

23/12/76

V

27-2



SÍNTESE E MARCAÇÃO DE 19-IODOCOLESTEROL ¹³¹I

Elena Setuko Hamada

<p>DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 153 IEA - DT - 153</p>	<p>FEVEREIRO/1979</p>
---	------------------------------

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach – Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

SÍNTESE E MARCAÇÃO DE 19-IODOCOLESTEROL ¹³¹I

Elena Setuko Hamada

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em
Tecnologia Químico-Farmacêutica" – Orientador Prof.
Dr. José Carlos Barbério. Apresentada e defendida em
24 de novembro de 1978, na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

B13

**Cholesterol
Radiopharmaceuticals
Synthesis
Adrenal glands
Iodine 131
Labelling**

NOTA: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVO	2
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	3
3.1 – Material	3
3.1.1 – Equipamentos	3
3.1.2 – Reagentes Químicos	3
3.1.3 – Cromatografia	3
3.1.4 – Radioelemento	3
3.2 – Métodos	4
3.2.1 – Preparação de Reagente	4
3.2.1.1 – N-Br-Acetamida	4
3.2.2 – Preparação de 19-Iodocolesterol ¹³¹ I	4
3.2.2.1 – 3 β -Acetoxi-5 α -Br-6 β -Hidroxi Colestano (II)	4
3.2.2.2 – 3 β -Acetoxi-5 α -6 β -19-Óxido-Colestano (III)	4
3.2.2.3 – 3 β -Acetoxi-19-Hidroxi-Colest-5-eno (IV)	6
3.2.2.4 – 3 β -Acetoxi-19-p-Tolueno Sulfonato de Colest-5-eno (V)	6
3.2.2.5 – 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno (VI)	6
3.2.3 – Marcação	6
3.2.4 – Controle Radioquímico	7
3.2.5 – Distribuição Biológica	7
4 – RESULTADOS	7
4.1 – Sínteses e Análises	7
4.1.1 – N-Br-Acetamida	7
4.1.2 – 3 β -Acetoxi-5 α -Br-6 β -Hidroxi-Colestano (II)	8
4.1.3 – 3 β -Acetoxi-5 α -Br-6 β -19-Óxido-Colestano (III)	8

	Página
4.1.4 – 3 β -Acetoxi-19-Hidroxi Colest-5-eno (IV)	13
4.1.5 – 3 β -Acetoxi-19- ρ -Tolueno Sulfonato de Colest-5-eno (V)	13
4.1.6 – 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno (VI)	18
4.2 – Marcação	18
4.2.1 – Determinação do Rendimento da Marcação em ¹³¹ I	18
4.2.2 – Controle Radioquímico	18
4.3 – Formulação do 19-Iodocolesterol ¹³¹ I	18
4.4 – Distribuição Biológica	21
5 – DISCUSSÃO	23
5.1 – Síntese e Análise	23
5.2 – Marcação	26
5.3 – Distribuição Biológica	26
6 – CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

SÍNTESE E MARCAÇÃO DE 19-IODOCOLESTEROL ¹³¹I

Elena Setuko Hamada

RESUMO

Tendo em vista o crescente interesse, no campo da Medicina Nuclear, na obtenção de agentes capazes de visualizar a glândula supra-renal por técnicas radioisotópicas, preparou-se o 19-iodocolesterol por síntese química introduzindo-se o radioiodo (¹³¹I) por reação de troca isotópica.

Identificam-se os produtos, após cada reação, através da determinação do ponto de fusão, de análise elemental e de análises espectroscópicas, como absorção em infra-vermelho e ressonância nuclear magnética.

Para a análise radioquímica do composto marcado realizou-se a cromatografia em camada delgada de sílica Gel.

A distribuição biológica de 19-iodocolesterol ¹³¹I em animais de laboratório foi, igualmente, realizada com o propósito de confirmar sua capacidade de concentração na glândula supra-renal.

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o emprego de produtos radiofarmacêuticos em Medicina Nuclear vem se destacando.

Eles têm possibilitado os mais variados tipos de exame e investigação clínica permitindo, principalmente, a visualização de numerosos órgãos e sítios do organismo.

Esta evolução vem se fazendo à custa da utilização de traçadores radioativos, cada vez mais específicos e inócuos ao organismo.

Tendo em vista o crescente interesse, da Medicina Nuclear, em obter um agente capaz de visualizar a glândula supra-renal e tumores associados, por técnicas radioisotópicas, numerosas investigações têm sido realizadas neste campo.

