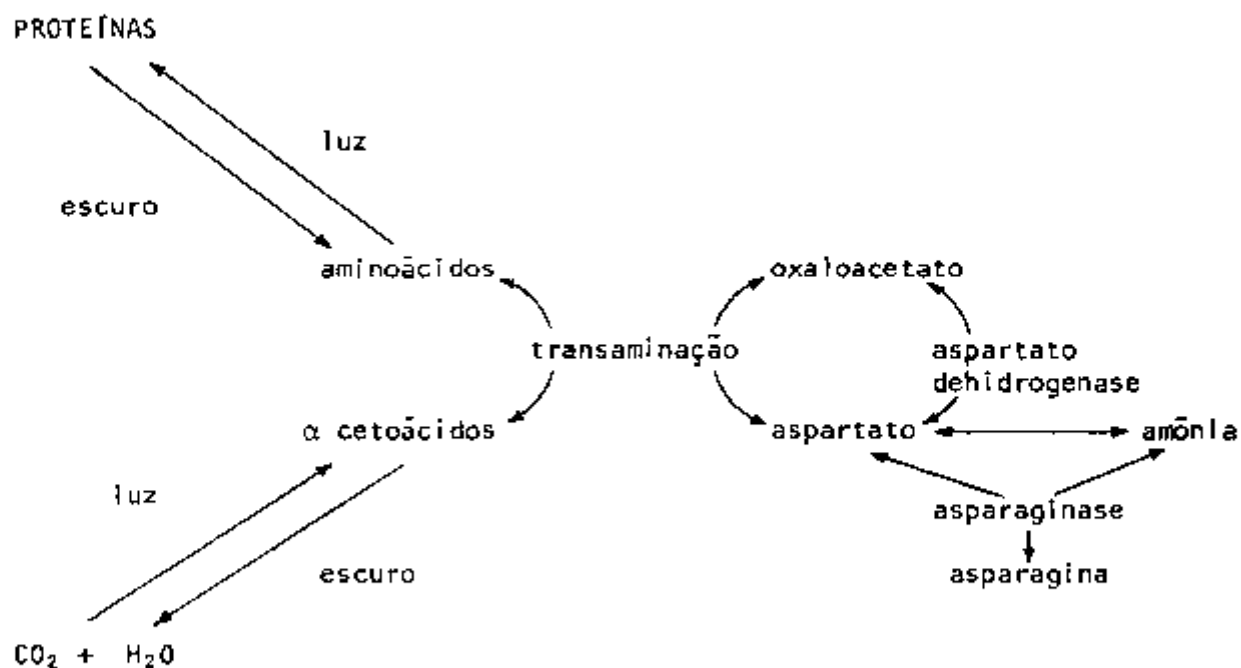
A síntese protéica parece ser o único papel preponderante da asparagina nos tecidos de mamíferos. Nesse caso, os amino grupos que provêm da asparagina, podem originar-se também de outros aminoácidos por transaminação ou da própria amônia, se esta estiver disponível.

Os aminoácidos não essenciais são produzidos pelos animais mesmo no caso de jejum protéico prolongado, indicando que os amino grupos devem ser estocados nos tecidos em uma forma inócua.

Em organismos superiores pouco se conhece a respeito da biossíntese da asparagina, sendo que sua formação já foi descrita por ARFIN⁽⁵⁾ a partir de ácido aspártico e glutamina por um sistema enzimático no fígado de embrião de galinha.

BALDWIN⁽⁸⁾ descreve detalhadamente a função da asparagina em sementes de *Lupinus luteus* considerando-a uma constituinte importante dos materiais das plantas, aonde teria a função de estocar nitrogênio.

O metabolismo do nitrogênio é esquematizado a seguir:



O processo de fotossíntese origina α -cetoácidos que correspondem aos aminoácidos necessários à síntese protéica. A transaminação nas plantas permite a transferência de amino grupos do aspartato para qualquer α cetoácido normal. O oxaloacetato surge na quebra de carboidratos e funciona como receptor de amino grupos em relação aos aminoácidos formados pela hidrólise das proteínas da semente.

O aspartato formado pela transaminação pode reagir com mais amônia, produzida pela desaminação ou transdesaminação de aminoácidos, para produzir asparagina. Este processo pode continuar pelo tempo em que existirem as reservas de proteínas.

Quando a planta tem acesso à luz, surge a clorofila e se inicia a fotossíntese. Esta leva à produção de α cetoácidos e, à medida que a concentração aumenta, passam a sofrer α transaminação às expensas de aspartato, de modo que se formam novos aminoácidos que participam da síntese protéica.

Como consequência da utilização do aspartato, ocorre a quebra da asparagina o que origina mais aspartato, que pode ser usado na transaminação e na formação de amônia. Esta pode ser empregada na aminação direta de mais α cetoácidos, originando mais aminoácidos para a síntese protéica.

Alternativamente, a amônia livre pode ser usada para sintetizar mais aspartato a partir de oxaloacetato. Conseqüentemente, a asparagina e o aspartato desempenham papel paralelo à glutamina e ao glutamato em outras

plantas e tecidos animais.

Este sistema toma parte importante na estocagem de amino grupos nos tecidos de muitas plantas. O aspartato também toma parte na transaminação e transamidação em alguns animais e tecidos de plantas bem como na ureogênese.

O aspartato e o glutamato também podem agir como agentes de transaminação para outros α -cetoácidos, praticamente aos correspondentes a todos os aminoácidos da natureza, e transformá-los em aminoácidos por transaminação. Além disto podem estocar grandes quantidades de nitrogênio na forma de asparagina, glutamina ou ambos.

PATTERSON e ORR⁽⁶⁴⁾ em 1968 relataram o isolamento de uma enzima, proveniente do hepatoma de Novikoff, capaz de sintetizar asparagina, bem como estudaram as propriedades e mecanismos de ação deste sistema enzimático. Os autores concluem que, aparentemente, o sistema enzimático capaz de sintetizar asparagina, no hepatoma de Novikoff, necessita de ácido L-aspartico, ácido adenosina-trifosfórico (ATP), Mg^{+2} e L-glutamina, no qual parece que o doador de amida primária nos mamíferos deve ser a L-glutamina. Os estudos indicam que a variação nos níveis de L-asparagina exôgena não devem ter efeito na velocidade de síntese da L-asparagina pelo tumor JA, um tecido que não exibe a necessidade nutricional pela L-asparagina em cultura de células.

COONEY e HANDSCHUMACHER⁽²⁷⁾ em 1970 observaram a biossíntese da L-asparagina em várias frações do fígado, sendo que diferentes formas de sintetase devem desempenhar papel separado na provisão deste aminoácido. Já foi determinado que a L-asparagina sintetase é uma enzima adaptativa do fígado de rato e que sua atividade aumenta durante a regeneração, falta nutricional de L-asparagina e durante uma eventual terapia que provoque a diminuição dos níveis desta amida no organismo do animal. Estes estudos têm implicações no tratamento de doenças dependentes de L-asparagina, uma vez que qualquer terapia, baseada na redução dos seus níveis deve levar em conta a sua contínua substituição pelo fígado. Assim, uma forma mais efetiva de quimioterapia seria alcançada combinando a falta de L-asparagina com o uso de agentes capazes de inibir sua utilização. Os animais portadores de tumores L-asparagina dependentes demonstram anormalidades no metabolismo deste aminoácido. Enquanto as células normais e as células de linfomas resistentes independem da quantidade de L-asparagina do meio para sobreviver, as células de tumores sensíveis necessitam de uma quantidade relativamente elevada de L-asparagina.

KIDD⁽⁵¹⁾ demonstrou que a capacidade de tumores asparagina depen

dentes em sintetizar proteínas, aumenta na ausência desta amida. Esse autor relatou que o soro total de cobaio era capaz de provocar a regressão de certos linfosarcomas transplantados em camundongos. Seus trabalhos indicaram que a substância responsável pela atividade antitumoral era uma proteína.

Em 1961 BROOME⁽²⁰⁾ apresentou evidências relacionando esta atividade à presença da enzima L-asparaginase do soro de cobaio.

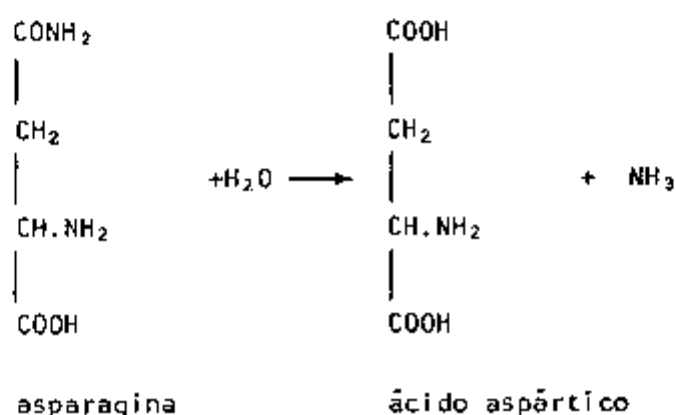
Em 1964 MASHBURN e WRISTON⁽⁵⁵⁾ descobriram uma asparaginase proveniente da *E. coli* que também apresentava atividade antilinfoma.

Já em 1922, CLEMENTI⁽²⁴⁾ havia descoberto a presença de asparaginase em soro de cobaias e a sua ausência em numerosos outros mamíferos incluindo rato, cão, gato, macaco e humanos. Posteriormente, a enzima foi encontrada no fígado de peixes, de cobaio e de galinhas, bem como no soro de animais pertencentes à superfamília Caviioidea, à qual pertencem os cobaias.

Antes de 1961 também já haviam sido descritas por SCHMALFUSS e MOTHES⁽⁷⁵⁾ várias asparaginases provenientes de microorganismos por exemplo *Aspergillus Niger* e em várias linhagens de *M. tuberculosis* por HALPERN⁽⁴⁴⁾ em 1957. O descobrimento de uma fonte bacteriana da enzima com atividade antilinfoma tornou possível preparar grandes quantidades de enzimas, bem como realizar estudos extensivos que ainda continuam.

PATTERSON e CIEGLER⁽⁶⁵⁾ relatam 123 espécies de bactérias com atividade L-asparaginase.

Quimicamente a asparaginase é uma amido-hidrolase (EC 3.5.1.1), capaz de catalizar a hidrólise irreversível da L-asparagina a ácido aspártico e amônia⁽⁸⁾.



Segundo BOYSE⁽¹⁸⁾ e colaboradores, BROOME⁽²¹⁾, HARTLEY⁽⁴⁹⁾, NEUMAN e Mc COY⁽⁵⁹⁾, o mecanismo pelo qual a L-asparaginase exerce efeito antitumoral ainda não está claro.

HANSHUMACHER e OSUMY⁽⁴⁵⁾, OLD⁽⁶¹⁾ e colaboradores mostram que a L-asparaginase é ativa contra numerosas formas de câncer, especialmente na leucemia linfática aguda.

Só em 1967 BROOME e SCHWARTZ⁽²²⁾ verificaram que a asparaginase é um potente inibidor tanto "in vivo" como "in vitro" das células de diversos tumores animais, sendo que em outros tipos de tumores, bem como no tecido normal, o crescimento celular não é afetado pela enzima. Segundo os mesmos autores, o crescimento das células de linfomas resistentes em cultura de tecidos independem da quantidade de asparagina do meio, enquanto que, mesmo para sobrevivência, as células sensíveis requerem uma concentração relativamente elevada (30-60µM) de asparagina. Os autores demonstraram que há produção de asparagina em células de linfomas em cultura; além disso parece que as células resistentes respondem à diminuição de asparagina exôgena, aumentando sua própria velocidade de síntese de asparagina, produzindo aminoácidos suficientes para a síntese normal de proteínas mesmo quando quantidades substanciais são perdidas para o meio.

A terapia da leucemia linfóide aguda e de linfossarcoma generalizado com L-asparaginase, já é prática corrente na medicina, conforme demonstram trabalhos de LEGUTKO⁽⁵²⁾ e colaboradores e SCHULER⁽⁷⁷⁾ e colaboradores.

Até o presente, poucos trabalhos tratam da incorporação de asparagina, marcada com radionuclídeos, em tumores sensíveis. Neste campo são pioneiros os trabalhos de ANGHILERI⁽³⁾ que em 1970 preparou um complexo de L-asparagina com crômio-51. Estudando a captação do complexo L-asparagina-⁵¹Cr em animais portadores de tumores sensíveis (Linfossarcoma 6 C₃ HED), o autor demonstrou a natureza metabólica deste acúmulo e os efeitos do tratamento pela L-asparaginase. Comparando a captação do complexo L-asparagina e do complexo ácido aspártico em animais normais, em animais portadores de carcinoma de Ehrlich (tumor não sensível) e em animais portadores de linfossarcoma 6 C₃ HED (tumor sensível), o autor verificou que, nos casos dos animais normais, a captação do complexo L-asparagina-⁵¹Cr é ligeiramente superior ao complexo ácido aspártico-⁵¹Cr. Para aqueles animais portadores de tumores sensíveis, a captação é praticamente a mesma, e para aqueles de tumores sensíveis, a captação do complexo de L-asparagina é quatro vezes superior a do complexo ácido aspártico. Observou ainda que o tratamento com L-asparagi

nase dobra a diferença.

Mais recentemente em 1971, ANGHILERI⁽⁴⁾ investigando a incorporação do complexo L-asparagina -⁵¹Cr em células de tumores sensíveis (Linfoma 6 C₃ HED), demonstrou a natureza metabólica desta incorporação.

Em 1977, YANO⁽⁸⁵⁾ descreveu a preparação de asparagina -⁶⁴Cu a partir de asparagina monohidratada e cobre-64, produzido em reator nuclear. O autor administrou o complexo em ratos portadores de linfoma L-2 e estudou a incorporação do produto no tecido tumoral e órgãos. Concluiu que a asparagina -⁶⁴Cu apresentava melhor relação tumor/tecido mole que o citrato de gálio-67.

A síntese de N-4 etil¹⁴C L-asparagina foi feita por DINEEN⁽²⁹⁾ em 1975.

Em 1974, GELBARD⁽³⁶⁾ e colaboradores prepararam L-asparagina marcada com nitrogênio-13 por meio de síntese enzimática e estudaram sua distribuição biológica em cães, observando certa afinidade do radiofármaco pelo miocárdio.

BELL⁽¹⁰⁾ em 1974 preparou asparagina marcada com ¹³N e estudou a possibilidade de usar a droga para mapeamento do miocárdio.

1.3. O TECNÉCIO

1.3.1. Generalidades

Em 1925, NODDACK, TACKE e BERG⁽⁶⁰⁾ anunciaram a descoberta do elemento 43, ao qual deram o nome de "Masmurium". Os autores basearam-se nos espectros de emissão de raios-X obtidos de concentrados de gangas de vários minerais como a columbita, gadolinita e outros. Porém, desde essa descoberta não foi possível repetir o experimento original.

Em 1937 PERRIER e SEGRÉ⁽⁶⁶⁾ (67), trabalhando na Itália, isolaram e estudaram o isótopo radioativo do elemento 43, obtido a partir de molibdênio irradiado. Assim o tecnécio (do grego: artificial), foi o primeiro elemento radioativo obtido artificialmente.

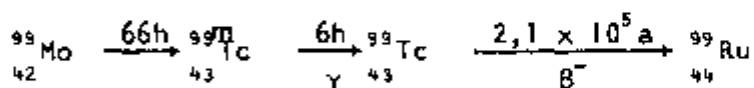
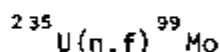
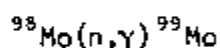
O tecnécio aparece na 7ª coluna da Tabela Periódica - Grupo VII a, mostrando várias características químicas do manganês.

Dos seus isótopos, quatro tem sido usados como traçadores:

	MEIA-VIDA
^{95m}Tc	60 dias
^{96}Tc	4,2 d
^{97m}Tc	91 d
^{99m}Tc	6 h

Os isótopos de massa 97, 98 e 99, têm meia-vida superior a 10^5 anos e são usados para o estudo da química do elemento em macroescala. Destes, o mais usado em medicina nuclear é o ^{99m}Tc (ANDERS⁽²⁾, COLTON⁽²⁶⁾, HARPER⁽⁴⁸⁾ e colaboradores).

O tecnécio-99m é descendente do molibdênio-99 ($t_{1/2} = 66$ horas) produzido em reator nuclear pelas reações:



Assim, a combinação $^{99}_{42}\text{Mo} - ^{99m}_{43}\text{Tc}$ constitui um par pai-filho, no qual o filho tem meia-vida mais curta.

Na prática, para se ter um chamado gerador de tecnécio, o molibdênio é fixado em coluna de vidro contendo alumina, sendo o tecnécio eluído na forma de pertecnetato de sódio com solução isotônica de cloreto de sódio.

Na forma de pertecnetato, o elemento pode ser utilizado, em medicina, para o mapeamento e estudo da fisiologia da tireóide e mapeamento do cérebro, das glândulas salivares e localização de tumores espinais (TUBIS⁽⁸⁴⁾).

As características principais que tornam o tecnécio-99m útil em medicina nuclear são: meia-vida curta ($t_{1/2} = 6\text{h}$), não é emissor β , decai por emissão de radiação γ de 140 KeV, o que favorece a detecção externa com uma dose mínima de radiação ao paciente. É possível preparar vários com

postos marcados com ^{99m}Tc de interesse radiofarmacêutico, conforme indicado por TUBIS⁽⁸⁴⁾.

1.3.2. Estados de Oxidação

A química do tecnécio é semelhante a do rênio e em menor extensão àquela do manganês. A forma mais estável é a do íon pertecnetato TcO_4^- semelhante ao íon permanganato MnO_4^- porém, um oxidante muito mais fraco. Conhecem-se compostos de tecnécio em todos os seus estados de oxidação de +VII a -I. Porém, em solução aquosa são mais estáveis o TcO_4^- e o TcO_2 insolúvel.

O tecnécio apresenta propriedades ácidas e básicas de modo que seu estado de oxidação e, como consequência seu comportamento químico dependerão do meio ácido ou alcalino em que se encontra.

Para que o tecnécio seja incorporado a produtos radiofarmacêuticos é necessário que ele se encontre em seus estados de oxidação mais baixos que +VII.

As substâncias redutoras mais usadas, frequentemente, são: cloreto estanoso, ácido clorídrico e ácido ascórbico, cloreto ferroso e borohidreto de sódio. O pertecnetato também pode ser reduzido eletroliticamente ainda que, quando se usam eletrodos de zircônio e estanho ocorra normalmente a presença de agentes redutores metálicos. Os métodos físicos empregados para estudar as formas reduzidas do tecnécio incluem redução polarográfica das soluções de tecnécio +VII, dados espectrofotométricos, coulometria, eletroforese e extração por solventes. Devido à pequena quantidade de tecnécio-99 geralmente disponível, o estudo dos estados de oxidação do tecnécio tem sido feitos com compostos análogos de rênio, devido à semelhança de comportamento químico entre estes dois elementos.

Em 1959 BOYD⁽¹⁷⁾ usando como redutores o cloreto estanoso e o sistema $\text{HCl}/\text{HF}/\text{KI}$ conseguiu evidenciar o estado de oxidação +IV por meio de método de espectroscopia de absorção no ultravioleta.

Os mesmos resultados foram obtidos por BUSEY⁽²³⁾ em 1959, usando como redutor o íon estanoso em ácido clorídrico 1 N, bem como por BESNARD⁽¹⁴⁾ e colaboradores.

Segundo SALARIA⁽⁷²⁾ e colaboradores em 1963, a redução do pertecnetato pelo ácido ascórbico resulta em uma banda de absorção em 485 nm.

correspondendo ao tecnécio no estado de oxidação (+IV).

Por meio da polarografia SALARIA⁽⁷³⁾ e colaboradores descrevem a primeira onda como um processo de difusão de $3e^-$, irreversível, que ocorre no potencial de meia onda $E_{1/2} = a - 0,78 V$ a $-0,80 V$.

GERLIT⁽³⁸⁾ em 1955, verificou que o ácido clorídrico reduz o tecnécio heptavalente, chegando a esta conclusão pela observação de que não ocorre coprecipitação do tecnécio durante a precipitação do sulfato de rênio em solução de ácido clorídrico 9N. O autor provou que neste meio o Tc+VII é reduzido a Tc+IV. Tanto o rênio como o tecnécio são extraídos em meio neutro com numerosos álcoois, cetonas e aminas e, em meio alcalino, por cetonas, piperidina e piperidina. Porém, nem o tecnécio, nem o rênio podem ser extraídos com solventes não polares.

Dados experimentais obtidos por esse autor mostram que, com agentes redutores fracos como a hidrazina em meio alcalino a frio, o per_tecnetato é reduzido ao estado de oxidação mais baixo, não sendo extraído nem por cetonas, piperidina ou mesmo coprecipitado com hidróxido fêrrico. Nes_tas condições é coprecipitado quantitativamente com oxiquinolato de molibdê_nio e molibdatos de prata e chumbo, o que indicaria a sesquivalência do ele_mento.

Os dados obtidos pelo autor mostraram que o tecnécio em meio ácido sulfúrico pode ser reduzido ao estado tetravalente por hidrazina, hidroxilamina, ácido ascórbico e cloreto estanoso.

Em meio alcalino essa redução ocorre após fervura prolongada. Em meio clorídrico, a redução depende da temperatura e concentração do ácido. Por estudos de coprecipitação com compostos similares de rênio, o autor verificou que, em meio ácido, o tecnécio tetravalente encontra-se como dióxido hidratato enquanto que, em meio alcalino, estaria como hidróxi_do.

Segundo COLTON⁽²⁶⁾ o espectro de absorção do íon pertecne_tato é bem conhecido e apresenta picos característicos em 244, 248 e 290nm .

GOLCHERT e SEDLET⁽⁴⁰⁾, em 1967 observaram que a redução pelo ácido ascórbico pode dar um estado pentavalente e que o produto absorve em 490 nm.

Para ASTHEIMER e SCHWOCHAU⁽⁶⁾ o nível +V é um intermediã_rio importante na redução polarográfica de soluções de pertecnetato neutro

ou alcalino.

MAJUMDAR⁽⁵³⁾ e colaboradores em 1969, usando métodos de estudos espectrofotométricos demonstraram que o pertecnetato fundido em hidróxido de sódio apresenta absorções em 345, 420 e 570 nm, o que se deve provavelmente a espécies meso ou orto. Os autores acompanharam, espectrofotometricamente, a redução do pertecnetato com hidrazina em meio alcalino evidenciando a formação de um estado intermediário Tc+IV ou +V de cor vermelha, antes de seu desproporcionamento a Tc + VII e TcO₂. A cor vermelha ou rósea se desenvolve rapidamente e logo se inicia o escurecimento e precipitação de TcO₂.

ECKELMAN⁽³⁰⁾ e colaboradores em 1970, determinaram o estado de oxidação do tecnécio, em diferentes concentrações até o nível de livre de carregador, produzido por vários agentes redutores usando ácido dietileno triamino penta acético (DTPA) para quelar as espécies reduzidas, assumindo que esse composto é capaz de quelar especificamente o estado de oxidação +IV. Os sistemas redutores usados pelos autores foram: íon estanoso, ácido clorídrico concentrado, HCl/HI/KI e HCl/H₃PO₂, ácido ascórbico/íon ferroso, íon fêrrico/ácido ascórbico e tiocianato. O tecnécio ao nível de carregador é reduzido ao estado pentavalente com tiocianato, ácido clorídrico concentrado e, ao estado tetravalente com os outros redutores.

Os autores concluíram que para a complexação com DTPA o tecnécio deve ser reduzido, tanto ao nível de carregador como livre de carregador com um agente redutor forte, como o íon estanoso ou íon ferroso mantido em meio ácido afim de prevenir a hidrólise ao estado +IV. Além disto, o experimento deve ser realizado em atmosfera de nitrogênio para prevenir a oxidação do tecnécio.

HODARA⁽⁵⁰⁾ e colaboradores em 1972, estudando a redução do pertecnetato por várias maneiras, demonstraram que o ácido ascórbico e o metamisol (1 fenil 2,3 dimetil 5 pirazolona 4 metil amino metano sulfonato) reduzem aquele íon em solução de ácido clorídrico 2M.

A redução foi observada pelo desaparecimento quase completo da primeira onda nos polarogramas das soluções reduzidas. Os autores verificaram que o ácido ascórbico a 70°C reduz o pertecnetato apenas parcialmente, enquanto, sob as mesmas condições, a redução com o metamisol é quantitativa. Após a redução química, as soluções adquirem uma coloração rosa indicando a presença de Tc+IV. Aparentemente, com estes redutores, não há redução posterior para Tc+III ou então, a solução teria se tornado verde. Por

razões práticas os autores concluem que é conveniente reduzir o TcO_4^- com ácido ascórbico ou metanizol em solução de ácido clorídrico 2M e aquecimento por 15 minutos a $70^\circ C$.

Nos estudos de redução coulométrica, os autores fizeram eletrólise com catodo de mercúrio e corrente de 1 mA. Durante a eletrólise a solução se torna amarela e rosa, no final. O número de elétrons necessários à redução total mostrou que o tecnécio é provavelmente reduzido ao metal em potenciais mais negativos que -1,09 V. Os autores não identificam os estados de oxidação intermediários formados no decurso da redução.

GOLDSTEIN⁽⁴¹⁾ e colaboradores em 1972, investigando o estado de oxidação produzido quando o íon pertecnetato (^{99}Tc) em solução clorídrica é reduzido quimicamente com íon estanoso ou, eletroquimicamente com eletrodo de zircônio, verificaram pelas curvas de titulação potenciométricas, que o Tc+VII é reduzido a Tc+V, sendo que grande excesso da solução estanosa não foi capaz de provocar redução posterior. Usando cloreto estanoso marcado com estanho-113 o autor observou que o tecnécio reduzido não está associado ao íon estanoso ou estânico.

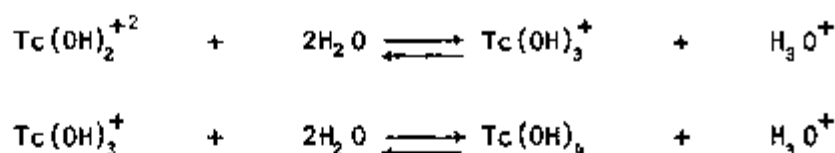
BRATU⁽¹⁹⁾ e colaboradores em 1975 estudando os estados de oxidação mais baixos do tecnécio nas condições de preparação de produtos radiofarmacêuticos, usando métodos de polarografia e cerimetria, verificaram que a redução do Tc+VII pelo ácido ascórbico em ausência de HCl leva a Tc+V, mas em presença de HCl a 20% forma-se Tc+IV. Os autores demonstraram que a redução do Tc+VII pelo cloreto estanoso procede só até Tc+V. Os estudos de redução polarográfica do Tc+VII em eletrólito não aquoso, acetonitrila, indicaram a grande tendência das espécies reduzidas se hidrolizarem. As espécies, $TcO(OH)^+$, $TcO(OH)_2$ para a espécie +IV e $TcO(OH)_2^+$ para o Tc+V, influenciam a capacidade de ligação do tecnécio durante sua incorporação a produtos radiofarmacêuticos.

O comportamento polarográfico do ^{99}Tc com eletrólitos aquosos indica a presença de diferentes espécies reduzidas, dependendo da natureza do eletrólito, do agente complexante e da acidez. Em eletrólitos KOH 0,1 M, NaOH 0,1 M ou KCl 0,1 M foi observada apenas uma fase de redução correspondendo à transferência de $2e^-$ ($Tc+VII \rightarrow Tc+V$, $E_{1/2} = -0,8V$). Em potenciais superiores, ocorre evolução catalítica de hidrogênio a partir de íons hidrogênio da água.

Os eletrólitos aquosos contendo solução de KCN 0,1 M e so

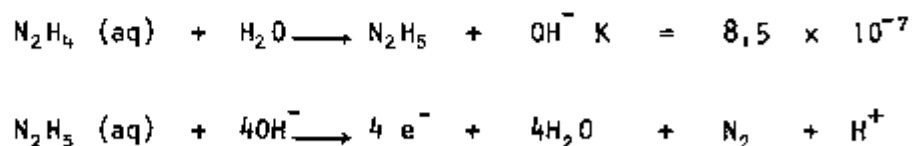
lução de citrato de sódio 1 M levaram à transferência de $3 e^-$: (Tc+VII \rightarrow Tc+IV em $E_{1/2} = -0,88$ V), sendo que em potenciais superiores a $-0,98$ V foi observada reação catalítica. Em solução de HCl 20% os autores observaram redução de Tc+VII por transferência de $3 e^-$. Adicionando mistura de ácido ascórbico e cloreto férrico à solução de HCl 20%, os autores notaram a mesma redução de Tc+VII, enquanto em ausência de HCl a redução levou apenas a Tc+V. Em todos os casos observaram reações catalíticas em $E_{1/2} = -1,4$ V. O comportamento do Tc em HCl 20% foi explicado pela formação do ânion $TcCl_6^{2-}$ cuja estabilidade é maior que o complexo Tc-ácido ascórbico.

OWUNWANNE⁽⁶²⁾ e colaboradores, em 1977, usando técnica de distribuição de troca catiônica, determinaram que a carga das espécies de tecnécio produzidas na redução de pertecnetato pelo íon estanoso em pH=2 é de +11, sendo que as espécies com esta carga são tanto o íon dihidroxitecnato $Tc(OH)_2^{+2}$, como o íon oxotecnato TcO_2^{+2} . Estas espécies são hidrolizadas ao dióxido de tecnécio dihidratado ($TcO_2 \cdot 2H_2O$) em pH mais altos. Estes estudos foram feitos com tecnécio livre de carregador, aplicando-se portanto às situações rotineiras que existem na preparação de radiofármacos com tecnécio-99m. Os autores ainda indicam que em pH 2,0 o íon $Tc(OH)_2^{+2}$ tem a tendência a hidrolizar segundo o esquema:



Os autores conseguiram isolar o dióxido de tecnécio dihidratado $TcO_2 \cdot 2H_2O$ reduzindo o $^{99}TcO_4^-$ com Sn^{+2} e contrifugando o precipitado. Geralmente a forma coloidal não reativa da espécie $TcO_2 \cdot 2H_2O$ é chamada de "tecnécio reduzido hidrolizado" e encontrada em radiofármacos marcados com ^{99m}Tc .

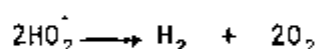
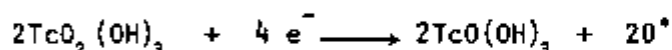
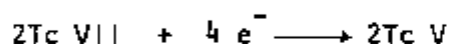
GALATEANU⁽³⁵⁾ e colaboradores, em 1977, verificaram por polarografia que a redução do Tc+VII pela hidrazina em solução aquosa e pH 11 é muito rápida, neste pH a dissociação da hidrazina é completa.



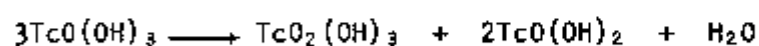
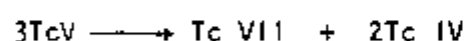
Usando métodos polarográficos, o autor demonstrou que o tecnécio é reduzido aos estados +V e +IV e, assim é capaz de se incorporar a produtos radiofarmacêuticos. Os autores estudaram a formação de espécies re

duzidas e hidrolizadas do tecnécio por métodos polarográficos também em eletrólito não aquoso, observando que tanto em eletrólito aquoso como não aquoso ocorre a transferência de $3 e^-$ correspondente à redução de Tc+VII para Tc+IV em $E_{1/2} = -0,98$ V. Por outro lado, a redução com hidrazina em meio aquoso pH = 11 e concentração de hidrazina $1,5 \times 10^{-3}$ M indicou apenas uma fase de redução, correspondente à transferência de $2e^-$ em $E_{1/2} = -0,85$ V, o que demonstra o papel da hidrólise do tecnécio durante a redução. Segundo os autores, a espécie hidrolizada de Tc+VII se decompõe durante a redução formando íons OH^- e H^+ os quais originam ondas catalíticas em $E_{1/2} = -1,4$ e $-1,7$ V. Esses íons podem ser originados também pelo desproporcionamento de espécies hidrolizadas e reduzidas do Tc+V e +IV. As reações que se passam na redução do Tc+VII em sua forma hidrolizada parecem ser:

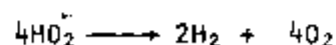
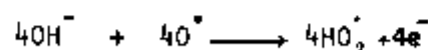
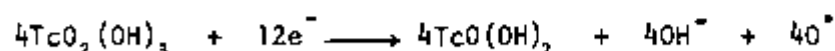
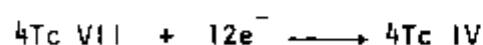
1. Redução de Tc+VII a Tc+V pela hidrazina



O TcV é instável e se decompõe segundo:

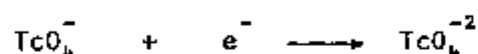


2. Redução de Tc VII a Tc IV pela hidrazina



SHUKLA⁽⁷⁶⁾ em 1978, descreveu as condições de redução do tecnécio +VII pelo ácido clorídrico e separou os estados reduzidos +V e +IV por cromatografia ascendente. O tecnécio +IV mostrou-se estável em solução diluída de ácido clorídrico e em solução fisiológica. Segundo o autor, a redução ocorre via tecnécio +V, dando como produto final tecnécio +IV, cromatograficamente puro.

Também em 1978 RUSSEL e CASH⁽⁷¹⁾ identificaram os produtos da redução eletrolítica do íon pertechetato em vários meios encontrando $E_{1/2} = -0,8$ V para a primeira onda em meios alcalino ou não tamponado e, algumas vezes, encontraram uma segunda onda em $E_{1/2} = -1,0$ V sendo que em todas as condições investigadas a redução se mostrou irreversível. Para os autores, as espécies reconhecidamente estáveis em meio alcalino não complexante são TcO_4^- e TcO_2 insolúvel. Em meio alcalino tamponado a primeira onda ocorre em $-0,80$ V independente da presença de agentes complexantes e, provavelmente, corresponde à fase determinante da velocidade:



A segunda onda geralmente é vista em $-1,0$ V, especialmente quando existe baixa concentração de pertechetato, correspondendo a valores de n entre 4 e 5.

O emprego generalizado de numerosos compostos marcados com tecnécio-99m tornou necessário o desenvolvimento de técnicas adequadas de controle de qualidade, a fim de detectar o estado de oxidação do ^{99m}Tc não ligado, bem como o rendimento de marcação dos radiofármacos.

Segundo ECKELMAN⁽³²⁾ (32) e colaboradores (1971 e 1972), o cromatograma em papel desenvolvido em metanol 85% não distingue entre o produto marcado e o tecnécio não ligado, que os autores tratam de tecnécio reduzido +IV hidrolizado. Em trabalhos posteriores⁽³³⁾ os autores estabeleceram o uso simultâneo de cromatografia em papel, usando solução salina e cromatografia em gel de Sephadex para separar as espécies hidrolizadas, complexadas e pertechetato livre, não reduzido.

BILLINGHURST⁽¹⁵⁾ (15), em 1973, estudando os procedimentos de controle de qualidade, para diversos radiofármacos por cromatografia em papel, camada delgada, eletroforese em papel e cromatografia em gel de Sephadex conclui que o sistema sílica gel e solução salina é muito rápido, de modo a não causar oxidação significativa e conseqüente espalhamento no cromatograma. O sistema em solução salina é mais lento e, conseqüentemente, afetado pelo oxigênio atmosférico, não parecendo adequado ao controle de rotina. O sistema metanol 85% em papel ou sílica já mostra algum espalhamento de mancha cromatográfica devido à oxidação atmosférica. Os sistemas mais promissoras seriam acetona e acetato de butila em sílica gel. Os maiores causadores de discrepâncias entre os resultados obtidos se devem à oxidação atmosférica, traços de impurezas nos solventes ou ao mau empacotamento das colunas cromatográficas.

tográficas.

Até 1974, segundo STELMACH e QUINN⁽⁷⁹⁾, os sistemas cromatográficos usados correntemente para os compostos de tecnécio-99m incluíam: colunas de Sephadex G-25 ou de sílica gel e eluição do radiofármaco marcado com solução fisiológica como solvente; cromatografia em camada delgada usando sílica gel como fase suporte e metanol 85% como solvente. Tais sistemas permitiam separar o composto marcado, pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) não ligado e pertecnetato reduzido hidrolizado.

Em 1976, COLOMBETTI⁽²⁵⁾ e colaboradores, apresentaram um método micro-cromatográfico, chamado "Mickrom" usado para investigar a pureza radioquímica dos radiofármacos marcados com ^{99m}Tc e o estado de oxidação do tecnécio não ligado. A técnica emprega uma base de celulose recoberta com sílica gel como fase estacionária e duas fases móveis: solução salina e acetona. A solução salina é utilizada para separar o ^{99m}Tc reduzido não complexo do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tecnécio complexo, enquanto a acetona é usada para separar $^{99m}\text{TcO}_4^-$ do ^{99m}Tc reduzido não complexo e complexo. Neste método, o efeito de oxidação do ar é muito pouco pronunciado porque a separação leva apenas 45 segundos.

ZIMMER⁽⁸⁵⁾, em 1977, estabeleceu um sistema cromatográfico miniaturizado bastante rápido, semelhante ao anterior, e que pode ser usado facilmente para todos os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc . O sistema consiste de papel Whatman 31 ET e acetona como solvente, papel Gelman ITLC-SG juntamente com solução fisiológica como solvente e papel Gelman ITLC-SA e acetona.

II. PROPOSIÇÃO

Pelo exposto no capítulo anterior, verifica-se que a química do tecnécio ainda é complexa e os estados de oxidação pouco definidos para uma variedade de reações, apesar da importância cada vez maior de produtos farmacêuticos marcados com ^{99m}Tc para fins de diagnóstico na cintilografia médica.

A marcação de compostos com ^{99m}Tc consiste na redução do pertecnetato a estados de oxidação mais baixos e incorporação destes ao produto de interesse. O redutor mais comumente utilizado é o cloreto estanoso, entretanto, seu uso em preparações radiofarmacêuticas está condicionado pelos fatores: decomposição química causada pela oxidação do Sn^{+2} a Sn^{+4} , presença de elementos traços, hidrólise do Sn^{+4} e formação de solução coloidal (GALATEANU⁽³⁵⁾ e colaboradores). Em geral, é necessário usar excesso de cloreto estanoso. Entretanto por causa da toxicidade desse reagente, seu uso não é altamente recomendável.

Dada a importância da asparagina no estudo de tumores asparagina dependentes, havendo na literatura poucos informes relativos ao uso de asparagina marcada com radionuclídeos e não tendo sido encontrados trabalhos de marcação dessa amida com ^{99m}Tc , são os seguintes os propósitos deste trabalho:

1. Estudar as condições de redução do íon pertecnetato com hidrazina e sulfato de hidrazina, bem como caracterizar as formas reduzidas por espectrofotometria de absorção no visível, polarografia e cromatografia.
2. Preparar o complexo L-asparagina-tecnécio-99 e analisá-lo, mediante análise por espectrofotometria de absorção no infravermelho, e estudo cinético da reação.
3. Estudar as condições de marcação e estabilidade da L-asparagina com tecnécio-99m e sua apresentação em forma radiofarmacêutica adequada.
4. Estudar a distribuição biológica do produto marcado com tecnécio-99m em animais normais e sua toxicidade.

5. Estudar a distribuição biológica do produto marcado com tecnécio-99m em animais portadores de tumores sensíveis (carcinoma de Walker 256).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. MATERIAIS

III.1.1. Reagentes e Soluções Empregadas

a) Tecnécio-99 na forma de pertechnetato de amônio, procedência New England Nuclear, (NEN), USA, concentração radioativa 1,0 mCi/ml e concentração de pertechnetato ($^{99}\text{TcO}_4^-$) $5,87 \times 10^{-3}$ M. Preparou-se uma solução -1 diluindo 0,1 ml da solução original a 10 ml, resultando em uma concentração de pertechnetato $5,87 \times 10^{-4}$ M. A solução -2 foi obtida a partir de 1,0 ml da solução-1 diluindo a 50,0 ml em água bidestilada. A solução final resultou em concentração química igual a $1,17 \times 10^{-4}$ M. Esta concentração final foi confirmada por medida absoluta da radiação β com um erro de 15%.

b) O tecnécio-99m foi obtido em solução salina (NaCl 0,9%) por eluição de um gerador $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ com 100-200 mCi de atividade, procedência NEN.

c) AL-asparagina monohidratada (PM=150,1) de procedência SIGMA foi recristalizada e guardada em dessecador a vácuo.

d) A hidrazina hidratada ($\text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), de PM=50,06 e $d_4^{20} = 1,03$ de procedência MERCK foi titulada pelo método descrito na Farmacopéia Britânica⁽⁵⁶⁾, tendo sido encontrado grau de pureza de 97%. Preparou-se uma solução $3,97 \times 10^{-4}$ M (solução -3), guardada em geladeira.

e) Sulfato de hidrazina ($\text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$) de PM=130,13 de procedência BAKER foi secado em dessecador e usado sem maior purificação.

f) Solução anticoagulante de oxalatos: consistiu numa mistura de oxalato de amônio (J.T.Baker) e oxalato de potássio (J.T.Baker).

g) O líquido cintilador foi preparado com: 4g de 2,5 difeniloxazol (PPO), 200mg de 1,4 bis - 2(5 fenil oxazolil) benzeno (POPOP), 1 litro de tolueno.

Todos os demais reagentes foram de grau analítico e usa dos sem mais purificações.

III.1.2. Animais

Utilizamos, em nosso trabalho, ratos de raça Rattus norvegicus variedade Albinus, linhagem Wistar, machos, pesando de 50 a 60 gramas, obtidos de colonias mantidas no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Estes animais foram divididos em grupos experimentais, cada grupo com cinco animais. A ração e a água foram fornecidas "ad libitum!"

III.1.3. Equipamentos

Nas medidas polarográficas usamos o instrumento Polarecord E 261 marca Methron A.G. Herizau, Schweiz, de gota pendente de mercúrio, e solução de hidróxido de sódio 0,1 N como eletrólito suporte.

O instrumento pHmeter, E520 Metrhom foi usado para usa do para as medidas de pH.

Os espectros de absorção nas regiões visível e ultra violeta foram obtidos com o Espectrofotometro Perkin Elmer, modelo Coleman 139 com cela de quartzo de 1 cm.

Os espectros de absorção na região do infravermelho fo ram obtidos com o Infra Red Spectrophotometer, Perkin Elmer.

As contagens de amostras contendo tecnécio-99m (radiação gama) foram obtidas com emprego do detector de cintilação do tipo cristal de poço de iodeto de sódio ativado com tálio (Automatic gama counting system, Nuclear Chicago Corporation).

No caso de tecnécio-99 (radiação β) usou-se o contador de cintilação líquida orgânica (LKB Wallace 8100).

Para medidas de atividade usamos o Curiômetro "Mediac", Nuclear Chicago, modelo 6362, Estados Unidos.

Para medidas absolutas de radiação foi usado o Detector Proporcional fabricado no Centro de Operação e Utilização de Reatores de Pesquisas. Área Física Nuclear. Laboratório de Metrologia Nuclear do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (COURP.AFN.LMN/IPEN).

III.2. METODOS

III.2.1. Estudo dos Redutores e Caracterização dos Estados de Oxidação do Tecnécio.

Esse estudo foi efetuado por meio de medidas ópticas, potenciométricas e cromatográficas.

III.2.1.1. Medidas Ópticas

Utilizaram-se balões volumétricos de 10ml com volumes variáveis de solução -2 (item I.1.1) de pertechnetato de amônio ^{99}Tc e volumes variáveis de solução -3 de hidrazina (item III.1.1). Ajustou-se o pH para 8 com solução de hidróxido de sódio 0,1 N sendo o volume total acertado para 10ml com água bidestilada.

Obtivemos as concentrações seguintes, para a hidrazina: $1,98 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$, para o pertechnetato ^{99}Tc : $1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$, $5,85 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1,17 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Os espectros de absorção, na região visível e ultravioleta, das soluções resultantes foram feitos em diferentes intervalos de tempo contra um branco constituído pelas soluções correspondentes de hidrazina com água bidestilada.

III.2.1.2. Medidas Potenciométricas

Em primeiro lugar, construiu-se uma curva padrão relacionando a concentração de pertechnetato com a altura da corrente

(Id). Foram usadas as seguintes concentrações: $3,04 \times 10^{-7} M$; $2,81 \times 10^{-7} M$; $2,57 \times 10^{-7} M$; $2,11 \times 10^{-7} M$; $1,17 \times 10^{-7} M$; $0,58 \times 10^{-7} M$ e $0,28 \times 10^{-7} M$ obtidas a partir da solução 2 (Ítem III.1.1) diluída 50 vezes.

Em balões de 10ml colocou-se 1,1ml de solução -2 diluída 1:50 de pertecnetato de amônio ^{99}Tc de modo a se ter concentração de $^{99}TcO_4^-$ $2,57 \times 10^{-7} M$ e quantidades variáveis de hidrazina de maneira a resultar concentrações $0,49 \times 10^{-5} M$; $0,99 \times 10^{-5} M$; $1,98 \times 10^{-5} M$ e $3,97 \times 10^{-5} M$. Em cada caso o pH da solução foi acertado para 8 com solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Os polarogramas foram registrados 30 minutos após a adição dos reagentes.

Para cada caso calculou-se o potencial de meia-onda e a altura da onda polarográfica.

Por meio da curva padrão calculou-se a porcentagem de tecnécio reduzido para cada concentração de hidrazina. A solução reduzida foi analisada por cromatografia ascendente em papel Whatmann 3 MM e solução de ácido clorídrico 0,6 N.

III.2.1.3. Medidas Cromatográficas

A reação da redução do íon $^{99}TcO_4^-$ pela hidrazina foi estudada cineticamente a partir de soluções de hidrazina $3,97 \times 10^{-5} M$ e pertecnetato $2,57 \times 10^{-7} M$ em temperatura ambiente ($25^\circ C$). Ajustou-se o pH para 8 com solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Retiraram-se amostras de reação em intervalos regulares de tempo, entre 0 e 120 minutos, analisadas imediatamente por cromatografia ascendente em papel Whatman 3 MM, usando solução de ácido clorídrico 0,6 N como fase móvel, segundo o método descrito por SHUKLA⁽⁷⁵⁾.

Após a corrida cromatográfica, o papel foi cortado em tiras de 0,5cm de largura num total de 30, eluídas no líquido cintilador (PPO/POPOP/tolueno) e a sua atividade lida no cintilador líquido.

Analogamente estudamos a reação de redução do pertecnetato de sódio ^{99m}Tc com solução de hidrazina $3,97 \times 10^{-5}$ a $25^\circ C$ e $60^\circ C$ e com solução de sulfato de hidrazina $4,0 \times 10^{-5} M$ a $60^\circ C$.

Estudou-se também a redução do íon $^{99m}TcO_4^-$

com a mistura de hidrazina e sulfato de hidrazina. Manteve-se constante a concentração de hidrazina em $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ e variaram-se as concentrações de sulfato de hidrazina em $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$. O procedimento da análise foi igual aquele em que se usou o íon $^{99}\text{TcO}_4^-$, sendo as medidas de atividade feitas no cintilador gama.

Os resultados obtidos, tanto com ^{99}Tc como com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram analisados por computador IBM 370/155, programa denominado ANACRON⁽⁴²⁾ (Programa computacional para análise de cromatogramas), para determinar a percentagem de tecnécio reduzido e não reduzido, bem como o Rf dos picos de atividade obtidos. Calculou-se o Rf pela relação entre o valor estimado para o parâmetro centro e o número total de observações = 30.

III.2.2. Padronização dos Parâmetros Adequados à Complexação da L-asparagina com Tecnécio-99.

III.2.2.1. A Preparação do Complexo

Inicialmente, estudou-se a preparação do complexo entre L-asparagina e ^{99}Tc no decorrer do tempo, mantendo-se constante a concentração da amida em $4,00 \times 10^{-2} \text{ M}$ e variando-se a concentração de pertecnato em $2,34 \times 10^{-6}$; $1,17 \times 10^{-5}$ e $2,34 \times 10^{-5} \text{ M}$. Utilizou-se uma solução de hidrazina $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$. Os experimentos foram realizados em temperatura de 25°C , $\text{pH}=8,0$ e volume total de 5 ml.

Em seguida, mantendo-se fixa a concentração de $^{99}\text{TcO}_4^-$ $1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$ e o tempo de reação, estudou-se o rendimento de formação do complexo em função da variação de concentração de L-asparagina em $1,33 \times 10^{-2} \text{ M}$; $2,66 \times 10^{-2} \text{ M}$; $4,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $5,33 \times 10^{-2} \text{ M}$ e $8,0 \times 10^{-2} \text{ M}$.

A reação foi acompanhada retirando-se amostras em intervalos regulares de tempo analisando-as imediatamente por cromatografia Michron conforme apresentado por COLOMBETTI⁽²⁵⁾ e colaboradores.

As frações dos cromatogramas correspondentes ao complexo ^{99}Tc , $^{99}\text{TcO}_4^-$ e tecnécio reduzido hidrolizado foram separadas, eluídas no líquido cintilador (III.1.1) e a sua atividade medida no contador de cintilação.

III.2.2.2. Análise do Complexo

O complexo foi preparado a partir de soluções de L-asparagina $4,00 \times 10^{-2}$ M, pertecnetato ^{-99}Tc , $1,17 \times 10^{-5}$ e hidrazina $3,97 \times 10^{-5}$ M em temperatura ambiente, pH=8,0 sendo o volume total de 5,0ml. Após 90 minutos de reação a solução foi filtrada, evaporada em corrente de nitrogênio e resfriada a 4°C .

Depositaram-se cristais brancos brilhantes do complexo. Estes foram então levados com água gelada e, após a deposição dos cristais a solução foi decantada. Os cristais foram, finalmente, secados em dessecador, determinado seu ponto de fusão (aparelho Mettler FP 5) e submetidos às análises.

III.2.2.3. Estudo da Estabilidade do Complexo

O estudo da estabilidade foi realizado por espectrofotometria na região visível e ultravioleta e análise cromatográfica, durante as 72 horas que se seguiram à preparação.

III.2.2.4. Espectros na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho na faixa de 600 a 4000cm^{-1} foram obtidos por meio de um aparelho registrador Perkin Elmer, modelo 710 A empregando-se o método de pastilhas de KBr.

Com a finalidade de se ter termo de comparação obteve-se o espectro da asparagina pura.

III.2.2.5. Análise Cinética da Reação em Temperatura Ambiente.

Para os experimentos partiu-se de 0,5ml da solução estoque 2 (item III.1.1.) de pertecnetato de amônio ^{-99}Tc , evaporada até secura em corrente de nitrogênio. Adicionou-se 20,0 mg de L-asparagina e 0,5ml de solução estoque 3 (item III.1.1.) de hidrazina.

Adicionou-se água destilada e acertou-se o

pH para 8 com solução de hidróxido de sódio 0,1 N de modo a se ter um volume final de 5 ml.

As condições de reação para a análise cinética foram então: soluções: L-asparagina $2,66 \times 10^{-2}$ M, pertecnetato $1,17 \times 10^{-5}$ M e hidrazina $3,97 \times 10^{-5}$ M a temperatura de 25°C .

Retiraram-se amostras da reação em diferentes intervalos de tempo, e imediatamente fez-se a análise cromatográfica a fim de determinar a percentagem do tecnécio consumido na reação e a formação do complexo. Os dados experimentais foram submetidos aos modelos de reação descritos pelas equações diferenciais segundo a Tabela III.1.

TABELA III.1. MODELOS DE REAÇÃO PARA ANÁLISE CINÉTICA

MODELO	EQUAÇÕES DIFERENCIAIS*	ORDEM DA REAÇÃO
$M+L \xrightarrow{k} ML$	$\frac{dM}{dt} = -k\{M\}$	PRIMEIRA ORDEM
$M+L \xrightarrow{k_1} ML$ $ML+L \xrightarrow{k_2} ML_2$	$\frac{d\{M\}}{dt} = -k_1\{M\}\{L\}$ $\frac{d\{L\}}{dt} = -k_1\{M\}\{L\} - k_2\{L\}\{ML\}$ $\frac{d\{ML\}}{dt} = k_1\{M\}\{L\} - k_2\{L\}\{ML\} = \frac{d\{L\}}{dt} - 2 \frac{d\{M\}}{dt}$ $\frac{d\{ML_2\}}{dt} = k_2\{L\}\{ML\} = -\left(\frac{d\{L\}}{dt} - \frac{d\{M\}}{dt}\right)$	EQUAÇÃO CONSECUTIVA
$M+2L \xrightarrow{k} ML_2$	$\frac{d\{M\}}{dt} = -k\{M\}\{L\}$ $\frac{1}{2} \frac{d\{L\}}{dt} = \frac{d\{M\}}{dt}$ $\frac{d\{ML_2\}}{dt} = \frac{d\{M\}}{dt}$	SEGUNDA ORDEM

* BENSON (12).

Os cálculos dos valores das constantes de reação foram efetuados por computador IBM 370/155 utilizando o sistema de programa denominado SAAM (Simulation, Analysis and Modeling) versão 25 desenvolvido por BERMAN e WEISS⁽¹³⁾.

III.2.3. Padronização dos Parâmetros Adequados à Marcação de L-Asparagina com ^{99m}Tc . Determinação da Pureza Radioquímica.

Os experimentos foram realizados da maneira seguinte: volumes de solução de pertecnetato de sódio contendo de 1-15 mCi de ^{99m}Tc foram evaporados em corrente de nitrogênio, adicionaram-se massas variáveis de L-asparagina e 0,5 ml de solução -3 de hidrazina (item III.1.1). Adicionou-se água bidestilada, acertouse o pH a 8 com solução de hidróxido de sódio 0,1N de modo a se ter volume final de 5 ml.