Certos autores constataram que alguns esteróides são sintetizados e armazenados na glândula, enquanto outros têm afinidade por ela^(4,21). Os primeiros esteróides usados como traçadores radioativos eram beta emissores.

NAGAI e colaboradores⁽²⁸⁾ obtiveram a incorporação de trício (³H) na molécula de estigmasterol e estudos realizados em animais revelaram grande afinidade pelo órgão. APPELGREN⁽⁴⁾ comprovou a afinidade do colesterol ¹⁴C e da progesterona ¹⁴C pela supra-renal de ratos e resultados semelhantes foram descritos por HANNGREN e colaboradores⁽²¹⁾ na utilização de cortisona ¹⁴C, estrona ¹⁴C e hidrocortisona-4-¹⁴C.

A importância do colesterol se destaca pelo fato de ser o principal precursor de vários esteróides, existentes em maior quantidade na glândula supra-renal, principalmente na forma esterificada⁽²⁰⁾.

Aprovada para publicação em fevereiro/1979.

A quantidade de colesterol encontrada no órgão de animais e no homem é da ordem de 2 – 6% da glândula dessecada⁽²⁰⁾.

Esta informação levou alguns autores a tentar a obtenção do colesterol marcado com um isótopo radioativo^(14,15).

Por suas propriedades físicas favoráveis à detecção e medidas "in vivo", o iôdo ¹³¹I constituiu-se no radioelemento mais utilizado em Medicina Nuclear. Este traçador apresenta várias emissões gama, sendo a principal, a de 364 Kev. Sua meia vida física é igual a 8,05 dias.

A introdução de ¹³¹I na molécula do colesterol, usando como oxidante cloramina T, baseia-se na simples adição de ¹³¹I ao composto, na posição 5-6, formando diiôdo derivado⁽²⁸⁾; essa "marcação", entretanto, pode levar à formação de um produto inativo derivado do colesterol.

Os primeiros compostos preparados com radioiôdo, ¹³¹I ou ¹²⁵I, revelaram-se instáveis "in vivo" ou "in vitro". Citam-se, na literatura, o estigmasterol ¹³¹I^(28,29) que foi utilizado em alguns casos de mapeamento da glândula supra-renal. Este radiofármaco não obteve sucesso devido ao acúmulo da radioatividade no fígado, principalmente, e uma posterior liberação de iôdo no suco gástrico.

Também mereceu destaque a radioiodação de substâncias análogas ao diclorodifenildicloroetano ou DDD: 1,1-dicloro-2-(p-clorofenil)-2-(o-iodofenil ¹²⁵I) etano (ou o,p'DDD¹²⁵I) e 1,1-dicloro-2-(m-clorofenil)-2-(p-clorofenil) etano ¹²⁵I (ou m,p'DDD¹²⁵I), como agentes cintigráficos da supra-renal^(16,17,18).

Em 1970, COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾ verificaram a possibilidade de marcação do colesterol através de síntese química, sem alteração da estrutura básica da molécula. Basearam-se na introdução do halogênio na posição 19 do anel esteróidico, parecendo uma escolha lógica para os estudos iniciais. Depois, por meio de reação de troca isotópica, utilizando-se ¹³¹I ou ¹²⁵I, prepararam um composto que se revelou um radiofármaco útil para a cintilografia da glândula supra-renal⁽⁷⁾.

Por meio de 19-Iodocolesterol marcado com iôdo radioativo, várias doenças relativas à glândula puderam ser melhor diagnosticadas^(3,8,9).

Recentes estudos demonstraram a aplicação de 19-Iodocolesterol marcado no diagnóstico de aldosteronismo primário⁽¹⁰⁾ carcinoma adrenocortical⁽²⁵⁾ e síndrome de Cushing^(8,26).

Dada a importância que essa droga apresenta na propedêutica médica e a inexistência da mesma no mercado nacional, por dificuldade ou alto custo de importação, verificou-se o interesse do Centro de Processamento de Material Radioativo do Instituto de Energia Atômica na preparação de 19-Iodocolesterol ¹³¹I, com vistas ao seu uso diagnóstico.

2 – OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi o de obter, por síntese química, o 3β-acetoxi 19-Iodocolest-5-eno e, posteriormente, introduzir o iôdo radioativo por meio da reação de troca isotópica.

O produto final, submetido aos controles de qualidade poderá, eventualmente, ser utilizado como radiofármaco em Medicina Nuclear para visualização da glândula supra-renal.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1 – Equipamentos

Para a realização do presente trabalho utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- 1) Ponto de Fusão
Aparelho de Ponto de Fusão -- modelo Mettler FP5 acoplado a FP51.
- 2) Espectro de Ressonância Nuclear Magnética -- Varian, modelo T-60, operando com uma fonte de radiofrequência de 60 MHz.

Os deslocamentos químicos (δ) foram descritos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (T.M.S.), usado como referência interna e como solvente, tetracloreto de carbono. As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hertz (Hz) e as características dos picos em singlete (s.), duplete (d.) multiplete (m.) e pico largo (p.l.).

- 3) Espectro de absorção no Infravermelho
Espectrofotômetro de Infravermelho -- Perkin-Elmer, modelo 710-A. A técnica empregada foi a dissolução dos produtos em cloreto de metileno e aplicação em célula desmontável, sendo cada amostra preparada na concentração de 5% e espessura de 1 mm.
- 4) Análise elementar
Para determinação de C e H utilizou-se um Analisador Elementar -- Perkin-Elmer, modelo 240.
- 5) Contagem de ^{131}I
A radioatividade emitida pelo ^{131}I foi medida em Cintilador de poço, dotado de um cristal de NaI(Tl) -- Nuclear Chicago, modelo Ultrascaler II.
- 6) Para concentrar as soluções orgânicas utilizou-se um Evaporador Buchler operando a temperaturas de até 60°C em pressão reduzida.

3.1.2 – Reagentes Químicos

Os reagentes químicos utilizados eram de grau de pureza P.A., de procedência Merck, Sigma, Baker e Carlo Erba.

Alguns reagentes como piridina⁽²⁷⁾, zinco e cloreto-p-toluenossulfonila⁽¹⁸⁾ foram purificados até que as purezas fossem constatadas através dos valores de suas constantes físicas referidas na literatura.

3.1.3 – Cromatografia

Utilizaram-se placas de sílica Gel G₂₅₄ de 20,0 x 20,0 cm Merck.

3.1.4 – Radioelemento

Usou-se iodeto de sódio (Na ^{131}I), livre de carregador e de redutor, produzido pela Union Carbide -- USA.

3.2 – Métodos

3.2.1 – Preparação de Reagente

3.2.1.1 – N-Br-Acetamida⁽³⁰⁾

A uma solução de 10 g de acetamida em 9,0 ml de bromo adicionou-se, lentamente e com agitação, uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 50% até a mistura se tornar amarelo-pálida. A seguir, deixou-se em repouso por 3 horas à temperatura de 0–5°C. Após resfriamento tratou-se a mistura com 20 g de cloreto de sódio e 100 ml de clorofórmio, aquecendo-se por 2–3 minutos e agitando-se vigorosamente. Separou-se a camada clorofórmica de cor vermelha repetindo-se a extração por mais duas vezes com 100 ml e 50 ml de clorofórmio, respectivamente. O extrato clorofórmico, seco sobre sulfato de sódio anidro, foi tratado com hexano. O extrato foi mantido a 0°C por uma hora, após a qual os cristais de n-Br-Acetamida formados foram filtrados a vácuo.

Grau de pureza:

Efetuuou-se o clareamento do bromo orgânico com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1 N.

A uma quantidade exatamente pesada de n-Br-Acetamida dissolveram-se 10 ml de iodeto de potássio a 10%, acidificando-se com 10 ml de ácido sulfúrico a 10% e titulando-se com tiosulfato de sódio 0,1 N.