Portanto, as condições de preparação foram: solução de hidrazina $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$, 1-15 mCi de pertecnetato de sódio ^{99m}Tc e concentrações variáveis de L-asparagina $1,33 \times 10^{-2}\text{M}$; $2,66 \times 10^{-2}\text{M}$; $4,00 \times 10^{-2}\text{M}$; $5,33 \times 10^{-2}\text{M}$; e $8,00 \times 10^{-2}\text{M}$, à temperatura ambiente e a 60°C .

Realizaram-se também experimentos nas mesmas condições acima, mas como redutor uma mistura de hidrazina $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$ e concentrações crescentes de sulfato de hidrazina $1,00 \times 10^{-5}\text{M}$; $2,00 \times 10^{-5}\text{M}$ e $4,00 \times 10^{-5}\text{M}$ à temperatura ambiente.

Fez-se também um experimento empregando apenas sulfato de hidrazina (concentração $4,00 \times 10^{-5}\text{M}$), à temperatura ambiente.

Determinou-se o rendimento de marcação mediante retirada de amostras em intervalos regulares de tempo e análise imediata das mesmas por meio de cromatografia, sistema Michron. As frações das atividades correspondentes à amida marcada, tecnécio reduzido hidrolizado e pertecnetato que não reagiu foram lidas no cintilador gama. A concentração de hidrazina presente em excesso quando se utilizou apenas esse redutor a 60°C foi determinada pelo método titulométrico com iodato de potássio descrito na Farmacopéia Britânica⁽⁵⁶⁾.

III.2.4. Ensaio de Distribuição Biológica

Esses ensaios foram realizados em lotes de cinco animais sadios e portadores de um linfoma experimental (Carcinoma de Walker 256).

III.2.4.1. Distribuição Biológica em Animais Sadios

Utilizaram-se quatro lotes de cinco animais nos quais foi injetado subcutaneamente 0,1ml da preparação radiofarmacêutica contendo cerca de 60 μ Ci de atividade. Após anestesia com eter em máscara aberta, colheram-se amostras de sangue por punção cardíaca, nos seguintes tempos: 5 min, 15 min e 30 min. Foram coletadas cerca de 0,5ml de sangue de cada animal e colocados em tubos de vidro contendo 0,5ml de solução de oxalato de potássio previamente evaporados. Um volume exatamente medido do sangue oxalatoado foi levado ao contador de cristal de NaI(Tl) para medida da radioatividade. Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados para a retirada dos seguintes órgãos: coração, pulmões, rins, baço, músculo do fêmur e fígado. Após a retirada, os órgãos foram lavados, secos em papel de filtro, pesados e medidas as suas atividades em tubo de plástico no contador de cristal de NaI(Tl).

As medidas de atividade do sangue, órgãos e tecido muscular, foram feitas por comparação com um padrão de atividade e volume iguais ao injetado.

A volemia foi calculada pela fórmula dada por ALTMAN e DITTMER⁽¹⁾:

$$\text{Volemia} = \text{Peso do Animal} \times 0,0528.$$

Um lote de cinco animais foi injetado com a mesma quantidade da preparação por via endovenosa, sendo quatro deles anestesiados com pentabarbital sódico e submetidos ao mapeamento de corpo inteiro no aparelho Siemens, Scintimat 2, provido de colimador de 151 canais nos tempos 1, 50, 30 e 60 minutos após a dose.

A distribuição biológica da radioatividade em um dos animais foi analisada usando o aparelho Gamacamara e registrada a atividade acumulada nos rins, bexiga, perna, cabeça e torax em intervalos de 1 minuto durante os 30 minutos que se seguiram à injeção.

Os estudos de toxicidade foram feitos com cinco lotes de cinco animais cada um, pesando 50-60g, nos quais o produto foi

injetado subcutaneamente. Os ensaios também foram realizados analogamente, porém por via intraperitoneal. Ambos os ensaios após injeção subcutânea ou por via intraperitoneal foram feitos com a solução em pH = 7,0-7,5.

O volume injetado foi de: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0ml para cada lote, correspondendo a 1,5; 7,5; 15,0; 22,5 e 30,0 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente.

Os animais foram observados por seis semanas, registrando-se diariamente qualquer alteração significativa ou morte.

III.2.4.2. Distribuição Biológica em Animais Portadores de Carcinoma de Walker 256.

Os animais pesando 50-60 gramas foram inoculados com 0,2ml de homogeneizado de tumor, contendo 10^6 células viáveis, na coxa direita, a fim de obter o tumor sólido, seguindo a técnica adotada internacionalmente para o transplante de tumores sólidos⁽³⁷⁾. Foram utilizados sete lotes de animais, com cinco animais em cada lote.

A preparação radiofarmacêutica, com atividade de cerca de $30\mu\text{Ci}$ num volume de 0,1ml, foi injetada subcutaneamente em cada animal. Após a injeção, os animais eram anestesiados com éter em máscara aberta e procedia-se à coleta de sangue por punção cardíaca. Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos (conforme III.2.5.1) e tumor total. Após a extração, órgãos e tumor eram lavados, secos em papel de filtro, pesados e suas atividades medidas em tubos de plástico no contador gama. As contagens das amostras biológicas eram acompanhadas da contagem de um padrão constando da mesma dose injetada nos animais, mantendo-se a mesma geometria para padrão e amostras.

[Um lote de cinco animais foi injetado da maneira descrita e, após 5, 30 e 60 minutos induzidos a esvaziar a bexiga e imediatamente injetados intraperitonealmente com pentobarbital sódico. Após a anestesia procedia-se ao mapeamento de corpo inteiro no aparelho Scintmat II, Siemens de 151 canais. O local da injeção subcutânea era recoberto com uma moeda de chumbo de 1cm de diâmetro e 3mm de espessura, para fins de calibração do aparelho.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ESTADOS DE OXIDAÇÃO DO TECNÉCIO

IV.1.1. Espectrofotometria na Região do Visível e Ultravioleta.

Quando a concentração de hidrazina é de $3,97 \times 10^{-5} M$ e a do $^{99}TcO_4^-$ é de $1,17 \times 10^{-7} M$, notamos o desaparecimento dos picos característicos da solução inicial, devidos ao íon pertecnetato (244-248-290nm) e o aparecimento de outro espectro caracterizado por um pico em 330nm e um maciço em 495 a 530nm, após 60 minutos de reação à temperatura ambiente. A solução inicialmente levemente rósea passa a rósea após 24 horas. A Fig. IV.1 . apresenta o espectro das soluções.

Dependendo da concentração dos reagentes, a solução no início é escura ocorrendo precipitação após 60 minutos de reação ou após 24 horas.

Na Tabela IV.1. apresentam-se as características observadas.

Besnard⁽¹⁴⁾ analisando os espectros obtidos pela redução do íon $^{99}TcO_4^-$ com estanho-II em meio ácido clorídrico, encontrou um pico em 330 nm e um maciço de 430 a 530nm, característicos do Tc + IV. Após 24 h, o espectro não apresenta as mesmas características, desaparece o maciço permanecendo o pico em 340 ou 350nm. Ocorrido esse tempo e ao ar, o Tc + IV se oxida a Tc + VII com aparecimento de seus picos em 244-240-289nm.

Segundo o autor, parece que em meio clorídrico há inicialmente formação de íons clorídricos com o tecnécio-IV e, no decorrer do tempo há hidrólise com formação de íons oxiclорados (340-350nm) e posteriormente oxidação com formação de pertecnetato.

O mesmo autor, afirmou que a redução do Tc + VII pelo estanho em meio alcalino ou ligeiramente ácido é caracterizada por uma absorção máxima em 500nm; o íon formado poderia ser o $TcO(OH)^+$ que em pH mais

TABELA IV.1. ESTUDO DA REDUÇÃO DO ÍON PERTECNETATO COM HIDRAZINA

CONCENTRAÇÃO DE HIDRAZINA (M)	CONCENTRAÇÃO DE $^{99}\text{TcO}_4^-$ (M)	COMPRIMENTO DE ONDAS DOS PICOS (nm)	COR DA SOLUÇÃO OU DO PRECIPITADO
-	$2,34 \times 10^{-6}$ M	244,248,290	INCOLOR
$3,97 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-7}$ M	330,495,530 330,495,530	LEVEMENTE RÓSEA APÓS 60 min DE REAÇÃO. RÓSEA APÓS 24 HORAS.
$3,97 \times 10^{-5}$	$5,85 \times 10^{-7}$ M	330,495,530 330,495,530	RÓSEA APÓS 60 MIN DE REAÇÃO. PRECIPITADO MARROM APÓS 24 HORAS.
$3,97 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-6}$ M	330,495,530 330,495,530 (*)	CASTANHO APÓS 60 min DE REAÇÃO. PRECIPITADO MARROM APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO
$1,98 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-5}$ M	330,495,530	ESCURO NO MOMENTO DA ADIÇÃO PRECIPITANDO EM CERCA DE 30-60 min.

(*) medida do filtrado.

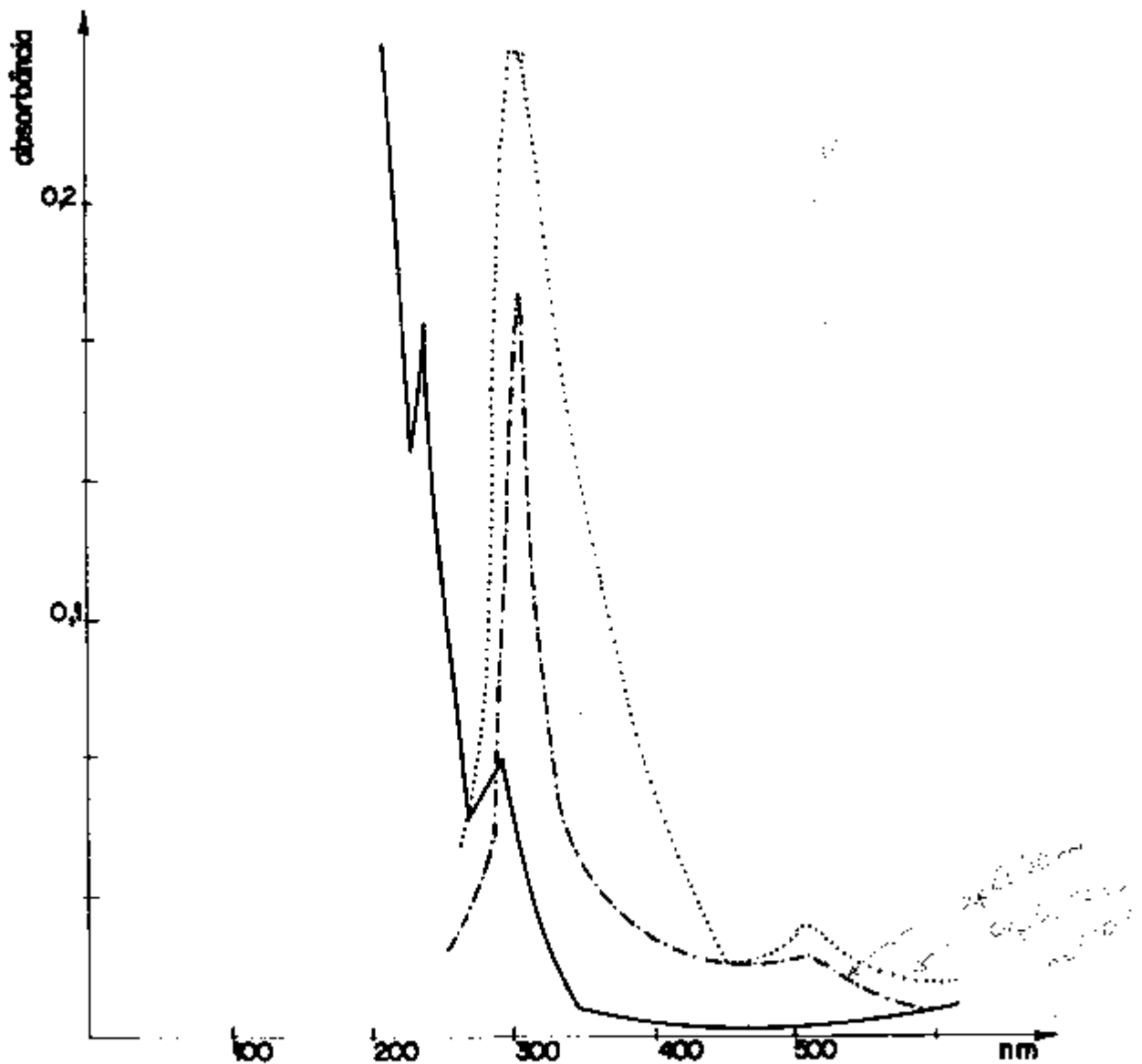


FIG. IV.1. ESPECTRO VISÍVEL DE UMA SOLUÇÃO DE: — PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc PURO $1,17 \times 10^{-7}\text{M}$; REDUZIDO PELA HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$ APÓS 60 MINUTOS DE REAÇÃO E .-.-.-. APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO. $t = 25^{\circ}\text{C}$.

elevado levaria ao TcO_2 .

Rulfs⁽⁷⁰⁾ mostrou por análise espectrofotométrica que a redução pela hidrazina em meio alcalino leva a um estado intermediário (IV ou V) de cor vermelha, seguida do desproporcionamento para $Tc + VII$ e TcO_2 . O produto intermediário que absorve em 500nm foi preparado a partir de solução: $^{99}TcO_4^-$ 1,82mM, Hidrazina 0,015 M e $[OH^-]$ 0,7 M. De 386nm até 650nm a absorbância inicialmente aumenta com o tempo devido à formação de $Tc + VI$ a partir do $Tc + VII$; abaixo de 386nm a absorbância diminui devido ao desaparecimento de $Tc + VII$.

O autor também indica a formação de uma espécie aniônica de $Tc + IV$ de cor amarelo laranja, como sendo produto final da redução do íon pertecnetato por solução de sulfato de amônio e ferro contendo ácido fóscico em meio sulfúrico. A espécie formada absorve em 385nm e 510nm.

Segundo SALARIA⁽⁷²⁾, o pertecnetato é reduzido ao estado tetravalente pelo ácido ascórbico apresentando um pico de absorção em 485nm. A cor vermelha dessas soluções reduzidas e ausência de precipitado de TcO_2 sugere a formação de um complexo ascorbato.

Dos nossos experimentos resultou que quando se aumenta a concentração do íon pertecnetato de $1,17 \times 10^{-7} M$ para $1,17 \times 10^{-6} M$ mantendo-se constante a concentração de hidrazina ocorre após 24 horas de reação a formação de precipitado que provavelmente é o TcO_2 de cor escura.

É possível que em concentrações mais baixas de pertecnetato haja formação de espécies de $Tc + IV$ se compararmos os picos de absorção com aqueles obtidos pelos autores acima citados.

Após a redução não observamos o espectro característico da solução inicial de pertecnetato, indicando que as condições experimentais levam a uma redução irreversível.

IV.1.2. Medidas Potenciométricas

A curva da altura da corrente X concentração do pertecnetato de amônio ^{99}Tc conforme especificado em III.2.1.2, está representada na Figura IV.a.

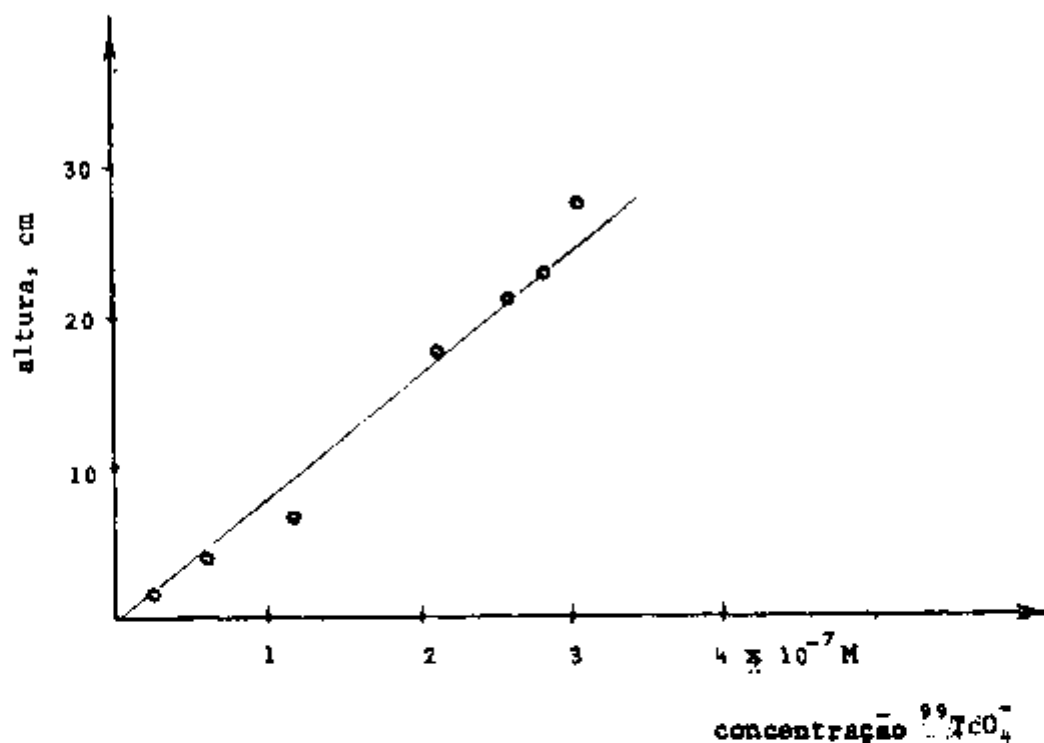


FIG. IV.2. CURVA PADRÃO DA ALTURA DA ONDA POLAROGRAFICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PERTECNETATO DE AMÔNIO- ^{99}Tc .

Na Fig. IV.3. estão representados os polarogramas obtidos para o pertecnato ^{99}Tc (concentração = $2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$) (curva a) e após adição de quantidades crescentes de hidrazina (curvas b, c, d, e).

A percentagem do tecnécio reduzido formado em função da concentração do redutor encontra-se na Tabela IV.2.

A Tabela IV.3. apresenta o resultado da análise polarográfica.

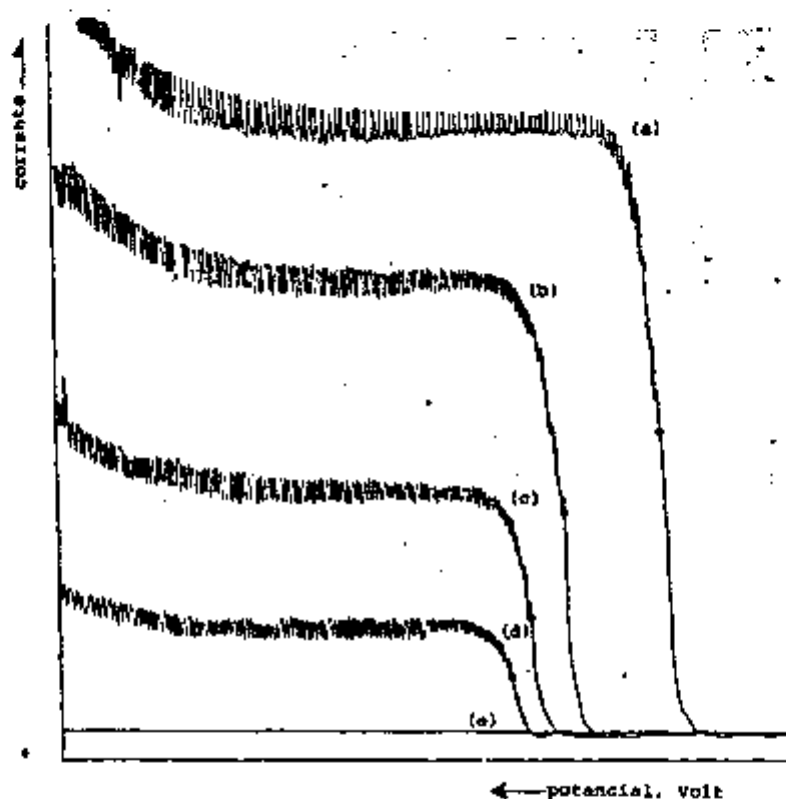


FIG. IV.3. REDUÇÃO DO ^{99}Tc PELA HIDRAZINA EM SOLUÇÃO DE NaOH $0,1\text{N}$, $\text{pH}=8,0$ EM CONCENTRAÇÃO CONSTANTE DE PERTECNETATO DE AMÔNIO $^{99}\text{Tc}=2,57 \times 10^{-7}\text{M}$ E CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE HIDRAZINA.

- (a) PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc SEM HIDRAZINA.
- (b) PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc COM HIDRAZINA ($0,49 \times 10^{-5}\text{M}$).
- (c) PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc COM HIDRAZINA ($0,99 \times 10^{-5}\text{M}$).
- (d) PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc COM HIDRAZINA ($1,98 \times 10^{-5}\text{M}$).
- (e) PERTECNETATO DE AMÔNIO ^{99}Tc COM HIDRAZINA ($3,97 \times 10^{-5}\text{M}$).

TABELA IV.2. PERCENTAGEM DE TECNÉCIO REDUZIDO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDRAZINA (pH=8,0). CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PERTECNETATO $^{99}\text{Tc} = 2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$.

CONCENTRAÇÃO HIDRAZINA (M)	ALTURA DA ONDA (cm)	TECNÉCIO REDUZIDO %
-	21,0	-
$0,49 \times 10^{-5}$	15,7	24,13
$0,99 \times 10^{-5}$	8,2	59,15
$1,98 \times 10^{-5}$	3,5	80,55
$3,97 \times 10^{-5}$	-	100

TABELA IV.3. VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEIA-ONDA DURANTE A REDUÇÃO DO $^{99}\text{TcO}_4$ PELA HIDRAZINA EM SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 0,1 N, pH=8,0. CONCENTRAÇÃO DE $^{99}\text{TcO}_4 = 2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$. 60 min DE REAÇÃO, 25°C.

CONCENTRAÇÃO HIDRAZINA (M)	0	$0,49 \times 10^{-5}$	$0,99 \times 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-5}$	$3,97 \times 10^{-5}$
PRIMEIRA FASE DA REDUÇÃO $E_{\frac{1}{2}}$ (V)	-0,82	-0,74	-0,68	-0,63	-
COR DA SOLUÇÃO	INCOLOR	RÓSEA	RÓSEA	RÓSEA	RÓSEA

A altura da primeira onda polarográfica refere-se à solução de pertecnetato de amônio- ^{99}Tc $2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$ em TcO_4^- e o seu abaixamento indica que está ocorrendo diminuição desta concentração à medida que aumenta a quantidade de redutor no meio. Quando a concentração de hidrazina é de $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$, a redução está completa.

Não há na literatura concordância nos estados de oxidação formados na redução polarográfica do íon TcO_4^- .

SALÁRIA⁽⁷³⁾ em 1963 descreve a 1ª onda, em meio alcalino, como sendo um processo irreversível, de 3 elétrons, de difusão controlada, ocorrendo em potencial de meia-onda $E_{1/2} = -0,78\text{V}$ independente do pH.

ASTHEIMER⁽⁶⁾, entretanto, descreve como sendo um processo de 2 elétrons reversível e dependente do pH.

COLTON⁽²⁶⁾ em 1965 e ASTHEIMER⁽⁶⁾ em 1967 indicaram um potencial de meia-onda $-0,8\text{V}$ característico do tecnécio no estado de oxidação +V.

GALATEANU⁽³⁵⁾ em 1977 e colaboradores estudando polarograficamente a redução do TcO_4^- pela hidrazina em $\text{pH}=11$, encontraram um potencial de meia-onda $-0,75\text{V}$. Os autores indicam os estados de oxidação +V e +IV confirmando-os por análise cromatográfica em papel.

RUSSEL⁽⁷¹⁾ trabalhando em meio alcalino mostrou que a 1ª onda aparece em $E_{1/2} = -0,8\text{V}$ e provavelmente corresponde à fase determinante da velocidade: $\text{TcO}_4^- + e^- \rightarrow \text{TcO}_4^{2-}$. O destino exato deste tecnécio formado na polarografia aquosa é obscuro. Apesar desta onda ser de difusão controlada, valores não inteiros entre 2 e 4 são observados para o número total de elétrons transferidos. Segundo o autor, os valores não inteiros parecem refletir a formação de estados mistos de oxidação por reações rápidas competitivas.

Em nossos experimentos não se determinou o número de elétrons transferidos. A solução reduzida foi examinada por cromatografia conforme descrito em III.2.1.2. resultando da análise apenas uma faixa radioativa com R_f aproximadamente 0,82 que conforme SHUKLA⁽⁷⁶⁾ corresponderia ao tecnécio no estado tetravalente.

IV.1.3. Medidas Cromatográficas

O sistema Anacron foi utilizado com o objetivo de auxili

ar a análise dos cromatogramas obtidos com o tecnécio-99. Geralmente a análise implica na determinação da área relativa a cada pico, sua posição, largura na meia altura e a capacidade de resolução para discriminar as frações separadas. Essas informações sem um programa computacional são difíceis de obtenção quando os picos se mostram parcialmente sobrepostos.

A função analítica que se ajusta ao cromatograma tem a forma geral $y = \sum_{i=1}^n G_i(x)$ onde x é o número representativo da amostragem (no nosso caso tiras recortadas), G_i é uma função Gaussiana simples ou modificada à esquerda ou à direita por um termo exponencial e n é o número de picos parcialmente sobrepostos.

O ajuste de dados utiliza o método dos mínimos quadrados não linear descrito por MARQUARDT-BEVINGTON⁽⁵⁴⁾. A cada análise de cromatogramas, o sistema oferece ainda três gráficos que tem a finalidade de oferecer subsídios para a avaliação da qualidade do ajuste:

- a) Valores experimentais e preditos versus o número das observações (x).
- b) Resíduos (diferença entre os valores observados e preditos) versus número da observação. Nesses resultados espera-se que os pares de pontos (x , resíduos) apresentem distribuição aleatória.
- c) Gráfico probabilístico dos resíduos. Quando o modelo ajustado (função $G_i(x)$) é satisfatório, o gráfico probabilístico acusa linearidade adequada.

Além disso o sistema ANACRÓN fornece tabela contendo informações próprias da clássica análise de variância.

O programa ANACRÓN propositalmente deixa de registrar graficamente os valores que não pertencem ao intervalo de ajuste dos respectivos picos, isto é, registram-se somente os pares de valores X_i , $G_i(x)$ efetivamente representativos dos picos.

SHUKLA⁽⁷⁶⁾ determina os valores de Rf sem utilizar programa computacional, ou seja simplesmente relação entre a distância de origem até o pico de cada função e a distância percorrida pelo solvente.

O autor obtém os valores seguintes:

ISÓTOPOS	^{99m}Tc		^{99}Tc
	4°C	21°C	8°C
TECNÉCIO VII	0,58	0,68	0,68
TECNÉCIO V	0,018	0,018	0,18
TECNÉCIO IV	0,62	0,78	0,78

Trabalhando com o tecnécio-99, solução $2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$ de pertecnetato e solução de hidrazina $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ a 25°C e analisando nossos dados pelo sistema ANACRON⁽²⁾, observamos o seguinte:

O pertecnetato de amônio puro apresentou apenas um pico com $R_f = 0,72$ (Fig. IV.4).