3.2.2 – Preparação de 19-Iodocolesterol¹³¹

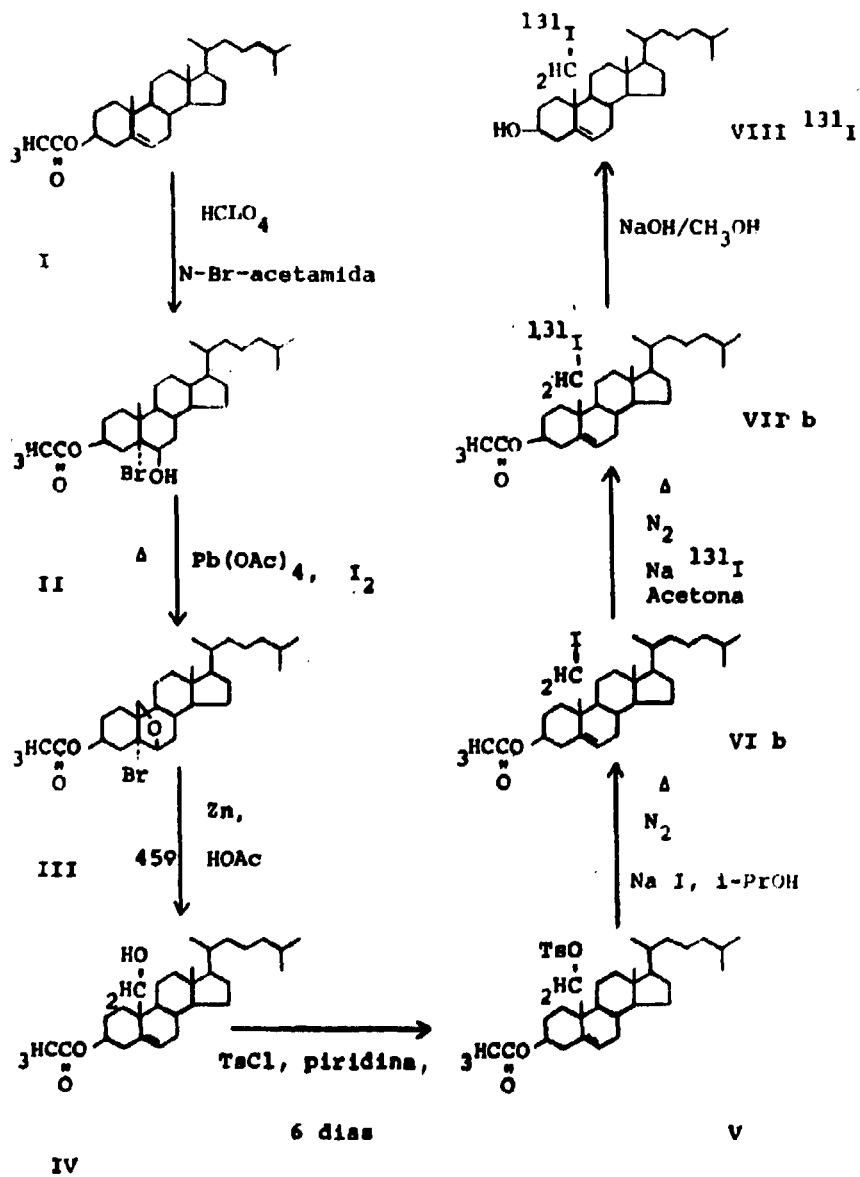
O precursor inicial da síntese de 19-Iodocolesterol é o 3β-acetoxi-19-p-tolueno sulfonato de colest-5-eno, análogo do colesterol que foi obtido de maneira similar ao descrito por KALVODA e colaboradores⁽²³⁾ e AKHTAR e BARTON⁽¹⁾. Posteriormente, a síntese do 19-Iodocolesterol¹³¹, propriamente dita, fundamentou-se nos trabalhos de COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾, com modificações introduzidas por COUCH e colaboradores^(11,12), como pode ser apreciado no esquema da página seguinte.

3.2.2.1 – 3β-Acetoxi-5α-Br-6β-Hidroxi-Colestano (II)⁽²³⁾

Dissolveram-se 6,0 g de acetato de colestano (I) em 60 ml de dioxano e adicionaram-se, juntamente com 4,4 ml de ácido perclórico diluído (4,66 ml de HClO₄ 70% em 20 ml de água), 3,0 g de n-Br-acetamida em 3,0 ml de água destilada. Esta mistura foi deixada em repouso por 15 minutos à temperatura de 10°C e por 30 minutos sob agitação mecânica à temperatura ambiente. A seguir, a 5°C, adicionaram-se lentamente, 36 ml de tiosulfato de sódio a 1%. A emulsão formada foi diluída com 20 ml de água destilada e extraída com éter etílico. Separou-se o extrato etéreo e removeu-se o solvente à pressão reduzida, obtendo-se um resíduo oleoso que se dissolveu em clorato de metileno-éter etílico (1:2). Em seguida, adicionou-se éter de petróleo e com o resfriamento a 0°C formou-se um precipitado branco, recristalizado 3 vezes em éter de petróleo.

3.2.2.2 – 3β-Acetoxi-5α-Br-6β-19-Óxido-Colestano (III)⁽²³⁾

Uma solução contendo 10,1 g de tetraacetato de chumbo e 4,6 g de carbonato de cálcio em 200 ml de ciclohexano foi aquecida ligeiramente a 80°C. Em seguida, adicionaram-se 2,2 g de iodo metílico e 2,0 g do produto (II) preparado no item 3.2.2.1.