O valor encontrado corresponde estatisticamente àquele obtido por SCHUKLA⁽⁷⁶⁾ para o tecnécio no estado de oxidação +VII.

A dispersão aleatória dos pontos de análise de resíduos indica que o modelo matemático é adequado, conforme apresentado na FIG.IV.5.

A análise probabilística dos resíduos (Fig. IV.6.) também é satisfatória para o caso.

A Tabela IV.4. descreve a análise de variância para os dados do experimento em questão.

Até 15 minutos após adição de hidrazina ao fon pertecnetat, não se observou redução significativa.

Para 15 minutos de reação são perfeitamente visíveis dois picos característicos, o primeiro com $R_f = 0,76$ e o segundo com $R_f = 0,86$, aproximadamente, correspondendo este último provavelmente ao tecnécio no estado de oxidação + IV. A figura IV.7. apresenta o cromatograma correspondente. Os resultados obtidos para este tempo de reação mostram 87,06% de tecnécio +VII para 12,93% de

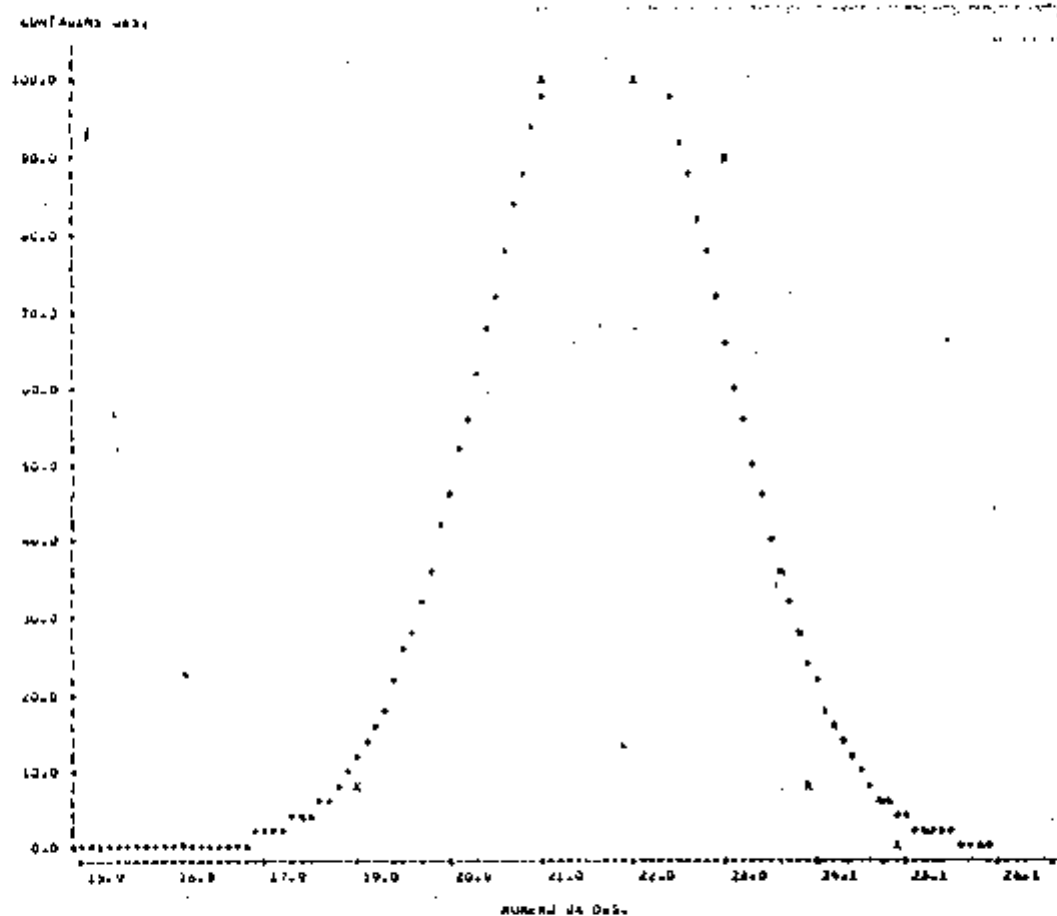


FIG. IV.4. CROMATÓGRAMA PARA O $^{99}\text{TcO}_4^-$ PURO.

+ VALORES CALCULADOS; x VALORES EXPERIMENTAIS.
 * VALORES COINCIDENTES DENTRO DA PRECISÃO DO GRÁFICO

tecnécio +IV.

A Fig. IV.8. mostra a análise dos resíduos, indicando que o modelo matemático é adequado.

A Fig. IV.9. mostra a análise probabilística dos resíduos que também é satisfatória para o caso.

A Tabela IV.5. descreve a análise de variância para o experimento em questão.

Para 30 minutos de reação são visíveis dois picos com $R_f=0,72$ e $R_f=0,81$ e correspondendo a 38,48% de Tc+VII e 61,51% de Tc+IV.

A Fig. IV.10 apresenta o cromatograma do íon pertecnetato reduzido pela hidrazina após 30 minutos de reação.

A Fig. IV.12 mostra a análise de resíduos indicando que o modelo matemático é adequado.

A Fig. IV.11 apresenta a análise probabilística dos resíduos que é satisfatória.

A Tabela IV.6. descreve a análise de variância para o experimento em questão.

Após 60 minutos de reação é visível apenas um pico em $R_f=0,83$, correspondendo a 100% do tecnécio+IV.

A Fig. IV.13 mostra o cromatograma do íon pertecnetato reduzido pela hidrazina após 60 minutos de reação.

A Fig. IV.14 mostra a análise de resíduos indicando que o modelo matemático é adequado.

A Fig. IV.15. apresenta a análise probabilística dos resíduos que é satisfatória.

A Tabela IV.7. descreve a análise de variância para o experimento em questão.

Para 120 minutos de reação observamos também um único pi

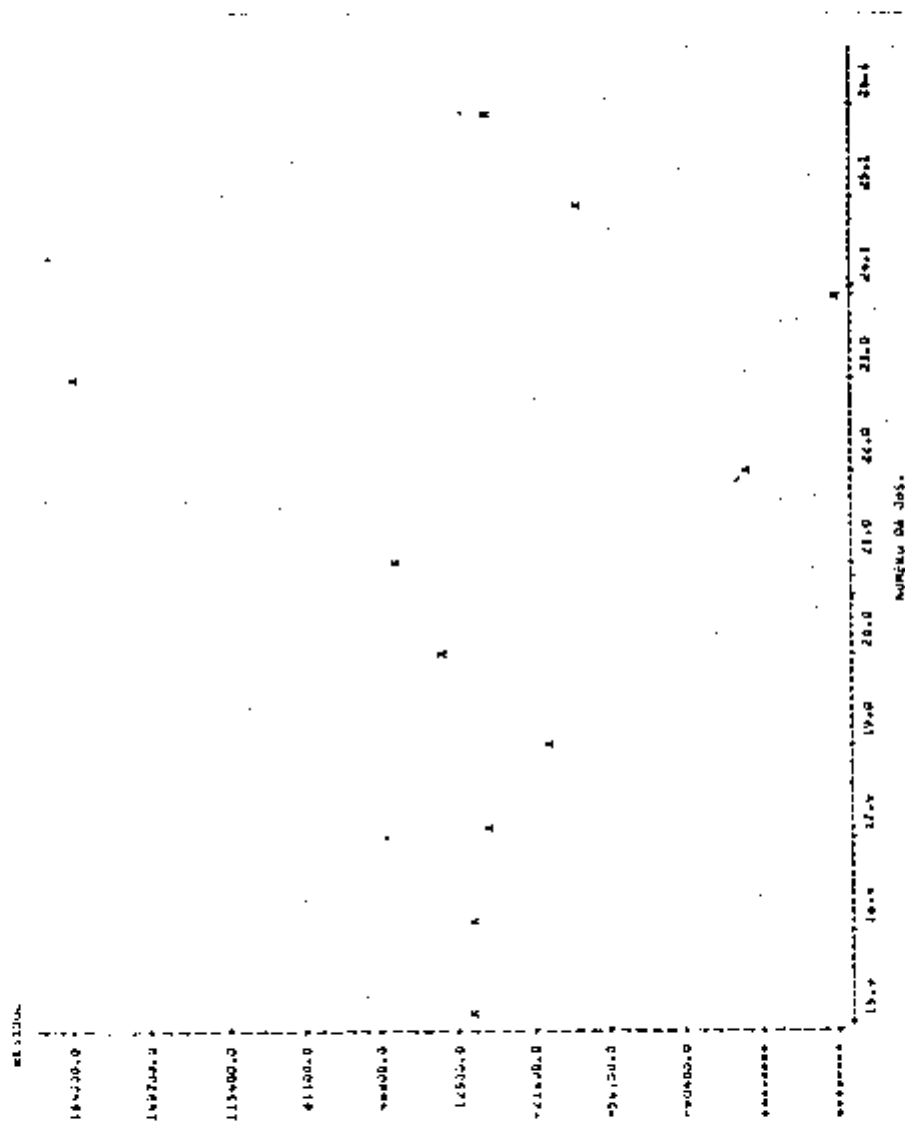


FIG. IV.5. ANÁLISE DE RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$

EM COPIAS

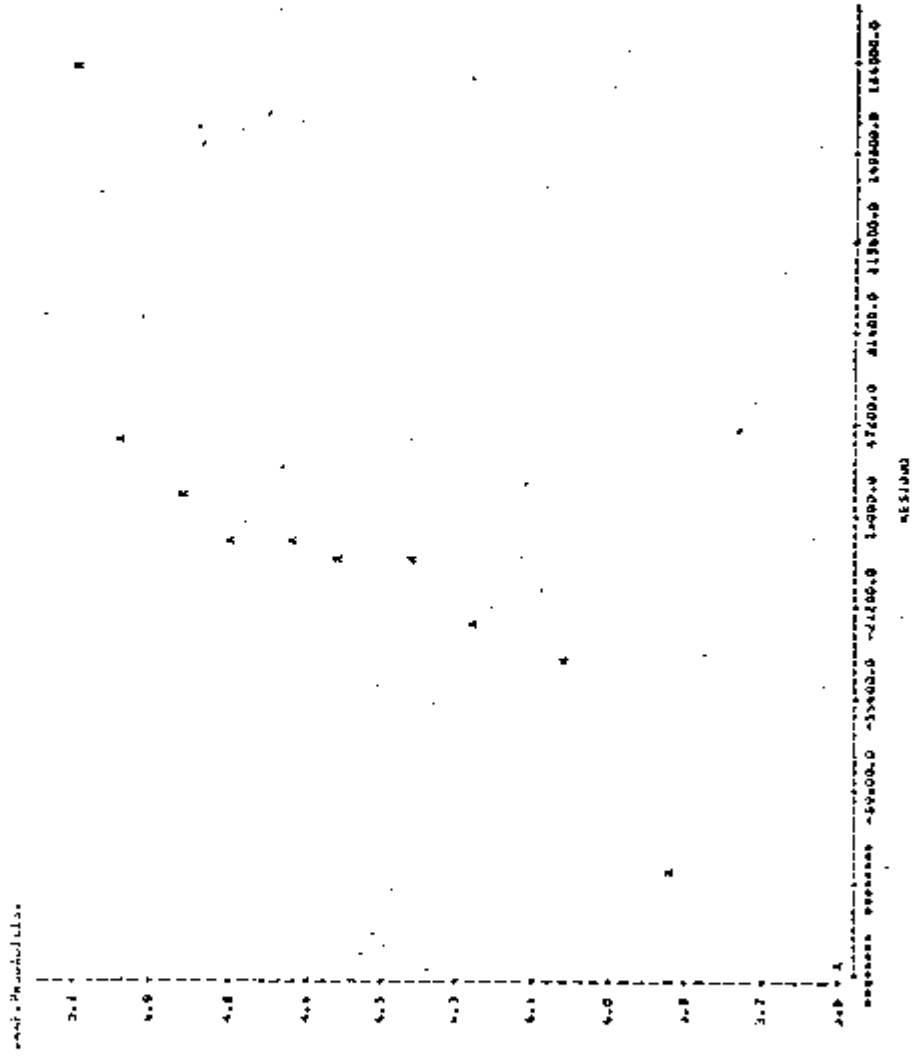


FIG. IV.6. ANÁLISE PROBABILÍSTICA DOS RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DE $^{99}\text{TcO}_4^-$.

TABELA IV.4. ANÁLISE DE VARIANÇA DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$.

INFORMAÇÕES ESTADÍSTICAS MÍNIMAS QUADRADOS NAU LINEAR

MODELO SUMA DE QUADRADOS

FUENTE	GL	SUMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	3	0.295537010 15	0.985126040 12
RESÍDUO	6	0.704208910 11	0.925711140 10
TOTAL (MÁD CORRIJIDO)	11	0.302103500 15	
TOTAL (CORRIJIDO)	10	0.100000010 15	

PARAMETRO VALOR ESTIMADO ERRO PADRAO ASSINTOTICO
 =====
 ALTURA 11.39970000 79306.76819
 CENTRO 21.75301356 0.1034310578
 0.25/SIG 0.3037421443 0.48641414500-01

NM LARGURA A 1/2 ALT. ERRO PADRAO ASSINT. AREA (PORCENT.) ERRO PADRAO ASSINT. RESOLUCAO ERRO PADRAO ASSINT.
 1 3.017003006 0.2416012204 100.0000000 15.00055915 0.1388211228 0.11135020910-01

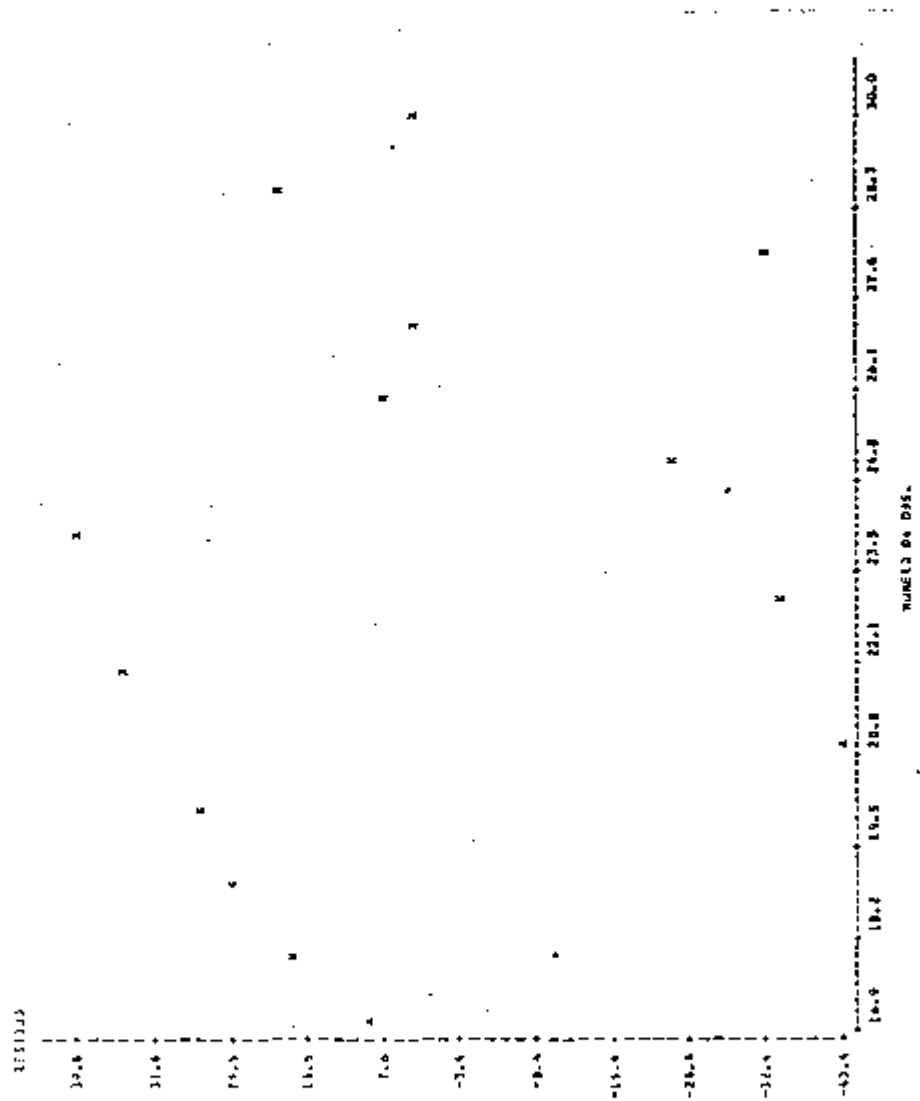


FIG. IV.8. ANÁLISE DE RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 15 MINUTOS DE REAÇÃO.

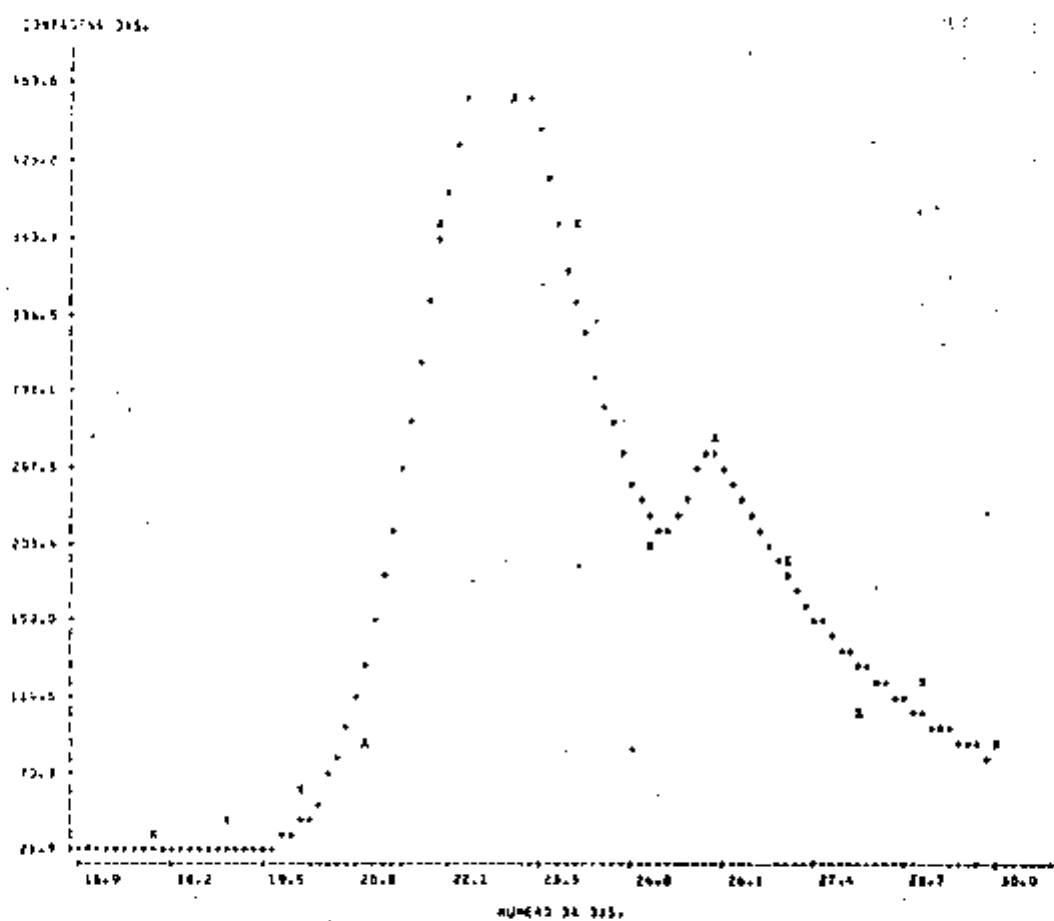


FIG. IV.7. CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 15 MINUTOS DE REAÇÃO + VALORES CALCULADOS; X VALORES EXPERIMENTAIS; * VALORES COINCIDENTES DENTRO DA PRECISÃO DO GRÁFICO.

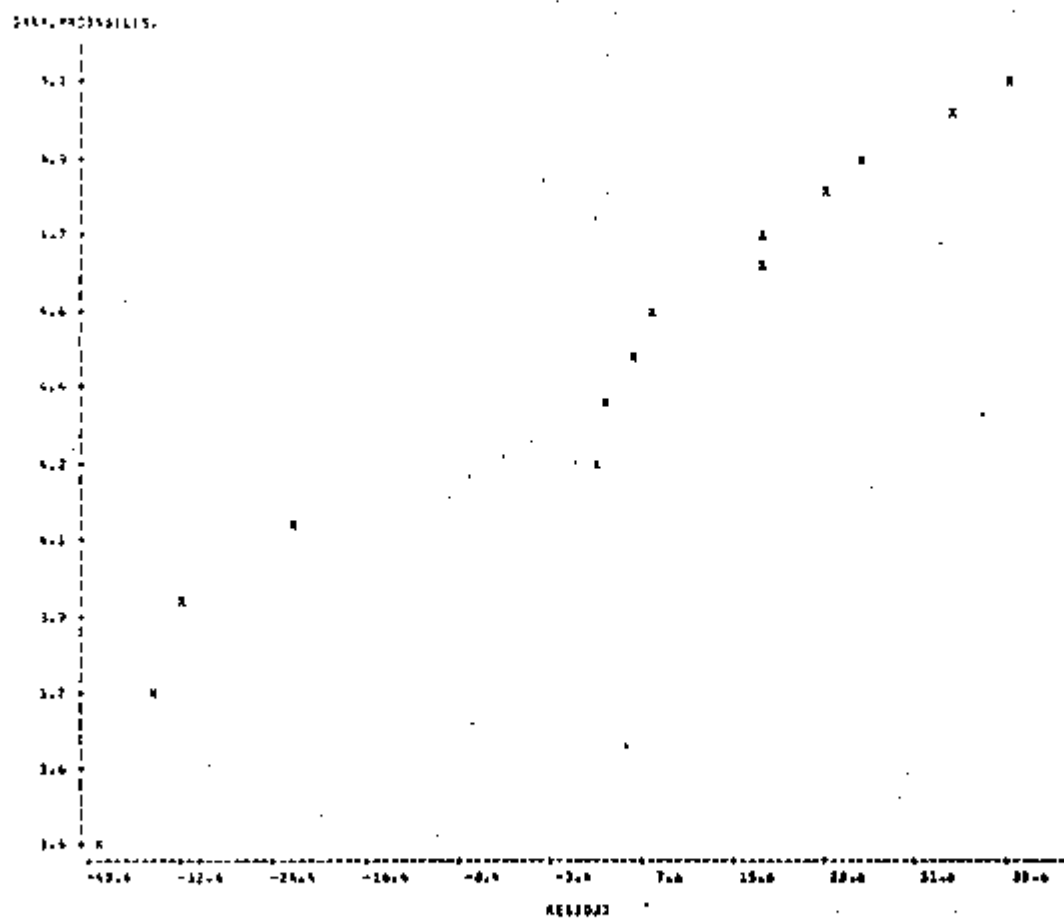


FIG. IV.9. . ANÁLISE PROBABILÍSTICA DOS RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 15 MINUTOS DE REAÇÃO.

TABELA IV.5. ANÁLISE DE VARIANÇA DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 15 MINUTOS DE REAÇÃO

CONDIÇÕES ESTADÍSTICAS MÍNIMOS QUADRADOS NA DIREITA
 MODELO SOMA DE GAUSSIANAS MODIFICADAS A DIREITA

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	8	518959.22	77369.902
RESÍDUO	5	3169.8700	1528.1117
TOTAL (VAG CORRIDO)	14	628127.89	
TOTAL (CORRIDO)	15	279153.35	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	677.3735576	7.743206728
CENTRO	22.93709011	3.32303758690-01
DESV/SIG2	0.3884013278	0.11624995000-01
DESV. EXP	0.5375781532	0.26029302470-01
ALTURA	116.5558307	7.720196553
CENTRO	26.02172323	0.2965793702
DESV/SIG2	3.919066485	0.6197601998
DESV. EXP	0.32559978200-01	3.53830560580-02

VIA	ALTURA A 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (PORCENT.)	ERRO PADRAO ASSINT.	RESOLUCAO	ERRO PADRAO ASSINT.
1	2.573542732	0.39965164500-01	87.06997807	2.383041342	3.1164290116	0.17500803820-02
2	3.8516502437	0.59103133870-01	12.93092193	1.283247001	0.32728433710-01	0.26816816250-02

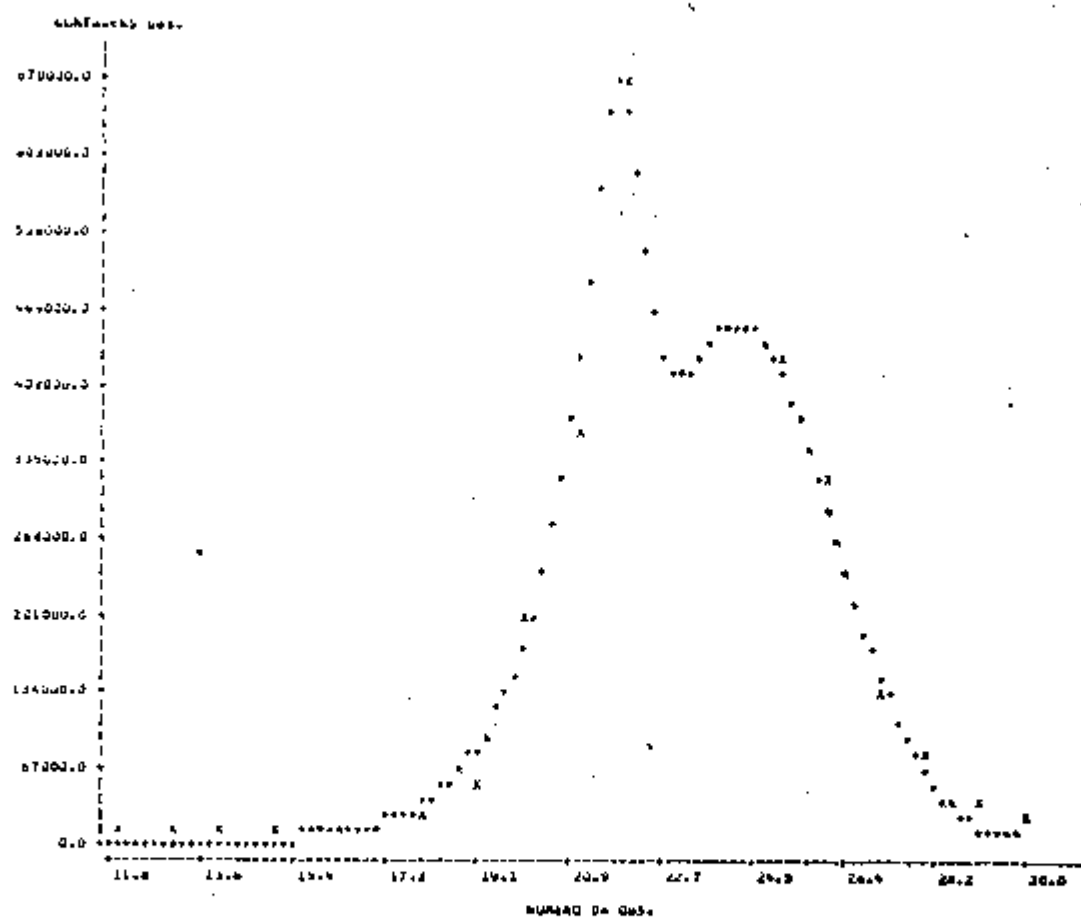


FIG. IV.10. CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDOS PELA HIDRAZINA APÓS 30 MINUTOS DE REAÇÃO. + VALORES CALCULADOS; x VALORES EXPERIMENTAIS; * VALORES COINCIDENTES DENTRO DA PRECISÃO DO GRÁFICO.