Esquema das Sínteses e Marcação de 19-iodocholesterol ^{131}I

A mistura formada, de cor violácea, foi submetida a refluxo sob irradiação de lâmpada de 500 watts, com forte agitação mecânica, até o descoloramento da solução. Após o resfriamento da mistura, filtrou-se através de filtro de Gouch contendo uma fina camada de celite, lavando-se com 30 ml de ciclohexano. Diluiu-se o filtrado com 20 ml de éter etílico e adicionaram-se 28 ml de tiosulfato de sódio a 10%, lavando-se em seguida com 50 ml de água. Separou-se a fase orgânica e após a remoção do solvente à pressão reduzida, tratou-se o resíduo formado com éter etílico e metanol. O produto III foi recristalizado em metanol por 2 vezes.

3.2.2.3 – 3 β -Acetoxi-19-Hidroxi-Colest-5-eno (IV)⁽²³⁾

A 3,0 g do produto (III), preparado no item 3.2.2.2, dissolvidos em 99,5 ml de ácido acético glacial e 4,4 ml de água destilada adicionaram-se, durante 15 minutos, com forte agitação, 11,9 g de zinco em pó, mantendo-se temperatura de 45 – 50°C. Após 60 minutos de reação, a suspensão formada foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Tratou-se o resíduo com éter etílico e cloreto de metileno (5:1). Adicionou-se, lentamente, carbonato de sódio a 10% até neutralização da mistura, lavando-se várias vezes com água destilada. Da fase orgânica, removeu-se o solvente e tratou-se o resíduo com uma mistura de cloreto de metileno-éter etílico (1:2). Desta mistura, após recristalização em éter de petróleo – mantida a temperatura de 0°C – obteve-se o produto IV.

3.2.2.4 – 3 β -Acetoxi-19-p-Tolueno Sulfonato de Colest-5-eno (V)⁽¹¹⁾

Dissolveram-se 1,17 g do produto (IV), preparado no item 3.2.2.3., em 30 ml de piridina e adicionaram-se 2,5 g de cloreto-p-toluenossulfonila. Após 6 dias de reação à temperatura ambiente, procedeu-se à extração com éter etílico. Removeu-se o solvente à pressão reduzida e dissolveu-se o resíduo formado em clorofórmio. Posteriormente, por cristalização em metanol a 0°C, obteve-se o produto V.

3.2.2.5 – 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno (VI)⁽¹⁴⁾

Dissolveram-se 300 mg do produto (V), item 3.2.2.4., e 200 mg de iodeto de sódio em 20 ml de isopropanol; suavemente, esta mistura foi submetida a refluxo a 60°C, sob borbulhamento de nitrogênio, durante 4 horas. Em seguida, concentrou-se até cerca de 5,0 ml e adicionaram-se 10,0 ml de água gelada. Efetuou-se a extração com 15 ml de éter por duas vezes. Evaporou-se o solvente, obtendo-se um resíduo oleoso que se solidificou em 0,5 ml de éter de petróleo. Após duas recristalizações em acetona-metanol obteve-se o produto VI.

3.2.3 – Marcação⁽¹¹⁾

Dissolveram-se 10 mg de 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno, item 3.2.2.5., em 15 ml de acetona adicionando-se cerca de 5 mCi de Na¹³¹I livre de carregador e de redutor. Esta mistura foi submetida a refluxo a 60°C, sob ambiente de nitrogênio, durante 4 horas, a fim de ocorrer a reação de troca isotópica. A seguir, evaporou-se a acetona e adicionaram-se 2,0 ml de água gelada, efetuando-se a extração com 3,0 ml de éter etílico por três vezes. Secou-se em sulfato de sódio anidro e evaporou-se o extrato etéreo sob ambiente de nitrogênio.

Dissolveu-se o resíduo formado com 2,0 ml de dioxano e adicionaram-se, lentamente, 5,0 ml de uma solução metanólica de hidróxido de sódio (1 g de NaOH, 1 ml de água e 99 ml de metanol); a mistura foi submetida a agitação magnética em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de água gelada e extraiu-se a mistura formada com 2,0 ml de éter etílico por três vezes.

Secou-se o extrato etéreo em sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente até securo. Obteve-se um resíduo branco de 19-Iodocolesterol ^{131}I (VIII- ^{131}I).

3.2.4 – Controle Radioquímico

Utilizou-se a técnica de cromatografia em camada delgada em placas de sílica Gel – G₂₅₄ (com dimensões de 20,0 cm x 20,0 cm) desenvolvida em solvente de clorofórmio (CHCl₃).

A medida dos R_f do composto marcado e do iodo não incorporado ao composto (íodo livre), foi feita semeando-se uma alíquota de 19-Iodocolesterol ^{131}I e uma de iodeto (carregador).

O tempo de corrida da cromatografia foi de 20 minutos.

Detectaram-se duas manchas, fosforescentes à luz Ultra-Violeta, tendo o iodeto sido revelado com solução de acetato de chumbo a 10% (cor amarela).

Determinou-se a radioatividade de cada centímetro e o resultado foi lançado em gráfico relacionando a porcentagem de radioatividade em função do R_f calculado.

3.2.5 – Distribuição Biológica

O estudo da eletividade biológica do 19-Iodocolesterol ^{131}I foi realizado para confirmar sua capacidade de concentração na glândula supra-renal.

Utilizaram-se 14 ratos machos, linhagem Wistar, pesando em média 260 g.

Todos os animais receberam, por via endovenosa (artéria dorsal do pênis), cerca de 80 μCi , contidos em 0,5 ml de radiofármaco.

Acompanhou-se a distribuição da radioatividade nos diferentes órgãos, sacrificando-se os animais nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, após a dose administrada. Os órgãos extraídos foram: glândula supra-renal, tireóide, rins, baço, fígado, coração e pulmões.

Pesaram-se os órgãos e a radioatividade foi determinada em contagens por minuto (cpm), utilizando-se de contador de radiação gama.

Em todas as experiências manteve-se a mesma solução padrão de 19-Iodocolesterol ^{131}I .

4 – RESULTADOS

Dentro do esquema proposto para a síntese química do 19-Iodocolesterol marcado com ^{131}I , os resultados obtidos com os respectivos rendimentos, análise elementar, análises espectroscópicas, radioiodação, controle radioquímico, distribuição biológica, bem como algumas de suas propriedades, foram os seguintes:

4.1 – Sínteses e Análises

4.1.1 – N-Br-Acetamida

Obteve-se 8,09 g, com rendimento de 38%. Ponto de fusão 103-105°C. Ponto de fusão segundo literatura 102-105°C⁽³⁰⁾.

Determinou-se o grau de pureza de N-Br-Acetamida pela seguinte equação:

$$\% \text{ de n-Br-Acetamida} = \frac{\text{ml S}_2\text{O}_3 \cdot \text{Normalidade} \cdot 69}{\text{peso da amostra (mg)}} \cdot 100$$

grau de pureza obtido: 98 – 99%
pela literatura: 98 – 100%

4.1.2 – 3β-Acetoxi-5α-Br-6β-Hidroxi-Colestano (II)

Obteve-se 3,52 g do produto (II), item 3.2.2.1., com rendimento da ordem de 48%.

Ponto de fusão: 167 – 168°C

Ponto de fusão segundo literatura: 168 – 169°C⁽²³⁾.

Análise elementar

Calculado para C₂₉H₄₉O₃Br: C = 66,27%; H = 9,40%

Encontrado: C = 65,84%; H = 9,28%

Infravermelho em CH₂Cl₂, concentração 5%. Figura 1.a.

O espectro de absorção infravermelho mostrou as seguintes bandas características (cm⁻¹):

3600 (νO-H); 2950 (νC-H)

1730 (νC=O); 810 (νC=C)

Ressonância Nuclear Magnética em CCl₄. Figura 1.b.

O espectro de ressonância nuclear magnética apresentou os seguintes picos (δ): 5,40 (p.l., 1H, C₃-H); 4,13 (p.l., 1OH, C₆-OH); 1,98 (s., 3H, CH₃COO⁻).

4.1.3 – 3β-Acetoxi-5α-Br-6β-19-Óxido-Colestano (III)

Obteve-se 1,20 g do produto (III), item 3.2.2.2., com rendimento de 60%.

Ponto de fusão: 148°C

Ponto de fusão segundo literatura: 148 – 149°C⁽²³⁾.

Análise elementar

Calculado para C₂₉H₄₇O₃Br: C = 66,32%; H = 8,97%

Encontrado: C = 65,96%; H = 9,48%

Infravermelho em CH₂Cl₂, concentração 5%. Figura 2.a.

O espectro de absorção infravermelho mostrou as seguintes bandas características (cm⁻¹):

2950 (νC-H); 1740 (νC=O); 1040 (νC-O-C)

Ressonância Nuclear Magnética em CCl₄. Figura 2.b.