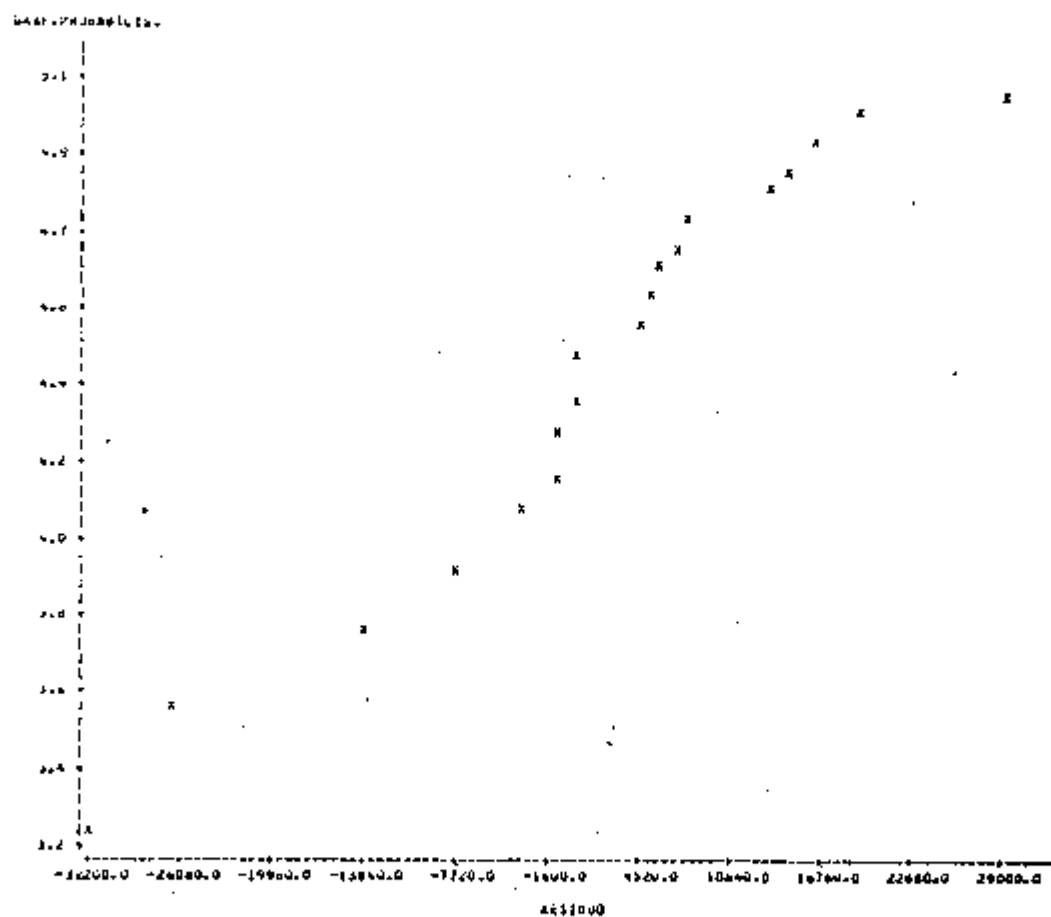


FIG. 1V.11. ANÁLISE PROBABILÍSTICA DE RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 30 MINUTOS DE REAÇÃO.

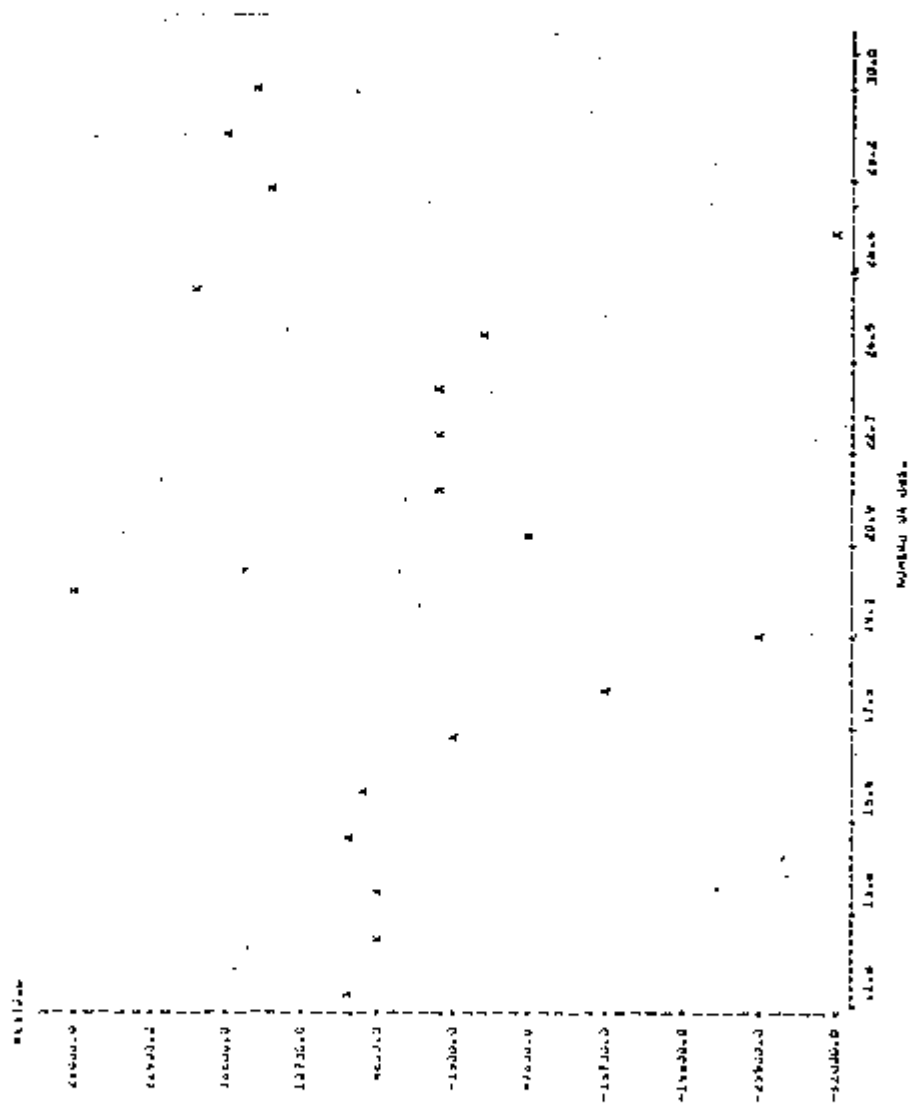


FIG. IV.12. ANÁLISE DOS RESTÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 30 MINUTOS DE REAÇÃO.

TABELA IV.6. ANÁLISE DE VARIANÇA DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 30 MINUTOS DE REAÇÃO.

INTERMEDIÁRIOS ESTÁTICOS MINIMOS QUADRADOS NAU LINEAR
 MODELO SUMA DE QUADRADOS MODIFICADAS A ESQUERDA

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	8	0.149215170 13	0.1865189370 12
RESIDUO	11	0.400810080 10	0.364378250 09
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	19	0.129915990 13	
TOTAL (CORRIGIDO)	10	0.750055490 12	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	457813.2920	27710.50084
VENIRO	21.81252997	0.86220852180-01
0.575102	1.728534403	0.2853913532
PUS-EXP	0.2398000490	0.51225836840-01

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	459871.8301	12334.24105
VENIRO	24.20107188	0.98322911950-01
0.575102	0.1349095343	0.11845126750-01
PUS-EXP	3.814121979	1.354391370

NM	LARGURA A 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (PORCENT-J)	ERRO PADRAO ASSINT.	RESOLUCAO	ERRO PADRAO ASSINT.
1	1.265904265	0.1045042476	38.48104749	3.45069953	0.58015645890-01	0.4794257320-02
2	4.530970208	0.1496776789	61.51892251	2.909520817	0.1870064237	0.82651939290-02

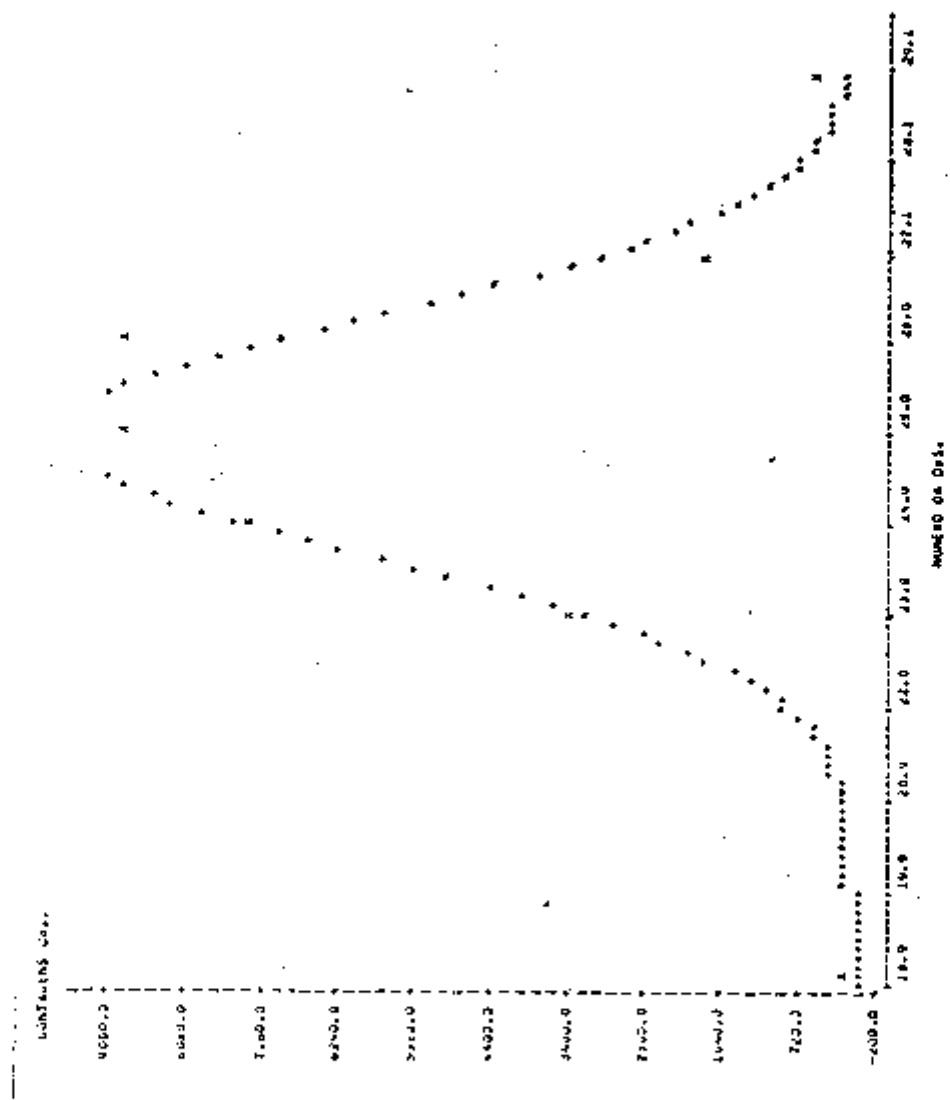


FIG. IV.13. CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 60 MINUTOS DE REAÇÃO. + VALORES CALCULADOS; X VALORES OBSERVADOS; * VALORES COINCIDENTES DENTRO DA PRECISÃO DO GRÁFICO.

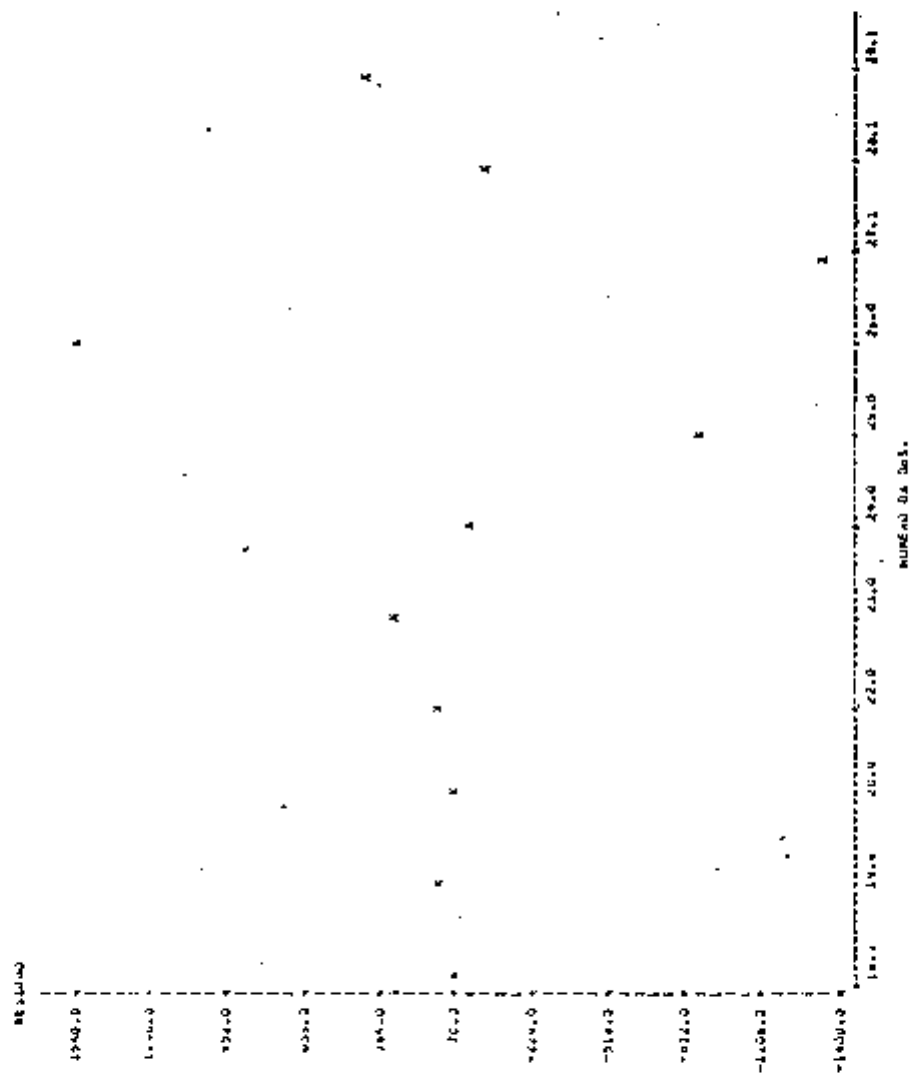


FIGURA IV.14. ANÁLISE DE RESTÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4$ RE-
DUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 60 MINUTOS DE REAÇÃO.

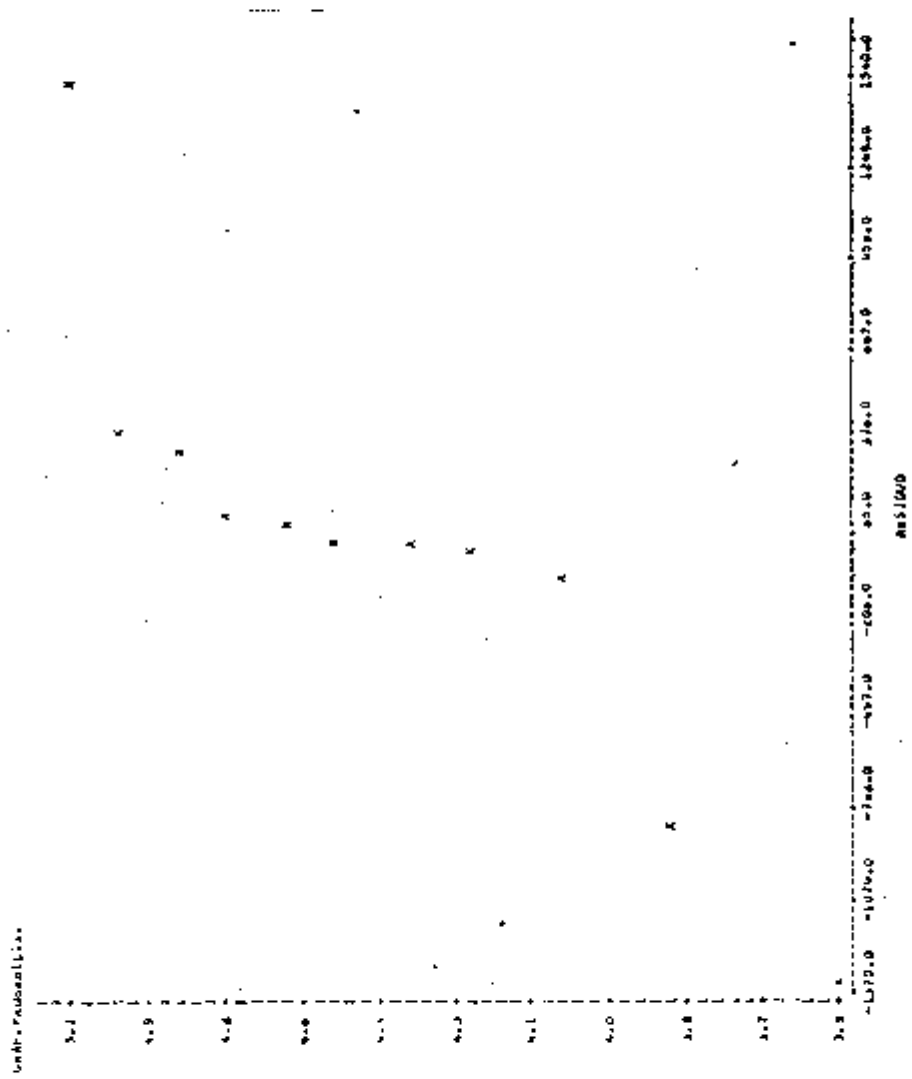


FIG. 1V.15. ANÁLISE PROBABILÍSTICA DOS RESTUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 60 MINUTOS DE REAÇÃO.

CP. 11/PCS

TABELA IV.7. ANÁLISE DE VARIANÇA DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 60 MINUTOS DE REAÇÃO.

INFORMAÇÕES ESTADÍSTICAS MÍNIMOS QUADRADOS NÃO LINEAR
MÚLTIPLO SÚMUA DE QUADRÁTICAS

FUNTE	G.L.	SÚMUA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS
MODELO	3	0.215071320 09	71690440.
RESÍDUO	8	5148139.3	643526.92
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	11	0.220219520 09	
TOTAL (CORRIGIDO)	10	0.125245730 09	

PARAMETRO VALOR ESTIMADO ERRO PADRAO ASSINTOTICO
 ALTURA 923.714595 636.4529557
 CENTRO 25.00014699 0.1033524218
 0.575162 0.4333467832D-01

NM LARGURA A 1/2 ALT. ERRO PADRAO ASSINT. AREA (PORCENT.) ERRO PADRAO ASSINT. RESOLUCAO ERRO PADRAO ASSINT.
 1 3.140810961 0.2442124003 100.0000000 14.49773408 0.1259217808 0.9779975231D-02

co em $R_f=0,87$, correspondendo a 100% de tecnécio+IV.

A Fig. IV.16. apresenta o cromatograma do íon pertecnetato reduzido pela hidrazina após 120 minutos de reação.

A Fig. IV.17. apresenta a análise probabilística dos resíduos que é satisfatória.

A Fig. IV.18. apresenta a análise de resíduos indicando que o modelo matemático é adequado.

A Tabela IV.8. descreve a análise de variância para o experimento em questão.

Fez-se a análise cromatográfica do íon pertecnetato reduzido pela hidrazina após 24 horas de reação encontrando-se o mesmo resultado que aquele obtido para 60 ou 120 minutos de reação.

A Fig. IV.19. mostra a formação percentual de tecnécio+IV obtido por redução do íon pertecnetato com hidrazina até 120 minutos após adição dos reagentes.

Na Fig. IV.20. apresenta-se a formação percentual de tecnécio reduzido no decorrer do tempo quando se utilizou $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a hidrazina, a 25°C e a 60°C , bem como nos experimentos em que se usou o sulfato de hidrazina a 60°C e a mistura dos dois redutores à temperatura ambiente.

O resultado das análises cromatográficas indica que a hidrazina reduz totalmente o tecnécio +VII ao nível de carregador a 25°C . Entretanto, quando se usa ^{99m}Tc a 25°C , somente após 24 h de reação o rendimento de obtenção de Tc+IV alcança 40%. A 60°C a redução é quase completa em 30 a 60 minutos.

A mistura de hidrazina $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$ e sulfato de hidrazina $4,0 \times 10^{-5}\text{M}$ a 25°C permite a obtenção de 90% de Tc+IV em 120 minutos.

IV.2. PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ADEQUADOS A PREPARAÇÃO DO COMPLEXO L-ASPARAGINA ^{99}Tc

IV.2.1. Preparação do Complexo

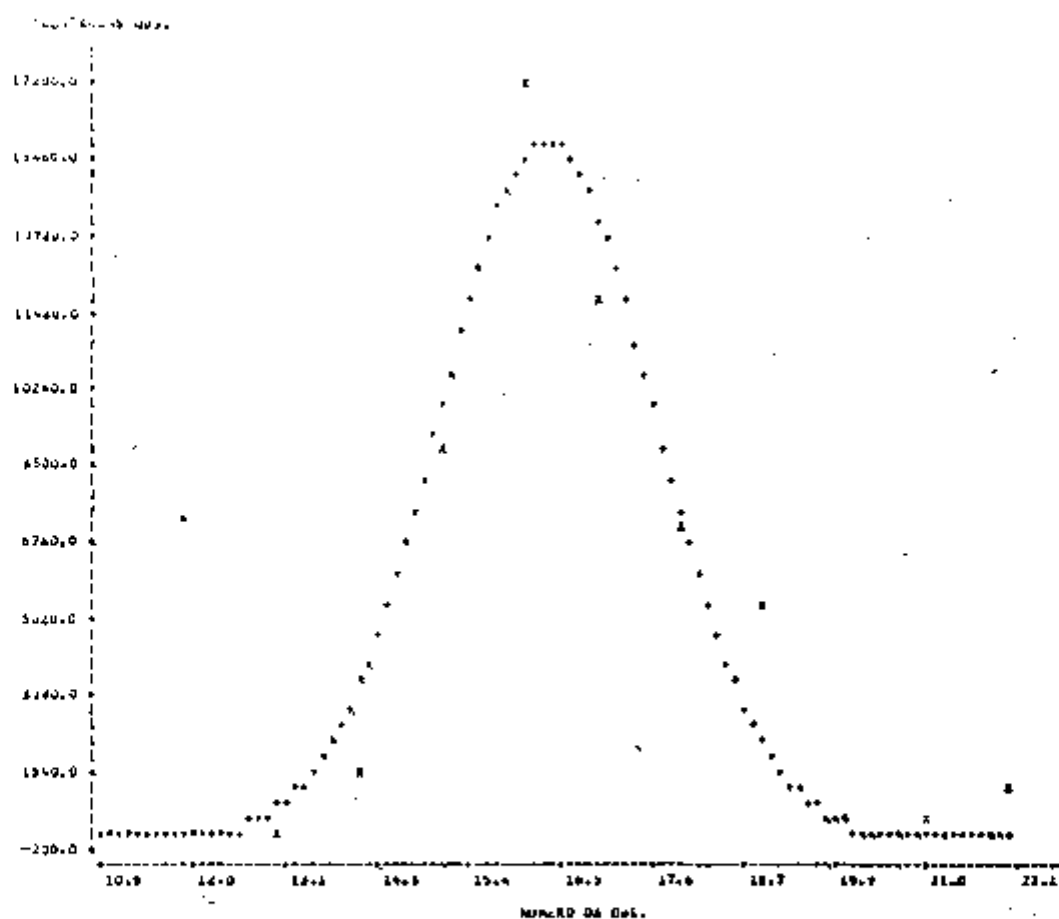


FIG. IV.16. CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 120 MINUTOS DE REAÇÃO. + VALORES CALCULADOS; x VALORES EXPERIMENTAIS; * VALORES COINCIDENTES DENTRO DA PRECISÃO DO GRÁFICO.

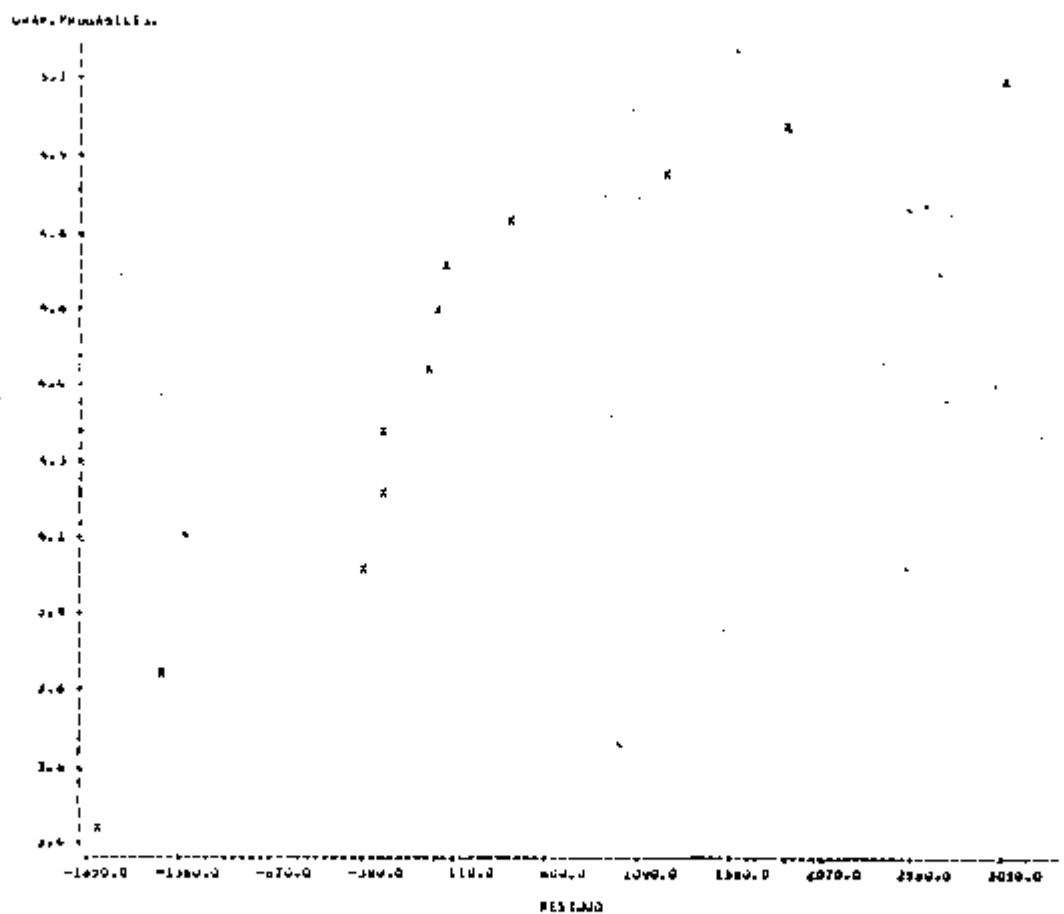


FIG. IV.17. ANÁLISE PROBABILÍSTICA DE RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 120 MINUTOS DE REAÇÃO.