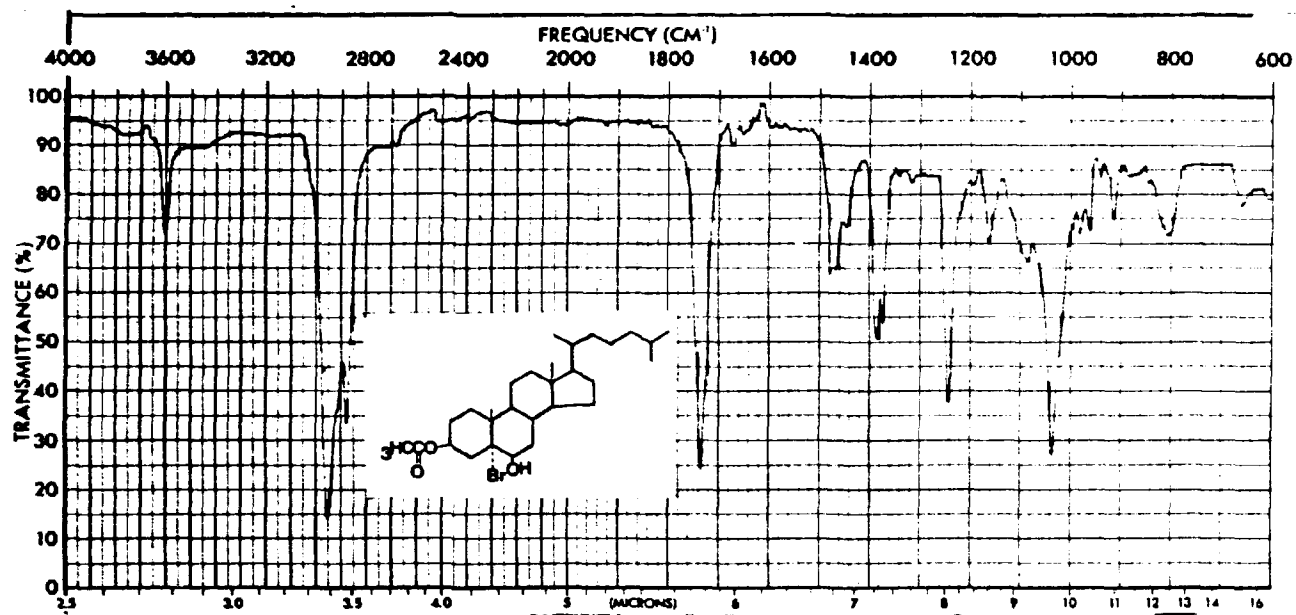


Figura 1.a – Espectro de Infravermelho do 3 β -acetoxi-5 α -Br-6 β -hidroxi-colestano (II)