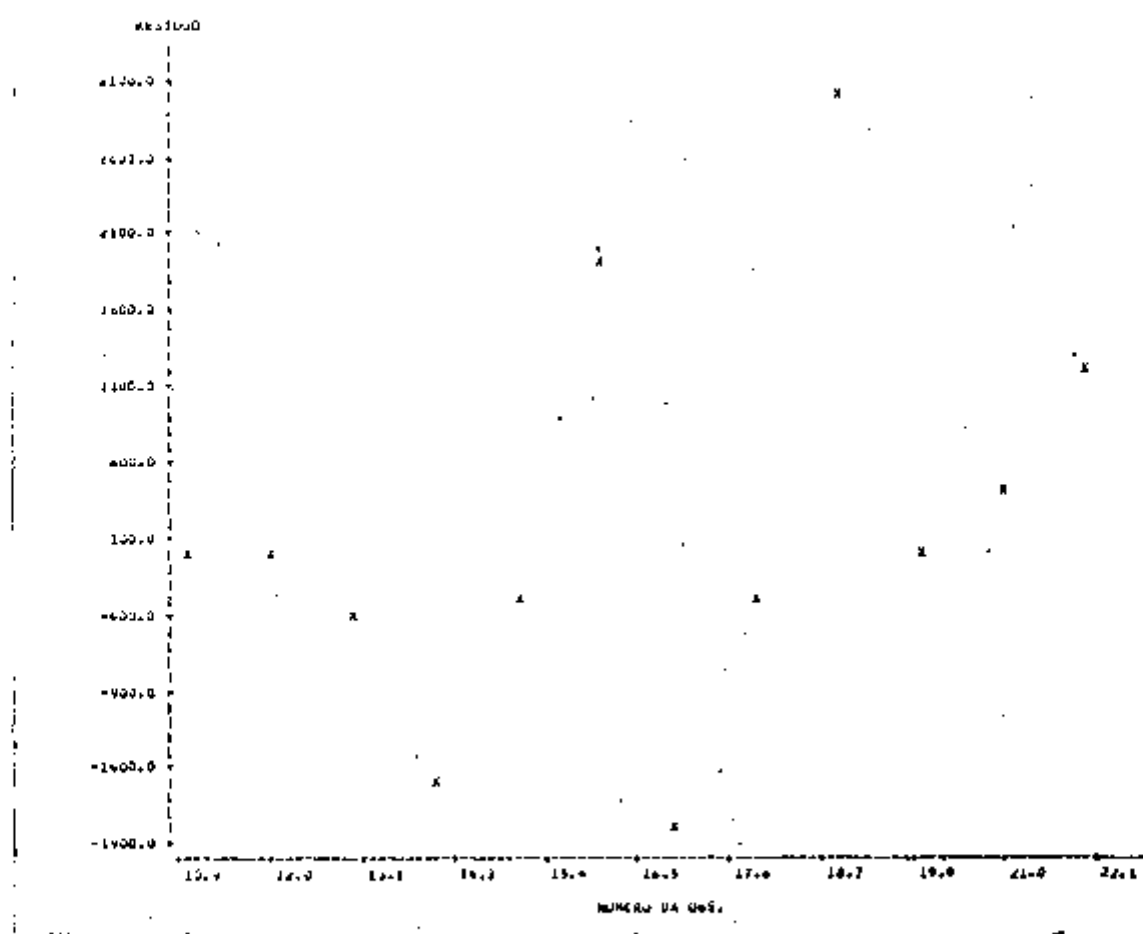


FIG. IV.18. ANÁLISE DOS RESÍDUOS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 120 MINUTOS DE REAÇÃO.

IV.8. ANÁLISE DE VARIANÇAS DO CROMATOGRAMA DO $^{99}\text{TcO}_4^-$ REDUZIDO PELA HIDRAZINA APÓS 120 MINUTOS DE REAÇÃO.

DRMAGUES ESTADÍSTICAS MÍNIMAS QUADRADOS NAU LINER

MODELO SOMA DE VAUSSIANAS

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEIOS
MODELO	3	0.587061700 09	0.195686900 09
RESÍDUO	9	2020011.	2244512.4
TOTAL (NÃO CORREGIDO)	12	0.607261320 09	
TOTAL (CORREGIDO)	11	0.597062760 09	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	15039.02527	1213.837771
CENTRO	46.37853754	0.1133026636
0.5/SIGMA	0.2667289022	0.52880880520-01

SOMA A 1/2 ALF.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (PORCENT.)	ERRO PADRAO ASSINT.	RESOLUCAO	ERRO PADRAO ASSINT.
3.106165593	0.2866166126	100.0000000	16.45670655	0.1897706425	0.17548696410-01

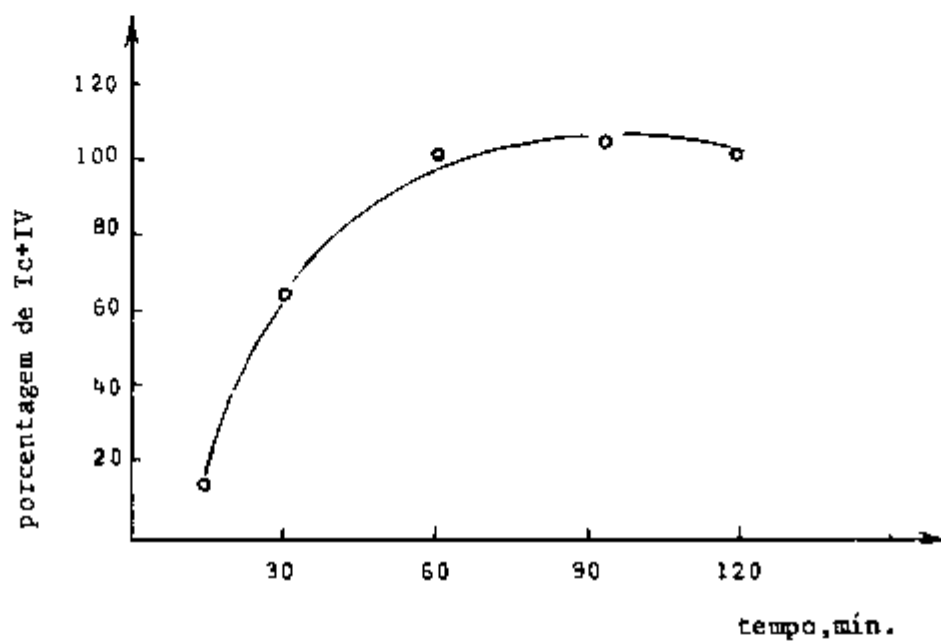


FIGURA IV.19. PORCENTAGEM DE $^{99}\text{Tc}+\text{IV}$ FORMADO EM FUNÇÃO DO TEMPO.
REDUTOR: HIDRAZINA = $3,97 \times 10^{-5}$ M, 25°C , $\text{pH} = 8,0$.
PERTECNETATO DE AMÔNIO = $2,57 \times 10^{-7}$ M.

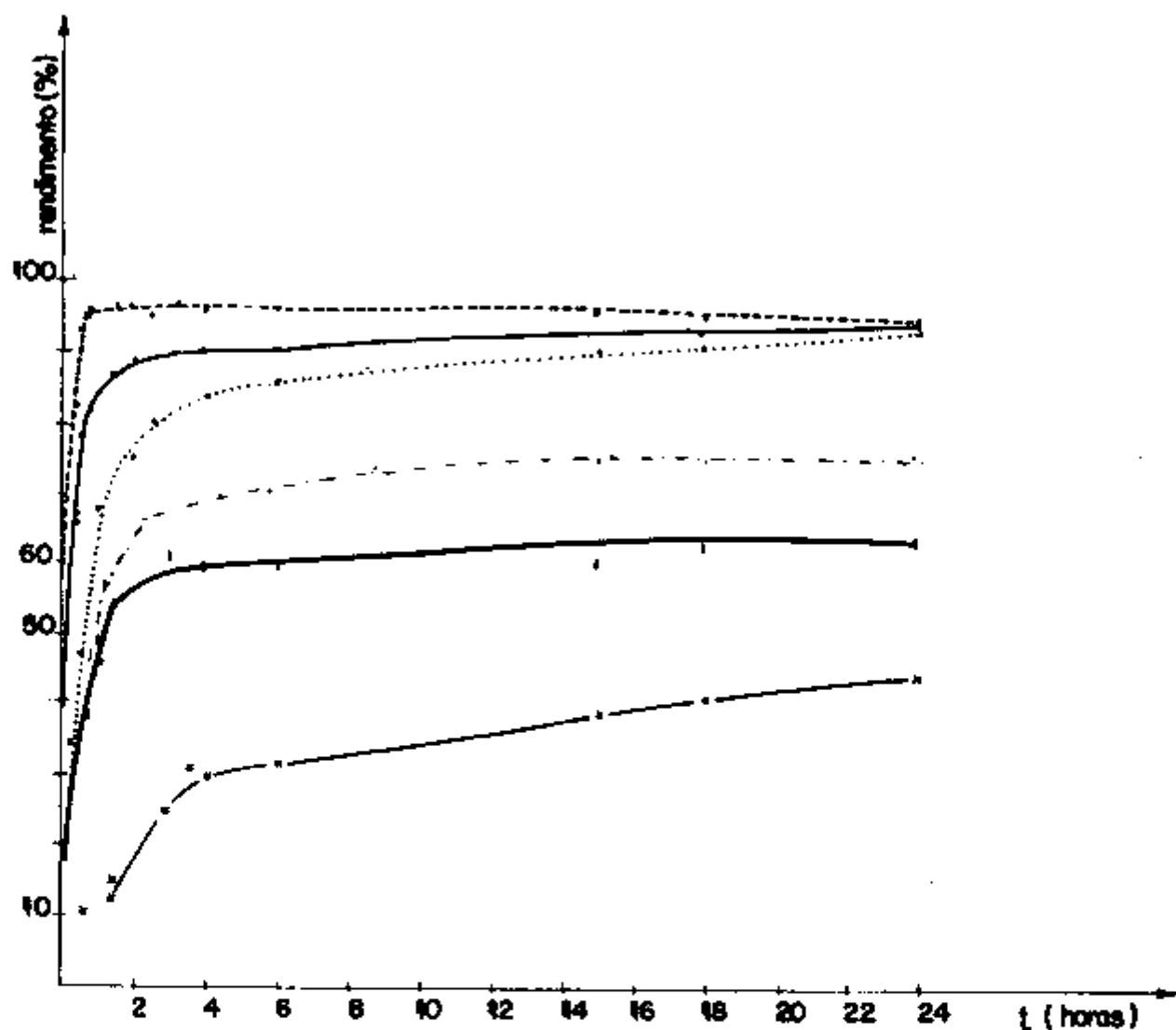


FIGURA IV.20. FORMAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}+\text{IV}$ EM FUNÇÃO DO TEMPO. PERTECNETATO DE SÓDIO. $^{99m}\text{Tc}=1\text{mCi/ml}$, $\text{pH}=8,0$. SOLUÇÕES DE: HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ + SULFATO DE HIDRAZINA NAS CONCENTRAÇÕES $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ E $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

- HIDRAZINA A 60°C , $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$
- SULFATO DE HIDRAZINA, A 60°C , $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$
- x-x- HIDRAZINA A 25°C , $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$
- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ + SULFATO DE HIDRAZINA $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ A 25°C .
- .-.- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ + SULFATO DE HIDRAZINA $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ A 25°C .
- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ + SULFATO DE HIDRAZINA $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ A 25°C .

A Fig. IV.21. mostra a formação do complexo no decorrer do tempo em função da variação da concentração de pertecnetato ^{99}Tc $2,34 \times 10^{-6}\text{M}$; $1,17 \times 10^{-5}\text{M}$ e $2,34 \times 10^{-5}\text{M}$ sendo redutor a hidrazina (solução $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$) a 25°C , conforme apresentado em III.2.2.1.

A variação do rendimento de complexação com a concentração de L-asparagina mostra que para a concentração $1,17 \times 10^{-5}\text{M}$ de pertecnetato ^{99}Tc e $3,97 \times 10^{-5}\text{M}$ de hidrazina o melhor resultado é obtido para concentração de L-asparagina $4,0 \times 10^{-2}\text{M}$. A Fig. IV.21a. apresenta os resultados deste experimento.

Tendo sido definidos os parâmetros adequados à complexação da L-asparagina com ^{99}Tc preparou-se o produto conforme descrito em III.2.2.2. nas seguintes condições: 30,0mg de L-asparagina, 0,5ml de solução 2 (item III.1.1.) de pertecnetato de amônio ^{99}Tc e 0,5ml de solução 3 (item III.1.1.) de hidrazina, em um volume total de 5,0ml, à temperatura ambiente, $\text{pH}=8,0$. Obtivemos cerca de 10mg do complexo cristalino com ponto de fusão de $118,6^{\circ}\text{C}$.

IV.2.2. Estudo da Estabilidade do Complexo

Análises cromatográficas (sistema Michron), realizadas à temperatura ambiente até 24 horas após a preparação do complexo indicaram que o produto é estável, não se verificando a presença de $^{99}\text{TcO}_4^-$ ou de tecnécio reduzido. Após esse tempo os cristais começam a se tornar amarelados passando em seguida a cor laranja. Estes, quando dissolvidos em água e analisados por espectrofotometria na região UV e visível mostram os picos de absorção característicos do tecnécio reduzido +IV (330nm e 495nm) mas não aqueles característicos do tecnécio +VII (244nm, 248 e 290nm).

A Fig. IV. 22. mostra o espectro da solução do complexo 24 horas e 72 horas após a preparação.

Os resultados destas análises indicam que o complexo é estável nas 24 horas que se seguem a sua preparação, em temperatura ambiente mas, após 72 horas, está completamente decomposto, conforme se verifica visualmente pela cor da solução, que passa de incolor para amarelo e laranja.

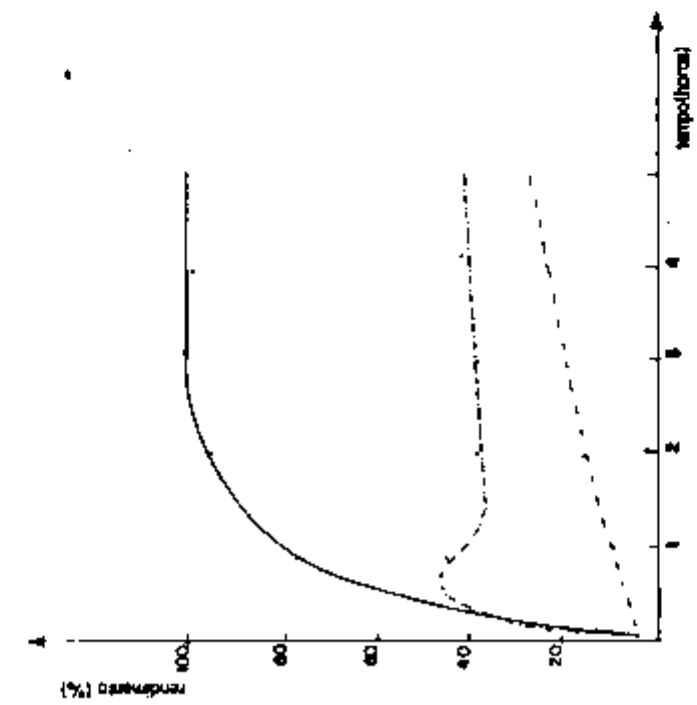


FIG. IV.21 FORMAÇÃO DO COMPLEXO L-ASPARAGINA ^{-99}Tc , A 25°C, pH=8,0, EM FUNÇÃO DO TEMPO. L-ASPARAGINA=4,0x10⁻² M.

- - - - - PERTECNETATO $T_c=2,34 \times 10^{-6} M$.
 ————— PERTECNETATO $T_c=1,17 \times 10^{-5} M$.
 - . - . - . PERTECNETATO $T_c=2,34 \times 10^{-5} M$.

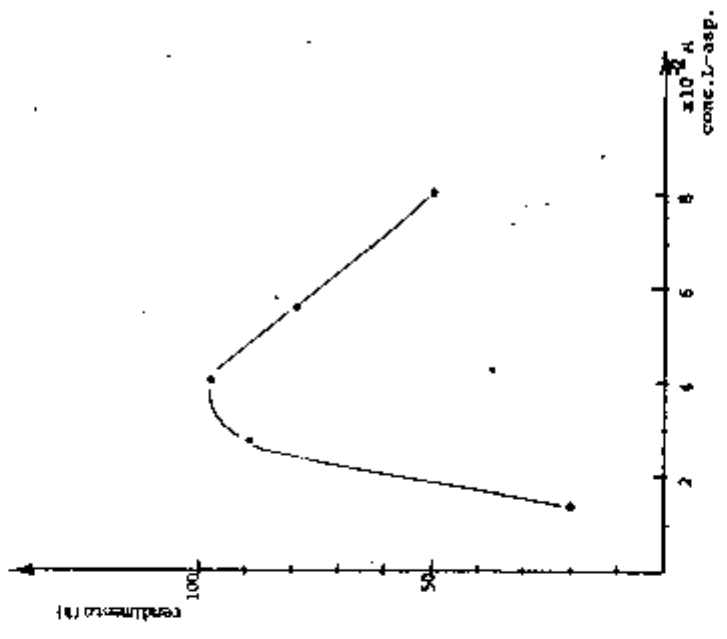


FIG. IV.21a FORMAÇÃO DO COMPLEXO L-ASPARAGINA ^{-99}Tc EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE L-ASPARAGINA, A 25°C, pH=8,0. PERTECNETATO DE AMÔNIO $1,17 \times 10^{-5} M$.

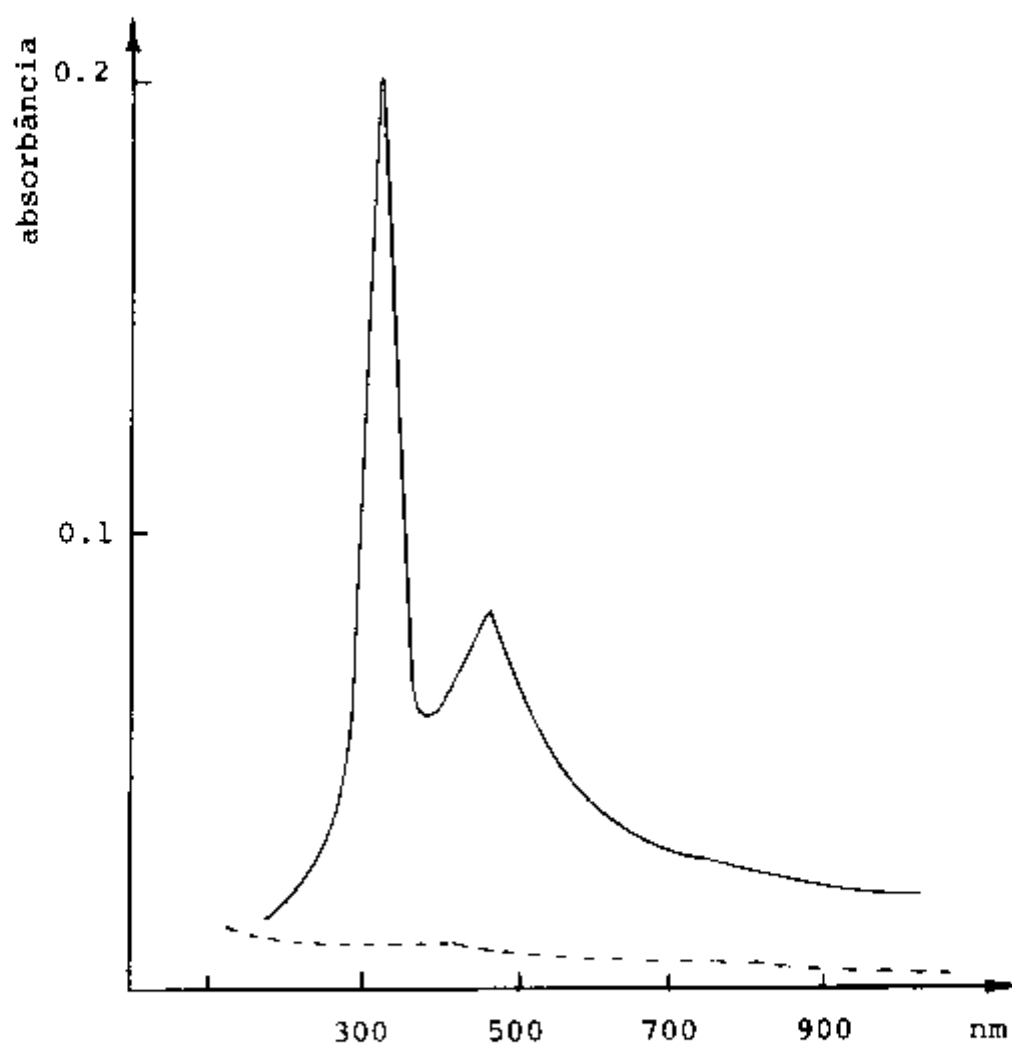


FIG. IV.22. ESPECTRO VISÍVEL DO COMPLEXO L-ASPARAGINA⁹⁹Tc - - - - 24 HORAS e — 72 HORAS APÓS A PREPARAÇÃO.

IV.2.3. Espectro de Absorção no Infra-Vermelho

As posições e intensidades das bandas características obtidas para a L-asparagina purificada e para o complexo são as seguintes:

a) L-asparagina pura (Fig. IV.23.)

3450cm ⁻¹	3400cm ⁻¹	: estiramento NH ₂ da amida.
3125cm ⁻¹	2400cm ⁻¹	: estiramento do grupo NH ₃ ⁺
2200cm ⁻¹	2000cm ⁻¹	: região de sobreton atribuída a deformação de NH ₃ ⁺ assimétrico e vibração torcional do NH ₃ ⁺ .
1540cm ⁻¹		: forte deformação simétrica do NH ₃ ⁺ .
1590cm ⁻¹		: carboxilato forte estiramento C - O assimétrico $\begin{matrix} \text{C} - \text{O} \\ \text{C} \end{matrix}$
1400cm ⁻¹		: fraco estiramento C - O simétrico.

b) Complexo asparagina tecnécio (Fig. IV.24.)

3450cm ⁻¹	: estiramento NH ₂ da amida. O grupo NH ₂ da amida está sobreposto às bandas de ligação metal-ligante, formando-se uma banda larga.
1600cm ⁻¹	: banda devida ao ligante com o grupo carboxila.

Conforme indicado por vários autores, como NAKAMOTO⁽⁵⁸⁾, SWEENEY⁽⁵²⁾ e colaboradores, SVATOS⁽⁶⁰⁾ e colaboradores, BELLAMY⁽¹¹⁾ e SEN⁽⁷⁸⁾ e colaboradores, as bandas de absorção em 3450, 3270 e 1603cm⁻¹, bem como ausência de banda em 1720cm⁻¹ são críticas para a determinação do tipo de ligação metal-ligante presentes nos complexos aminoácido-metal. No nosso caso o deslocamento da banda de absorção de 1590 no aminoácido, para 1600 no complexo indica que o grupo carboxila está comprometido com a ligação do metal. O aparecimento de um máximo de absorção devido ao estiramento NH₂ em 3450cm⁻¹ quando comparado àquele em 3125 - 2400cm⁻¹ do espectro da L-asparagina pura, indica a presença de coordenação N³⁹-Tc.

O grupamento amídico, conforme os resultados obtidos, não

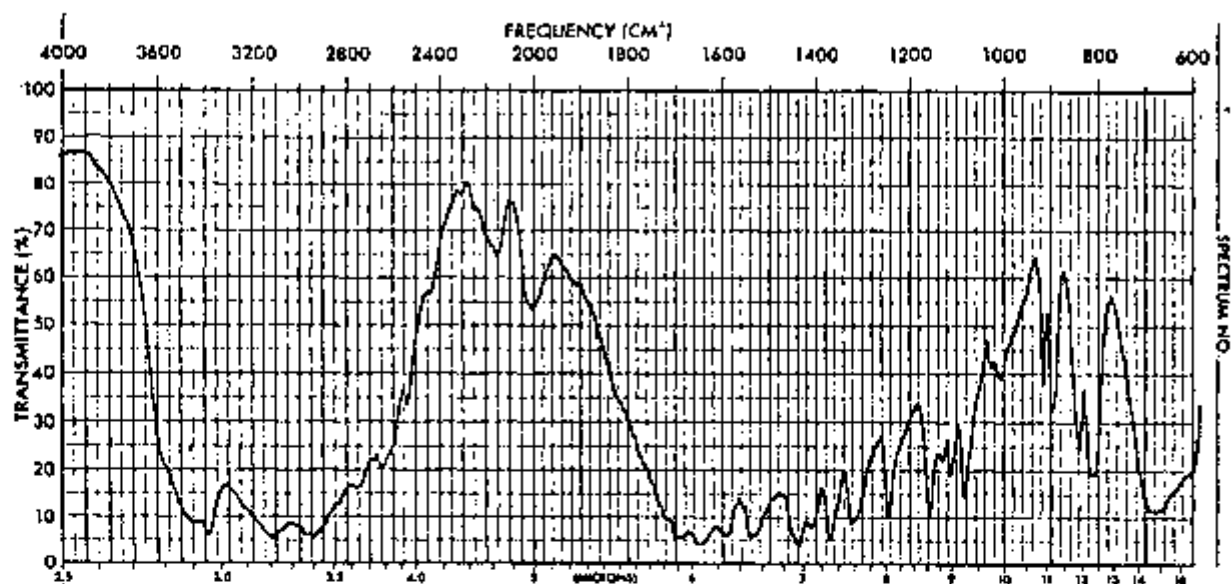


FIG. IV.23. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO L-ASPARAGINA.

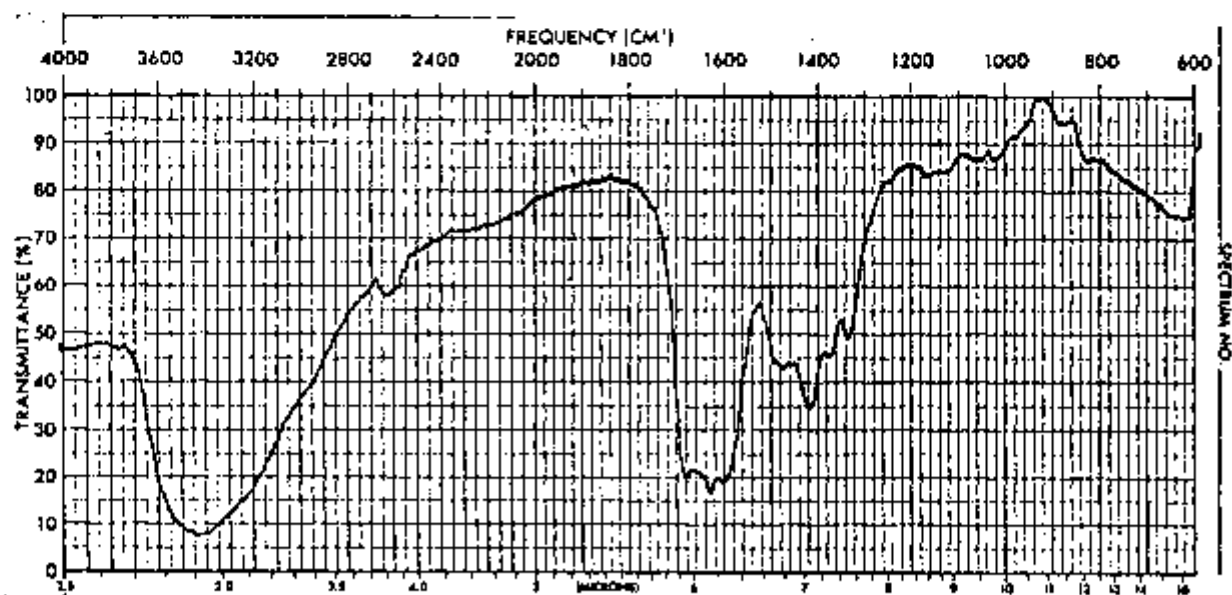


FIG. IV.24. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO ASPARAGINA - ^{99}Tc

parece tomar parte na ligação com o metal.

IV.2.4. Análise Cinética da Reação

Os resultados da análise cinética conforme descrito em III.2.3.5. estão apresentados na Tabela IV.4.

TABELA IV.4. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIVERSOS MODELOS DE REAÇÃO. ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NO SISTEMA COMPUTACIONAL SAAM-25.

MODELO	PARAMETROS ($l^m/mol^n \cdot min$)	SQD*
1) $M+L \xrightarrow{k} ML$	$k = 42030,14 \pm 756,54$	31,8
2) $M+L \xrightarrow{k_1} ML$ $M+L \xrightarrow{k_2} ML_2$	$k_1 = 43750,40 \pm 611,80$ $k_2 = 149,04 \times 10^7 \pm 1049 \times 10^7$	**
3) $M+2L \xrightarrow{k} ML_2$	$k = 43750,40 \pm 743,55$	26,4

** O processo de ajuste não convergiu, o resultado apresentado corresponde a interrupção dos cálculos na 10ª interação.

* = soma dos quadrados dos desvios.

n = ordem da reação

A análise dos resultados obtidos mostra que o menor SQD foi obtido para o modelo 3, indicando que este é o que melhor representa a reação. No modelo 1, ainda que o valor de k seja muito próximo ao modelo 3, o erro apresentado por SQD é maior. No caso 2, o valor de k_1 é praticamente igual ao de k encontrado para o modelo 3. Porém, o valor de k_2 forneceu um erro muito elevado e o processo de ajuste dos dados ao modelo foi não convergente.

Uma explicação provável seria que as duas fases da reação do modelo 2 ocorrem quase que simultaneamente, formando o quelato ML_2 . Neste caso, o intermédio teria vida muito curta, impossível de ser detectado pelos nossos métodos de análise.

A afirmação de que existem dois ligantes para cada tecnécio baseando-se, exclusivamente, na análise cinética da reação deve ser encarada com cautela.

IV.3. PREPARAÇÃO DA L-ASPARAGINA MARCADA COM TECNÉCIO-99m

O emprego do pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) ao nível de traços mostrou comportamento diferente do pertecnetato de amônio (^{99}Tc) ao nível de carregador.

Os experimentos de marcação a $25^{\circ}C$ com ^{99m}Tc quando se utilizou solução de hidrazina $3,97 \times 10^{-5} M$ e concentrações variáveis de L-asparagina deram baixos rendimentos da ordem de 20%.

Entretanto, a $60^{\circ}C$, o rendimento de marcação foi de 95%, em 30 minutos de reação com solução de L-asparagina $4,0 \times 10^{-2} M$.

A Fig. IV.25 mostra os rendimentos de marcação em função do tempo a $60^{\circ}C$.

A Fig. IV.25a apresenta os rendimentos de marcação em função da concentração de L-asparagina a $60^{\circ}C$ e após 30 minutos de reação.

Os experimentos realizados à temperatura ambiente com hidrazina e concentrações variáveis de sulfato de hidrazina mostraram rendimento de marcação de 95% após 120 minutos de reação quando a concentração de sulfato de hidrazina foi de $4,0 \times 10^{-5} M$.

A Fig. IV.26 mostra os rendimentos de marcação em função do tempo e à temperatura ambiente. A Fig. IV.26.a. apresenta os rendimentos em função da concentração de L-asparagina em temperatura ambiente e após 120 minutos de reação.

A Análise titulométrica com iodato de potássio mostrou que a hidrazina é totalmente consumida na reação, quando se utilizou este redutor na

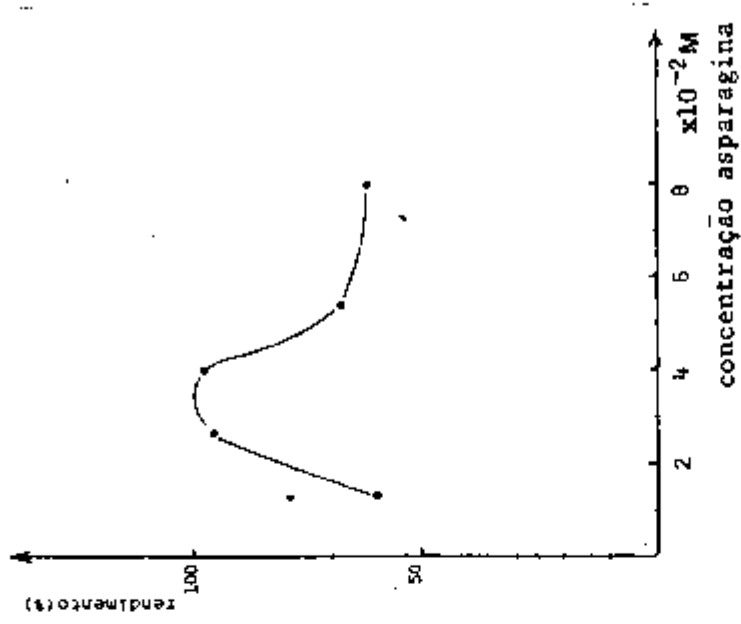


FIG. IV.25a VARIACÃO DO RENDIMENTO DE MARCAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE L-ASPARAGINA.

REDUTOR SOLUÇÃO DE HIDRAZINA = $3,97 \times 10^{-5} M$.
 $t = 60^{\circ}C$

TEMPO DE REACÇÃO = 30 min

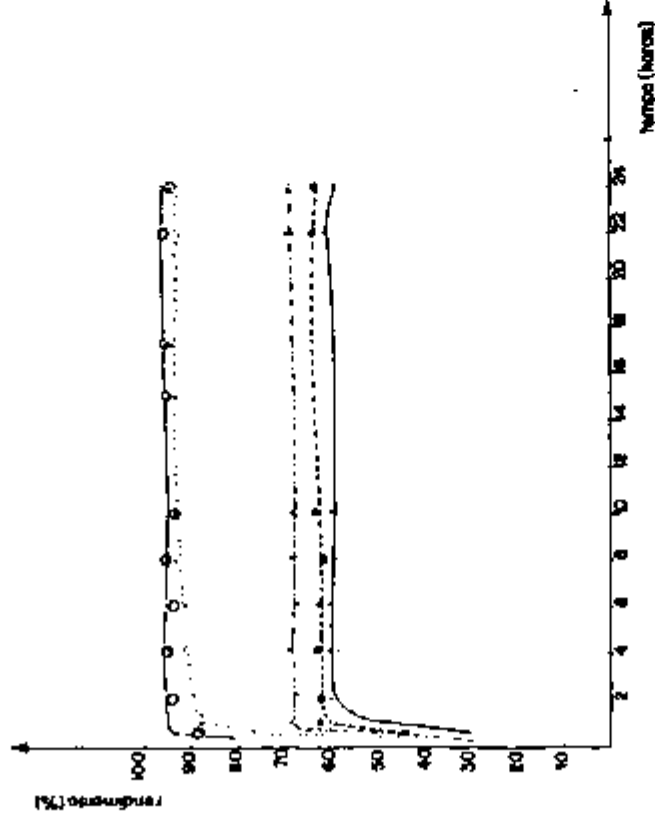


FIG. IV.25 VARIACÃO DO RENDIMENTO DE MARCAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE L-ASPARAGINA. $t = 60^{\circ}C$

SOLUÇÃO DE HIDRAZINA = $3,97 \times 10^{-5} M$. CONCENTRAÇÕES DE L-

ASPARAGINA = ——— $1,33 \times 10^{-2} M$
 $2,66 \times 10^{-2} M$
 -O-O-O- $4,00 \times 10^{-2} M$
 -.-.-.- $5,33 \times 10^{-2} M$
 - - - - $8,00 \times 10^{-2} M$

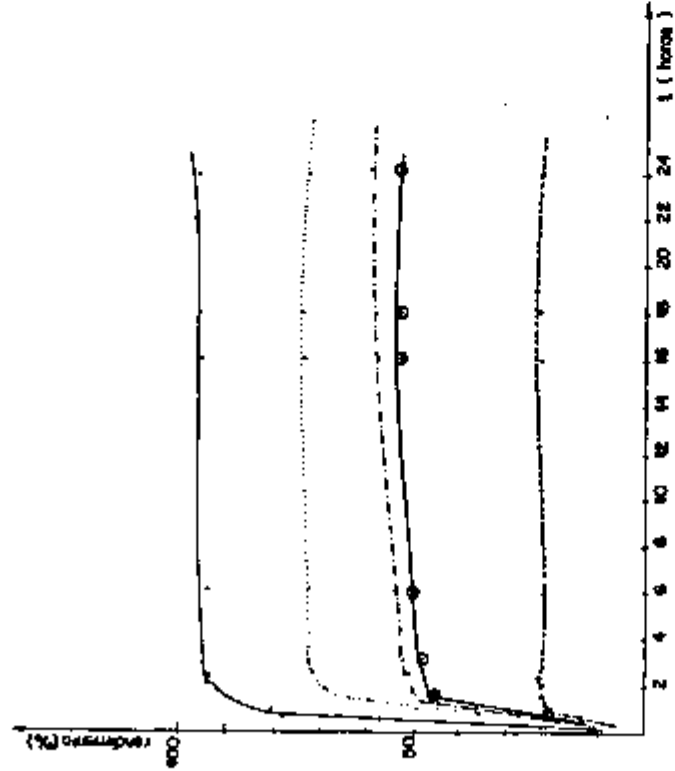


FIG. 1V.26. VARIACÃO DO RENDIMENTO DE MARCAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE REDUTOR. L-ASPARAGINA= $4,00 \times 10^{-2}$ M, $t=25^{\circ}\text{C}$.

- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}$ M+SULFATO DE HIDRAZINA $4,00 \times 10^{-5}$ M
- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}$ M+SULFATO DE HIDRAZINA $2,00 \times 10^{-5}$ M
- - - - HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}$ M+SULFATO DE HIDRAZINA $1,00 \times 10^{-5}$ M
- o-o- SULFATO DE HIDRAZINA $4,00 \times 10^{-5}$
- HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}$ M

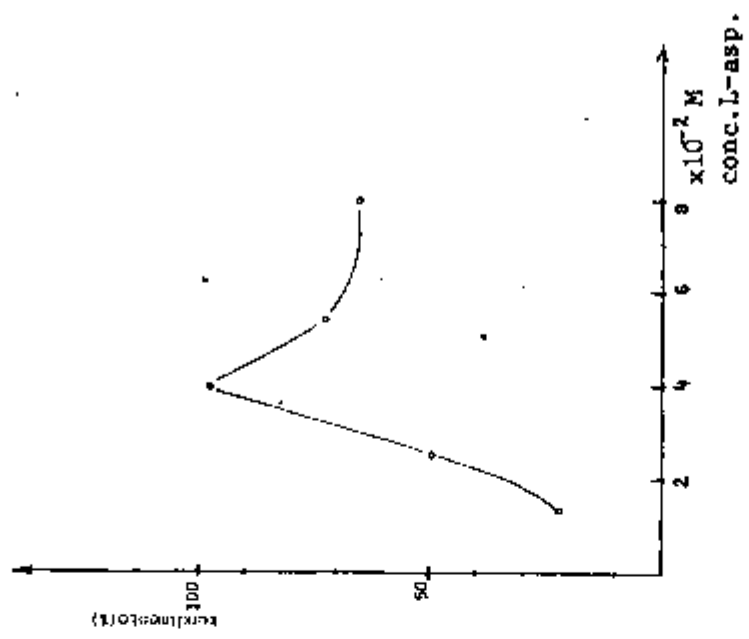


FIG. 1V.26.a. VARIACÃO DO RENDIMENTO DE MARCAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO L-ASPARAGINA.

TEMPO DE REACÇÃO = 120 min
 $t = 25^{\circ}\text{C}$
 REDUTOR: HIDRAZINA $3,97 \times 10^{-5}$ M+
 SULFATO DE HIDRAZINA $4,00 \times 10^{-5}$ M

preparação do complexo a 60°C.

Com base nos resultados, adotamos o seguinte método de preparação: a solução de pertecnetato de sódio-^{99m}Tc eluída da coluna geradora e contendo atividade variável entre 1-15 mCi é evaporada até secura. Após esfriamento adiciona-se 30 mg de L-asparagina e 0,5 ml de solução 3(III.1.1.) de hidrazina; leva-se o volume para 5,0 ml sendo pH acertado para 8,0. Agita-se, fecha-se, e leva-se em banho maria a 60°C por 30 minutos. Resfria-se.

Desejando-se uma preparação extemporânea, injetável, estéril, adotamos o seguinte procedimento: adicionamos 30 mg de L-NH₂Asp a 0,5ml de solução de hidrazina e pH acertado a 8,0, passa-se por filtro Millipore estéril de 0,22 u. Congela-se imediatamente a -40°C. A solução é então liofilizada por um tempo conveniente. No momento de usar, adiciona-se esterilmente a quantidade desejada de pertecnetato de sódio ^{99m}Tc contido em um volume de 5,0 ml e aquece-se em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

IV.4. ENSAIOS DE DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

IV.4.1. Animais Normais

Os resultados obtidos para a distribuição biológica da L-asparagina marcada com tecnécio-99m em animais normais, quando injetada por via subcutânea, estão na Tabela IV.5.

Como se depreende do exame da Tabela, o radiofármaco não apresenta afinidade significativa por qualquer órgão ou tecido.

Nas Fig. IV.27. e IV.28. estão os mapas obtidos em diferentes intervalos de tempo para um animal de cerca de 60 gramas que foi injetado com o radiofármaco contendo 60 µCi de ^{99m}Tc (atividade específica de 30 µCi/mg), por via endovenosa.

Verificamos o acúmulo nos rins em cerca de um minuto após a dose e já o seu aparecimento na bexiga, indicando a depuração elevada do radiofármaco por via renal, bem como uma parte do produto localizado no abdômen.

Dos 15 aos 60 minutos notamos uma diminuição gradativa

TABELA IV.5. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DA L-ASPARAGINA-Tc (99m) EM ANIMAIS NORMAIS.
(RATOS WISTAR DE 50/60gr).

ÓRGÃO	5'		15'		30'	
	A	B	A	B	A	B
CORAÇÃO	0,671±0,062	1,362±0,844	0,572±0,045	1,788±0,155	0,327±0,068	0,859±0,178
PULMÕES	0,839±0,030	1,034±0,039	0,989±0,279	1,279±0,380	0,873±0,051	1,195±0,070
RINS	3,411±0,500	2,405±0,353	2,737±0,570	4,138±0,862	2,193±0,450	2,880±0,592
BAÇO	0,441±0,010	0,963±0,074	0,789±0,095	0,953±0,142	0,544±0,142	2,018±0,527
MÚSCULO*	3,412±0,183	0,853±0,069	2,648±0,037	1,745±0,017	1,348±0,078	1,075±0,083
SANGUE	0,620±0,139	2,324±0,139	4,497±0,832	1,951±0,087	4,683±0,103	1,774±0,136
FÍGADO	2,511±0,632	0,856±0,134	3,181±0,923	1,271±0,143	3,352±0,751	1,293±0,154

(*) Músculo do fêmur.

A = % Dose inicial/órgão total.

B = % Dose inicial/grama de órgão.

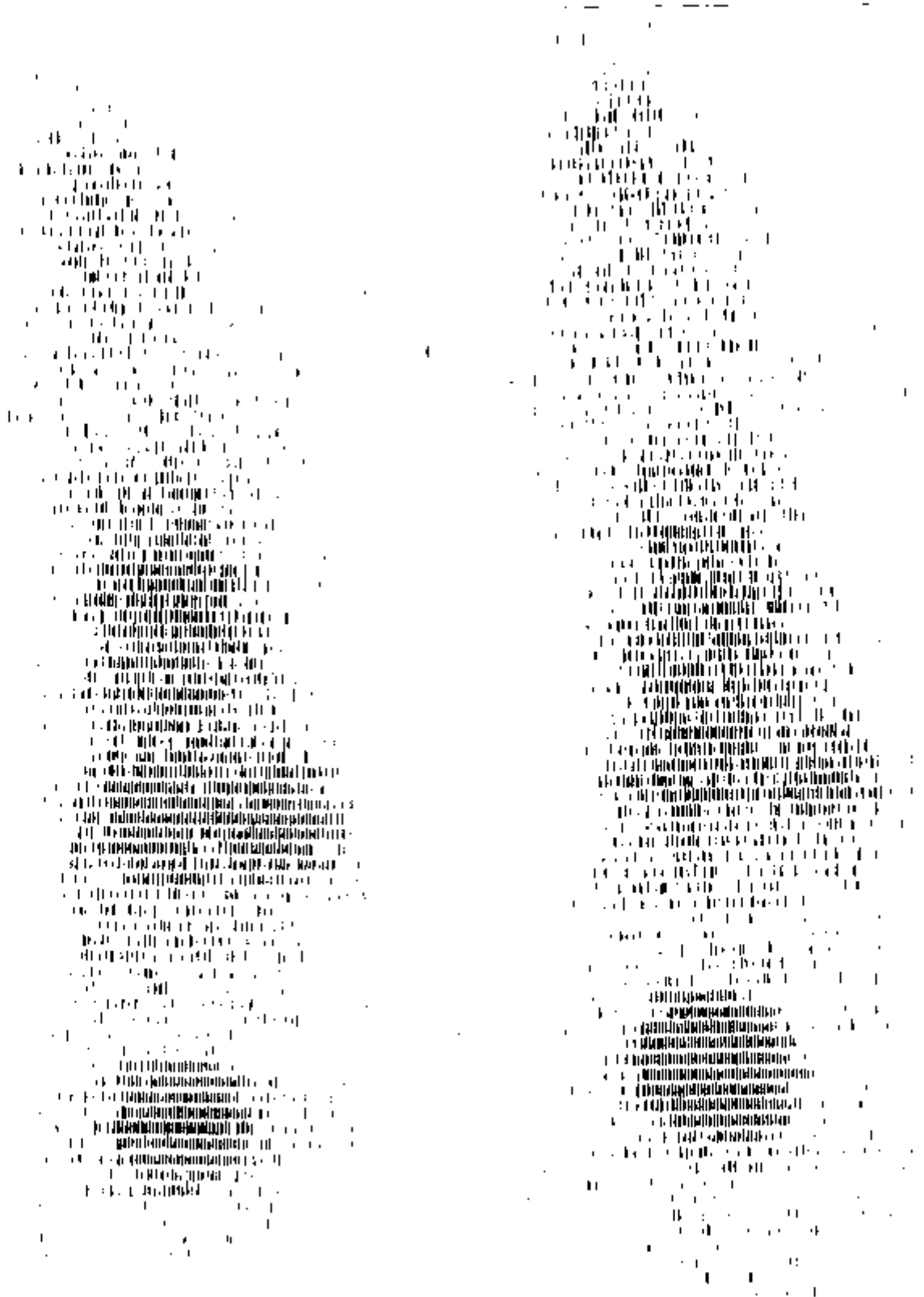


FIG. IV.27. MAPEAMENTO DO CORPO INTEIRO EM ANIMAIS NORMAIS DOSE 60 μ CI VIA INTRAVENOSA APÓS 1 MINUTO E APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO. ANIMAL EM TAMANHO NATURAL.

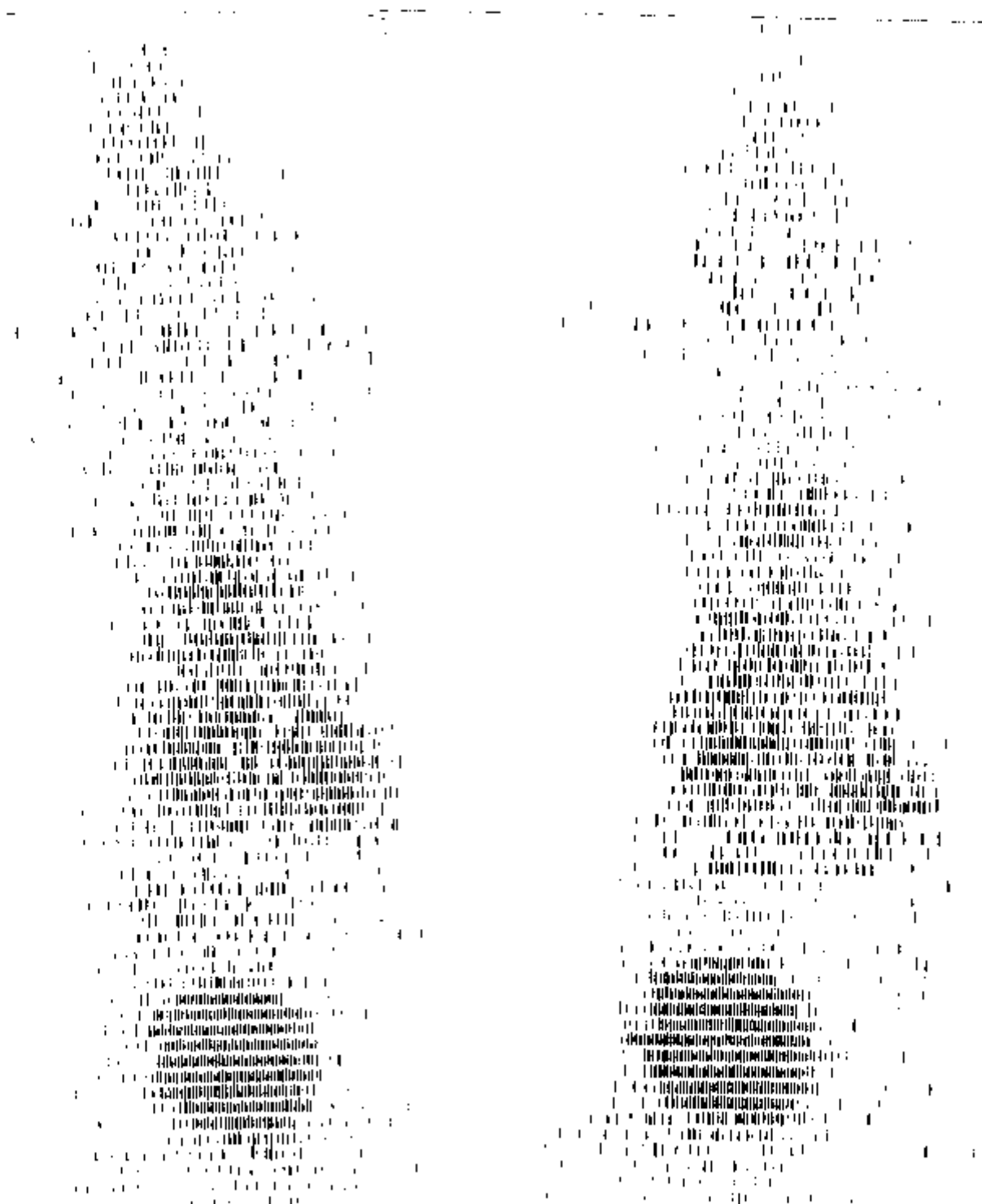


FIG. IV.28. MAPEAMENTO DE CORPO INTEIRO EM ANIMAIS NORMAIS DOSE 60 μ Ci, VIA INTRAVENOSA APÓS 30 MINUTOS E APÓS 60 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO. ANIMAL EM TAMANHO NATURAL.

do radiofármaco no abdômen e acúmulo gradativo nos rins e posteriormente na bexiga.

Na Fig. IV.29 estão representadas as contagens acumuladas nos seguintes órgãos em função do tempo: bexiga, rim esquerdo e rim direito, cabeça, perna e tórax.

Como se verifica, as contagens acumuladas nos rins atingem um máximo em cerca de três minutos, diminuindo consideravelmente em seguida, chegando a um patamar mínimo em cerca de 12 minutos. As contagens acumuladas na bexiga sobem rapidamente, atingindo um patamar máximo em cerca de 20 minutos após a dose.

Os estudos de toxicidade realizados conforme descritos em III.2.5. não apresentaram qualquer alteração nos animais.

IV.4.2. Distribuição Biológica em Ratos Portadores do Carcinoma de Walker 256.

A técnica usada para transplante de tumores sólidos permitiu criar lotes de animais cujo tumor pesava entre 3 a 5 gramas no 6º dia após a inoculação.

A Fig. IV.30. mostra um animal inoculado com o carcinoma de Walker 256 na perna direita.

Os resultados da distribuição biológica do complexo L-asparagina - ^{99m}Tc nos animais transplantados estão na Tabela IV.6. Como se depreende, o radiofármaco acumula-se consideravelmente na massa tumoral entre 15 a 60 minutos, diminuindo em seguida.

Observa-se também que não há acúmulo significativo em outros órgãos ou tecidos, exceção feita para os rins nos primeiros 30 minutos.

Na Tabela IV.7. está representada a razão entre % dose/grama tumor e % dose/grama tecido. Verifica-se que a razão para o sangue é elevada aos 60 minutos após a injeção indicando ser este o tempo mais conveniente para a realização do mapeamento.

Na Fig. IV.31. está representado o mapa de corpo inteiro

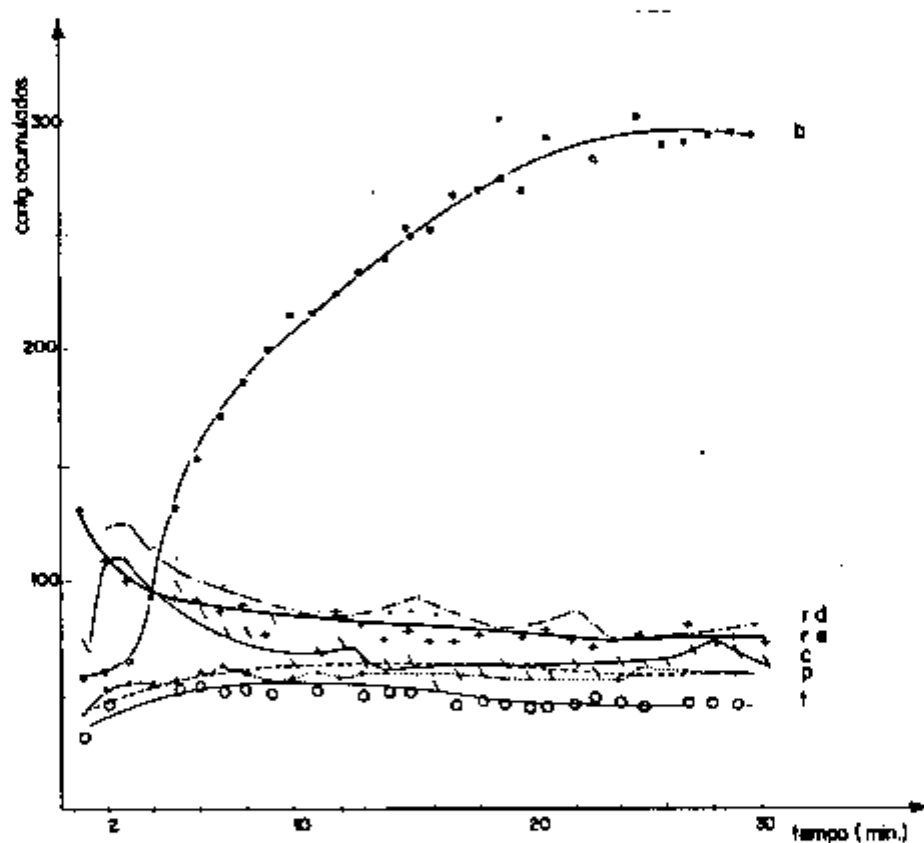


FIG. IV.29. CONTAGENS ACUMULADAS NOS ÓRGÃOS EM FUNÇÃO DO TEMPO. APARELHO FO GAMA. b - BEXIGA; rd - RIM DIREITO; re - RIM ESQUERDO; c - CA BEÇA; p - PERNA; t - TORAX.

TABELA IV.6. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DA L-ASPARAGINA MARCADA COM TECNECIO^{99m} EM RATOS WISTAR PORTADORES DE CARCINOMA DE WALKER-256.

ÓRGÃO	5 min		15 min	
	A	B	A	B
SANGUE	1,2451±0,3403	0,5183±0,0727	2,1485±0,2735	0,8594±0,1895
CORAÇÃO	0,6753±0,0612	3,0899±0,2798	0,8183±0,0201	4,0629±0,9982
PULMÃO	1,8929±0,1212	8,6419±0,1025	0,9361±0,1325	3,2771±0,3589
FÍGADO	3,1171±0,6162	1,1870±0,1757	4,4643±0,9338	1,5808±0,3306
RIM	3,4626±0,4882	7,0728±0,9923	5,6103±0,6279	9,8625±1,1038
BAÇO	0,4585±0,0808	1,7065±0,3016	0,3973±0,0545	1,3332±0,1831
TUMOR	0,5835±0,1098	1,4622±0,1632	48,3845±6,3818	10,0661±2,0951
MÚSCULO	2,2270±0,6820	1,1152±0,3415	3,3591±0,9275	2,7166±0,8543

ÓRGÃO	30 min		60 min	
	A	B	A	B
SANGUE	3,6935±0,9835	1,4774±0,7907	1,9123±0,5134	0,7649±0,2132
CORAÇÃO	0,7201±0,2838	3,5046±1,3817	1,1090±0,6540	5,0454±1,3542
PULMÃO	0,2768±0,0126	0,5481±0,0249	0,2705±0,0351	1,2272±0,8527
FÍGADO	0,6724±0,2372	0,3119±0,1073	3,0637±0,9543	1,0929±0,7530
RIM	3,4322±0,3520	9,3255±0,4564	1,2923±0,0235	2,5936±0,2132
BAÇO	0,3981±0,1741	1,2650±0,9578	1,1416±0,1332	3,3204±0,8102
TUMOR	63,2530±8,3922	14,0562±3,2540	41,4630±8,5140	12,3530±6,5040
MÚSCULO	0,2738±0,0895	0,2131±0,0698	1,6509±0,5341	0,7562±0,1096

ÓRGÃO	120 min	
	A	B
SANGUE	0,8051±0,3235	0,3220±0,1941
CORAÇÃO	0,2786±0,2355	1,0325±0,8728
PULMÃO	0,2613±0,0583	0,4262±0,0934
FÍGADO	0,2841±0,0528	0,0966±0,0179
RIM	1,1715±0,0558	2,4071±0,1132
BAÇO	0,3237±0,1029	1,2223±0,7235
TUMOR	3,8697±0,5996	1,2802±0,1998
MÚSCULO	1,3427±0,4598	0,7536±0,2840

(*) Músculo do fêmur.

A = % da dose inicial/órgão total.

B = % da dose inicial/grama de órgão.

TABELA IV.7
% DOSE/GRAMA TUMOR
% DOSE/GRAMA TECIDO

ÓRGÃO	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
SANGUE	2,8211±0,7103	11,7129±5,0209	9,5141± 7,2945	16,1498±13,0059	3,9758±3,0183
CORAÇÃO	0,4732±0,0944	2,4776±1,1243	4,0107± 2,5097	2,4484± 1,9461	1,2399±1,2415
PULMÃO	0,1692±0,0208	3,0716±0,9757	25,6453± 7,1018	10,0660±12,2942	3,0037±1,1266
FÍGADO	1,2318±0,3198	6,3677±2,6570	45,0663±25,9578	11,3029±13,7391	13,2526±4,5376
RIM	0,2067±0,0520	1,0206±0,3266	1,5072± 0,5035	20,8103± 2,8992	0,5318±0,1080
BAÇO	0,8568±0,2470	7,5503±2,6084	11,1116±10,9856	3,7203± 2,8665	1,0474±0,7834
MÚSCULO*	1,3111±0,5478	3,7054±1,9364	65,9605±14,9844	16,3356±10,9690	1,6988±0,9050

(*) Músculo do fêmur.



FIG. IV.30. RATO PORTADOR DE CARCINOMA
DE WALKER 256.

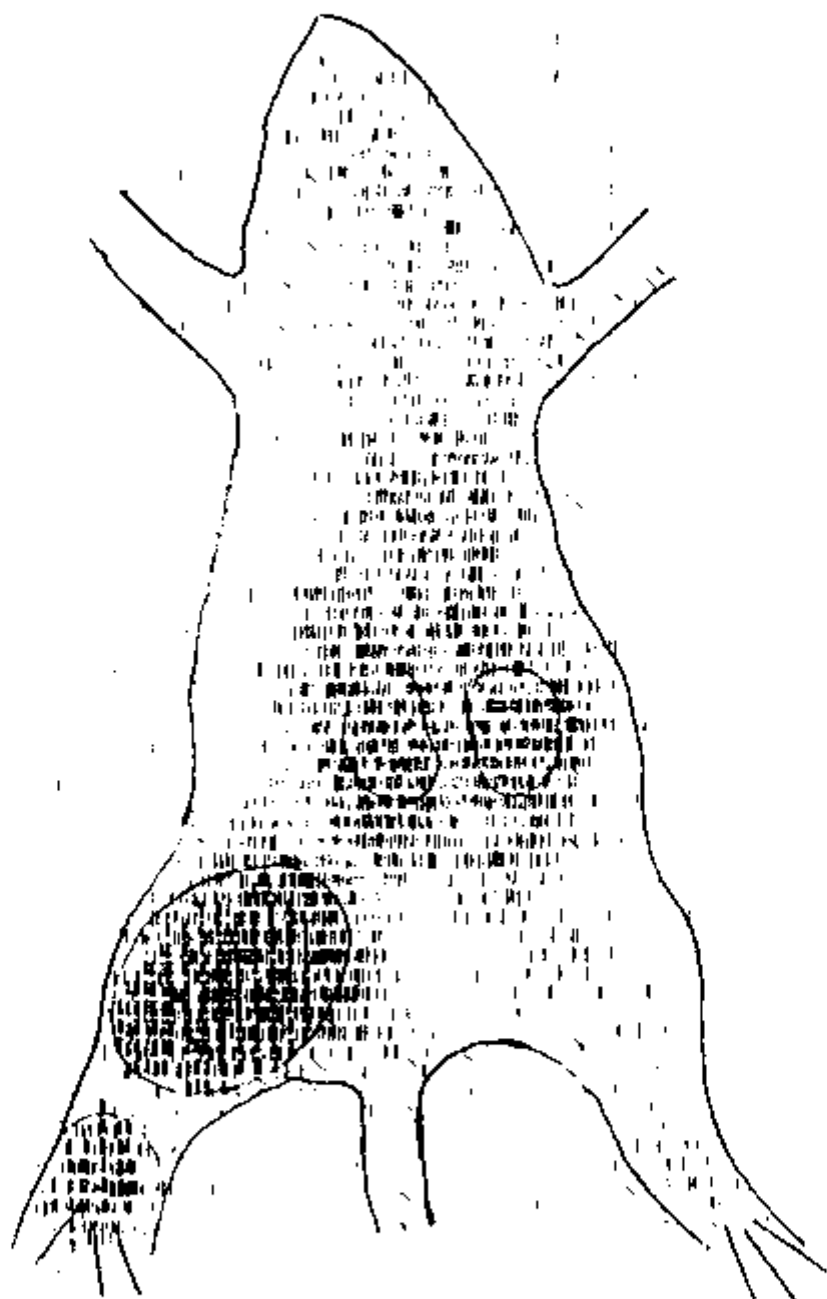


FIG. IV.31. RATO WISTAR (50gr), PORTADOR DO CARCINOMA DE WALKER 256. MAPEAMENTO APÓS 30 MINUTOS DE INJEÇÃO DE 60 μ CI DE L-ASPARAGINA-^{99m}Tc; TUMOR TRANSPLANTADO VISUALIZADO NA COXA DIREITA.

obtido para um animal portador de tumor de Walker 256 injetado com 60uCi de L-asparagina - ^{99m}Tc (atividade específica 30uCi/mg). No mapeamento estão visíveis os rins, o tumor na coxa direita e metástase no pé direito.

V. CONCLUSÕES

1. A hidrazina é capaz de reduzir irreversivelmente o tecnécio +VII em pH = 8,0, tanto ao nível de carregador a 25°C, como ao nível de traçador a 60°C. A espécie reduzida apresenta o estado de oxidação +IV.
2. O tecnécio reduzido é capaz de se incorporar à L-asparagina formando um complexo cristalino cuja análise por espectrofotometria no IV mostrou que a complexação se dá nos grupamentos carboxila e amínico.
3. O produto marcado (L-asparagina-^{99m}Tc), pode ser apresentado sob forma radiofarmacêutica adequada.
4. A distribuição biológica do complexo L-asparagina-^{99m}Tc indicou que o produto não apresenta afinidade por qualquer órgão quando administrado em ratos normais, sendo excretado pelo sistema urinário.
5. Quando administrado em ratos portadores de carcinoma de Walker 256, o produto é captado por esse tumor e por causa de sua elevada "deposição", quer do sangue, quer dos tecidos moles é favorável à formação da imagem tumoral.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMAN, P. & DITTMER, D., editores. Bloody and other body fluids. Washington D.C., Dittmer, 1961.
2. ANDERS, E. The radiochemistry of technetium, Washington D.C., U. S. Atomic Energy Commission, nov. 1960 (NAS-NS 3021).
3. ANGHILERI, L.J. Cr-L-asparagine accumulation by tumors: the influence of L-asparaginase treatment. J. nucl. Biol. Med., 14: 150-2, 1970.
4. ANGHILERI, L.J. Aspartic acid and asparagine complexes with chromium (Cr): their nature and properties. J. nucl. Biol. Med., 15:98-102, 1971.
5. ARFIN, M. Asparagine synthesis in the chick embryo liver. Biochim. biophys. Acta., 136:233-44, 1967.
6. ASTHEIMER, L. & SCHWOCHAU, K. Zur invers - Polarographie des technetiums. J. Elektroanal. Chem., 14:241-242, 1967.
7. ATKINS, H.L. Organic radiopharmaceuticals labeled with isotopes of short-half live V. ¹⁸F labeled 5 and 6 Fluor triptophan. J. nucl. Med., 13 (10):713, 1972.
8. BALDWIN, E. Dynamic aspects of biochemistry. 5.ed. Cambridge, Engl. University Press, 1967, p.230.
9. BELL, G.H.; DAVIDSON, J.N.; SCARBOROUGH, H. Textbook of physiology and biochemistry. 5. ed. Edinburgh, Livingstone, 1963.
10. BELL, R.L. Nuclear cardiology: radiopharmaceuticals that localize in viable myocardium. J. Tenn. Med. Assoc., 67(9):748-52, 1974.
11. BELLAMY, L. The infrared spectra of complex molecules. 3. ed. Lon

- don, Chapman & Hall, 1975.
12. BENSON, W.S. The foundations of chemical kinetics. New York, N.Y., Mc Graw-Hill, 1976 p.26-57.
 13. BERMAN, M. e WEISS, C. User Manual for SAAM. Version SAAM-25. Bethesda Mar., Laboratory of Theoretical Biology. National Cancer Institute, National Institute of Health, 1974.
 14. BESNARD, M.; COSTEROUSSE, O.; MERLIN, L.; COHEN, Y. Pureté radiochimique du complexe technetium 99m etain-acid diethylene-triamino-pentaacetique. J. Radional. Chem., 26:201-8, 1975.
 15. BILLINGHRUST, M.W. Chromatographic quality control of 99m Tc labeled compounds. J. nucl. Med., 14(11): 793-7, 1973.
 16. BLAU, M.; NAGLER, W., BENDER, M.A. Fluorine 18. A new isotope for bone scanning. J. nucl. Med., 3:332-4, 1962.
 17. BOYD, G.E. Technetium and promethium . J. chem. Educ., 36:3-14, 1959.
 18. BOYSE, E.A.; OLD, L.J.; CAMPBELL, H.A.; MASHBURN, L.T. Supression of murine leukemias by L-asparaginase. J. exp. Med., 125(1):17-31,1967.
 19. BRATU, C.; BRATU, G.H.; GALATEANU, I.; ROMAN, M. Study of lower valence states fo technetium. J. Radional. Chem., 26:5-16, 1975.
 20. BROOME, J.D. Evidence that L-asparaginase activity of Guinea Pig serum is responsible for its antilymphoma effects. Nature (London), 191: 1114, 1961.
 21. BROOME, J.D. Evidence that L-asparaginase in guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. J. exp. Med., 118:99-121, 1963.
 22. BROOME, J.D. & SCHWARTZ, J.H. Differences in the production of L-asparagine in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells. Biochem. biophys. Acta, 138:637-9, 1967.
 23. BUSEY, R.M. Chemistry of technetium in hydrochloric acid solution. Wa

- shington D.C., U.S. Atomic Energy Commission, 1959 (OR NL-2782).
24. CLEMENTI, A. apud BOYER, P.D. The Enzymes v. 7:hidrolisis third ed. New York, N.Y. Academic, 1971.
 25. COLOMBETTI, L.C.; MOERLIEN, S.; PATEL, G.C.; PINSKI, S.M. Rapid determination of oxidation state of unbound ^{99m}Tc and labeling yield in ^{99m}Tc labeled radiopharmaceuticals. J. nucl. Med., 17:805-9, 1976.
 26. COLTON, R. The Chemistry of Rhenium and Technetium. London, Interscience, 1965 p.26-30.
 27. COONEY, D.A. & HANDSHUMACHER, R.E. L-asparaginase and L-asparagine metabolism. A. Rev. Pharmac., 10:421-40. 1970.
 28. DAMODARAN, M. & ANANTA NARAYAN, P. In: BOYER, P.D. The enzymes, v.7: hidrolisis 3. ed. New York, N.Y. Academic, 1971 p.140.
 29. DINEEN, R.W. & GRAY, D.O. Synthesis of ^{14}N -ethyl ^{14}C L-asparagine, Radiochem. Radioanal. Lett., 22(3):205-7, 1975.
 30. ECKELMAN, W.C.; MEINKEN, G.; RICHARDS, P. The chemical state of ^{99m}Tc in biomedical products II. The chelation of reduced technetium with DTPA. J. nucl. Med., 13(8):577-81, 1970.
 31. ECKELMAN, W.C.; MEINKEN, G.; RICHARDS, P. Chemical state of ^{99m}Tc in biomedical products. J. nucl. Med., 12(9):596-600, 1971.
 32. ECKELMAN, W.C. & RICHARDS, P. Analytical pitfalls with ^{99m}Tc labeled compounds. J. nucl. Med., 13(3): 202-4, 1972.
 33. ECKELMAN, W.C. & LEVENSON, S.M. Radiopharmaceutical labeled with technetium. J. appl. Radiat. Isotopes. 28:67-82, 1977.
 34. FLORKIN, M. & SOTZ, H.E. Comprehensive biochemistry vol. VI lipids, amino acids and related compounds. Amsterdam, Elsevier, 1965 p.173 .
 35. GALATEANU, I.; BRATU, C.; PETRIDE, A. The reduction of ^{99m}Tc pertechnetate by hydrazine. Radiochem. Radioanal. Lett., 28(1):95-104, 1977.

36. GELBARD, A.S.; CLARKE, L.P.; LAUGHLIN, J.S. Enzymatic synthesis and use of ^{13}N labeled L-asparagine for myocardial imaging. J. nucl. Med., 15(12):1223-5, 1974.
37. GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; Mc DONALD, M.M.; SCHUMACHER, A.M.; ABBOT, B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumours and other biological systems (Third Edition) . Cancer Chemoter. Rep., 3(2):15, 1972.
38. GERLIT, J.B. Some chemical properties of technetium In: UNITED NATION. Peaceful uses of Atomic Energy: proceedings of the international conference on ... held in Genève, 8-20 August, 1955 v. 7. New York, 1956. p.145-51.
39. GLICKSON, J.D.; WEBB, J.; GAMS, R.A. Effects of buffers and pH "in vi vo" binding of ^{67}Ga by L 1210 leukemic cell. Cancer Res. 34(3):2957-60 , 1974.
40. GOLCHERT, N. & SEDLET, J. Analytical Chemistry of technetium. A.C.S. Meeting Paper n° 15 (3), April 1967.
41. GOLDSTEIN, T.; BANERJI, M.A.; LANGE, R.C. Potentiometric and paper chromatography studies of reduced technetium using ^{99}Tc and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. J. nucl. Med., 13(6):432, 1972.
42. GOUVEA, A.S. & MESQUITA, C.H. Anacron A computer code for radiochromatograms analysis. Third International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry. Washington University St. Louis, Missouri, USA, June 16-20, 1980.
43. GULLINO, P.M. Modification of the acid base status of the internal milieu of tumours. J. natl. Cancer Inst., 34:857, 1965.
44. HALPERN, Y.S. & GROSSWICZ, N. Hidrolysis of amides by extracts of Mycobacteria. Biochem. J., 65:716-20, 1957.
45. HANDSHUMACHER, R.E. & OSUMY, Y. Asparagine distribution and regulation implications for therapy. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 11:34, 1970.
46. HAYES, R.L. Factors affecting uptake of radioactive agents by tumour

- and other tissues. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Tumour localization with radioactive agents: proceedings of an advisory group meeting held in Vienna 9-13 December, 1974. Vienna, 1976 p.29-45.
47. HAYES, R.L. & EDWARDS, C.L. New applications of tumour localizing radio pharmaceutical. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Medical radio isotope scintigraphy: proceedings of a symposium on ... held in Monte Carlo. 23-28 October, v.2 Vienna, 1973 p.531-52.
 48. HARPER, P.V.; BECK, R.; CHARLESTON, D.; LATHROP, K.A. Optimization of a scanning method using ^{99m}Tc . Nucleonics, 22(1):50-54, 1964.
 49. HARTLEY, B.S. Proteolytic Enzymes. Ann. Rev. Biochemistry 29:45-72,1960.
 50. HODARA, I.; SILVERMAN, C.; BALOUKA, I. The electrochemical and chemical reduction of pertechnetate. Radiochimica Acta, 18(2):67-71. 1972.
 51. KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced "in vivo" by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum and rabbit serum. J. Exptl. Med., 98:565-82, 1953.
 52. LEGUTKO, L.; ZAJIAKOWSKI, G.; HACIKOWSKA, L.; PITUCH, A.; CYRILS, R. 2-10 fold asparaginase treatments in children with lymphoproliferative diseases. Folia haematol. (Leipz), 106(5):644-650, 1976.
 53. MAJUMDAR, S.K.; PACER, P.A.; RULFS, C.L. Rhenium and technetium (VI) and meso-(VII) species. J. Inorg. nucl. Chem., 31:33-41, 1969.
 54. MACQUARDT-BEVINGTON. Date reduction and analysis for the physical sciences. McGraw Hill, 1969, p.234-240.
 55. MASHBURN, L.T. & WRISTON JR., J.C. Tumour inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 105:450-2,1964.
 56. MEDICINES COMMISSION, British pharmacopoeia, 1973. Appendix I-A, p.A26.
 57. Mc CREADY, V.R. & TROTT, N.G. Tumour-localizing pharmaceuticals In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Tumour localization with radioactive agents: proceedings of an advisory group meeting held in Vienna,

9-13 December, 1974. Vienna, 1976 p.1-27.

58. NAKAMOTO, K. Infrared spectra of inorganic and coordination compounds. New York, N.Y., Wiley, 1963.
59. NEUMAN, R.E. & Mc COY, T.A. Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 "in vivo" for asparagine and glutamine. Science, New York, N.Y., 124:124, 1956.
60. NODDACK, TACKE, BERG apud GILREATH, E.S. In Fundamental concepts of inorganic chemistry, New York, N.Y., McGraw, 1958 p.390.
61. OLD, L.J.; BOYSE, E.A.; STOCKERT, E. Antigenic properties of experimental leukemias. Serological studies "in vitro" with spontaneous and radiation induced leukemias. J. Natl. Cancer Institute, 31:1977.
62. OWUNWANNE, A.; MARINSKY, J.; BLAU, M. Charge and nature of technetium species produced in the reduction of pertechnetate by stannous ions. J. nucl. Med., 18(11):1099-105, 1977.
63. PATTERSON, A.H.G. & McCREADY, V.R. Review article: tumour imaging radio pharmaceuticals. Br. J. Radiol., 48:520-31, 1975.
64. PATTERSON JR., M.K. & ORR, G.R. Asparagine biosynthesis by the Novikoff hepatoma. J. Biol. Chem., 243(2):376-80, 1968.
65. PATTERSON, R.I. & CIEGLER, A. L-asparaginase production by various bacteria. Appl. Microbiol., 17(6):929-30, 1969.
66. PERRIER, C. & SEGRÉ, E. Some chemical properties of element 43. J. Chem. Phys., 5:712-16, 1937.
67. PERRIER, C. & SEGRÉ, E. Some chemical properties of element 43(II). J. Chem. Phys., 7:155-6, 1939.
68. POTCHEN, E.J.; ELLIOT, A.J.; SIEGEL, B.A. Pathophysiologic basis of soft tissue tumor scanning. J. Surg. Oncol., 3:593-602, 1974.
69. ROTEMBERG, A.D.; BRUCE, W.R.; BAKER, R.G. Incorporation of 5 iododeoxyuridine ¹³¹I in spontaneous C 3H mouse mammary tumours. Br. J. Radiol.,

35:337-42, 1962.

70. RULFS, C.L.; PACER, R.A.; HIRSCH, R.F. Technetium chemistry oxidation, states, and species. J. Inorg. nucl. Chem., 29:681-91, 1967.
71. RUSSEL, C.D. & CASH, A.G. Polarographic reduction of pertechnetate. J. Electroanal. Chem., 92:85-99, 1978.
72. SALARIA, G.B.S.; RULFS, C.L.; ELVING, P.J. Spectrophotometric studies of lower oxidation states of technetium. Talanta, 10:1159-63, 1963.
73. SALARIA, G.B.S.; RULFS, C.L.; ELVING, P.J. Polarographic and coulometric determination of technetium. Analyt. Chem., 35(8):979-82, 1963.
74. SANDERS, T.P. & KUHL, D.E. Selective uptake of radionuclides as a basis of tumour detection. Radiol. Clin. North Am., 7:257-65, 1969.
75. SCHMALFUSS, K. & MOTHES, K. Über die fermentative desamidierung durch *Aspergillus niger*. Biokem. Z., 221:134, 1930.
76. SCHUKLA, S.K. Reduction of pertechnetate-99m ion by hydrochloric acid. Preparation of chromatographically pure technetium-99m(IV). J. Chromat., 151:51-7, 1978.
77. SCHULER, D.; KOIOS, R.; RIEVIETZ, T.; VIRIAG, I.; GIALEI, I. L-asparaginase therapy and its complications in acute lymphoid leukemia and generalized lymphosarcoma. Haematologia (Budap.), 10(2):205-11, 1976.
78. SEN, D.M.; MIZUSHINA, S.; CURRAN, C.; QUAGLIANO, J.V. Infrared absorption spectra of inorganic coordination complexes. I. The nature of chelation bondind in Bis (glycino) nickel (II) dihydrate. J. Am. chem. Soc., 77:211-2, 1955.
79. STELMACH, H.A. & QUINN, J.L. Radiopharmaceutical quality control. Semin. nucl. Med., 4(3):295-303, 1974.
80. SVATOS, G.F., CURRAN, C.; QUAGLIANO, J.V. Infrared absorption spectra of inorganic coordination complexes. V. The N-H stretching of inorganic coordination compounds. J. Am. chem. Soc., 77:6159-63, 1955

81. SUBRAMANIAN, G.; RHODES, B.A.; COOPER, J.F.; SODD, V.J. Radiopharmaceuticals, New York, N.Y., The Society of Nuclear Medicine Inc., 1975.
82. SWEENEY, D.M.; CURRAN, C.; QUAGLIANO, J.V. Infrared absorption spectra of inorganic coordination complexes. IV. The infrared spectrum of Bis (glycino) zinc (II) monohydrate. J. Am. chem. Soc., 77:5508, 1955.
83. TATOR, C.H. Uptake of radiiodinate protein and amino acids by mouse glioma and brain. Arch. Neurol., 18:202-7, 1968.
84. TUBIS, M. & WOLF, W. Radiopharmacy, New York, N.Y. Wiley, 1976 p. 289-90.
85. YANO, Y. Determination of positron emitting radionuclides for imaging of positron emitting radionuclides for imaging with improved positron detectors. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Medical Radionuclide Imaging: proceedings of a Symposium...held in Los Angeles 25-29 October, 1976. Vienna, 1977.
86. ZIMMER, M.A. & PAVEL, D.G. Rapid miniaturized chromatographic quality control procedures for Tc-99m radiopharmaceuticals. J. nucl. Med. 18: 1230-3, 1977.