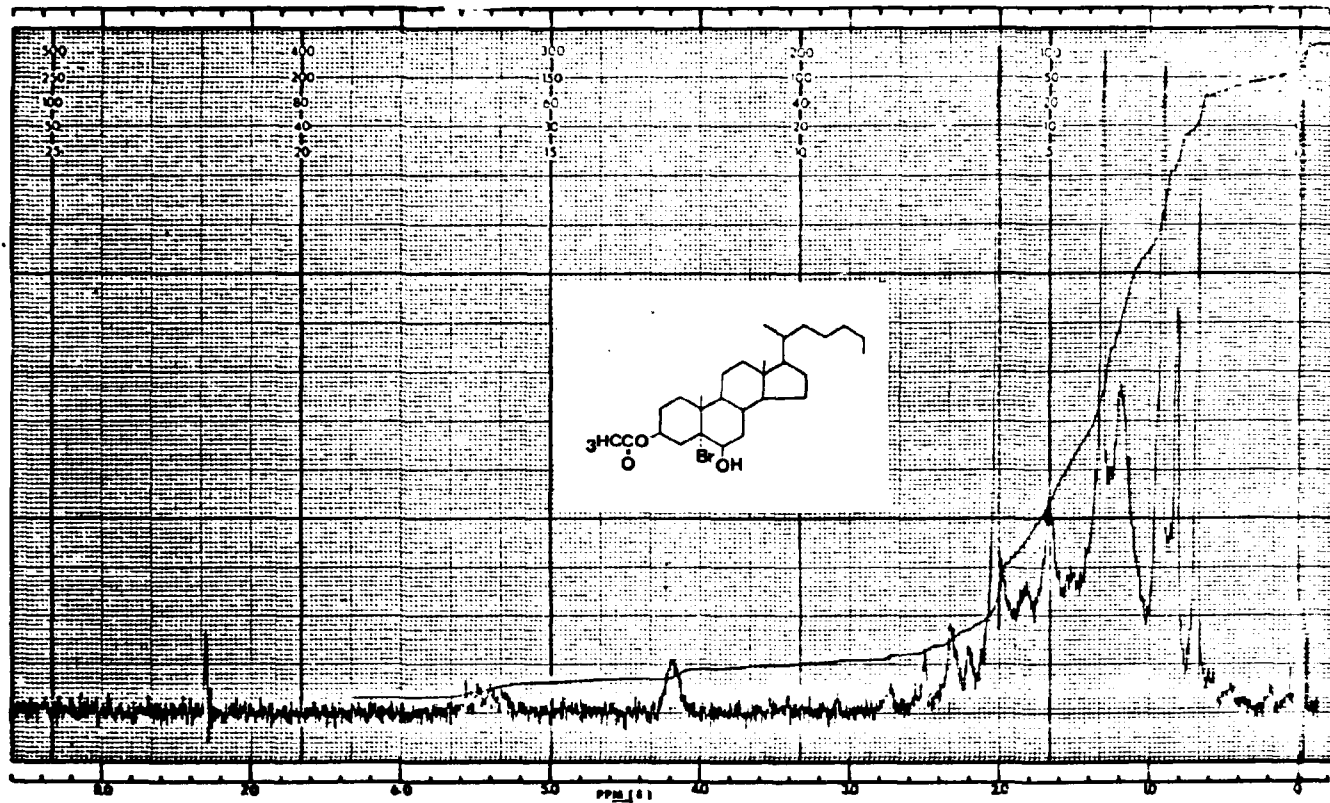


Figura 1.b - Espectro de Resonância Nuclear Magnética do 3 α -acetoxi-5 α -Br-6 β -hidroxi-colestano (II)

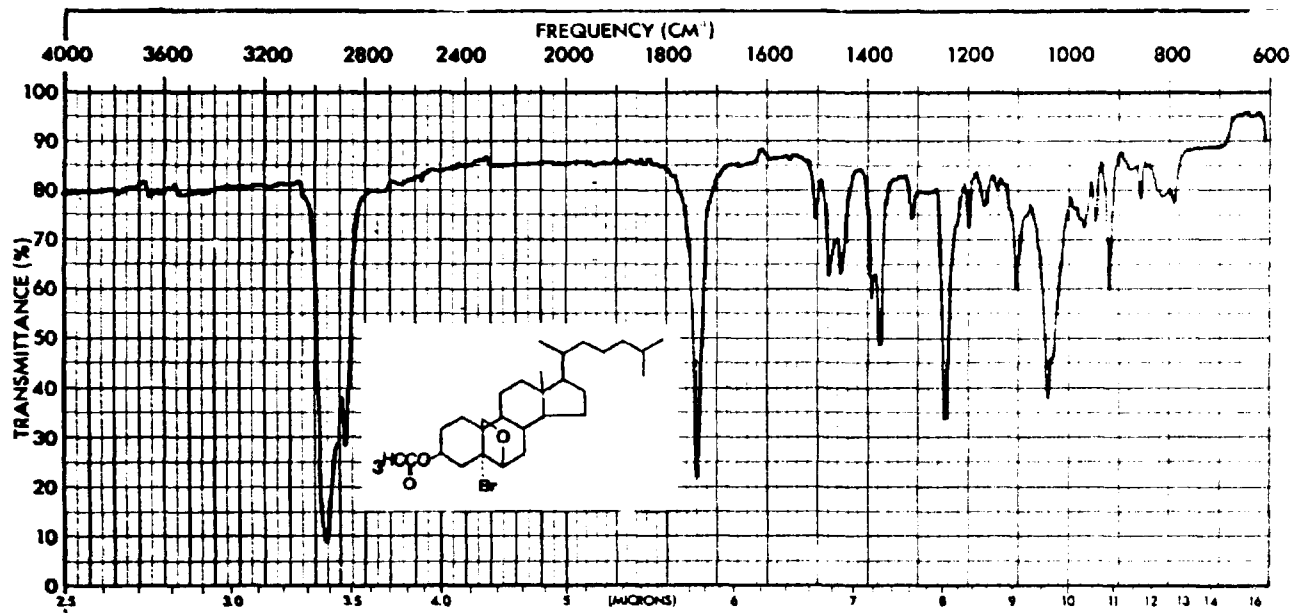


Figura 2.a – Espectro de Infravermelho do 3β-acetoxy-5α-Br-6β-19,6,oxido-colestano (III)

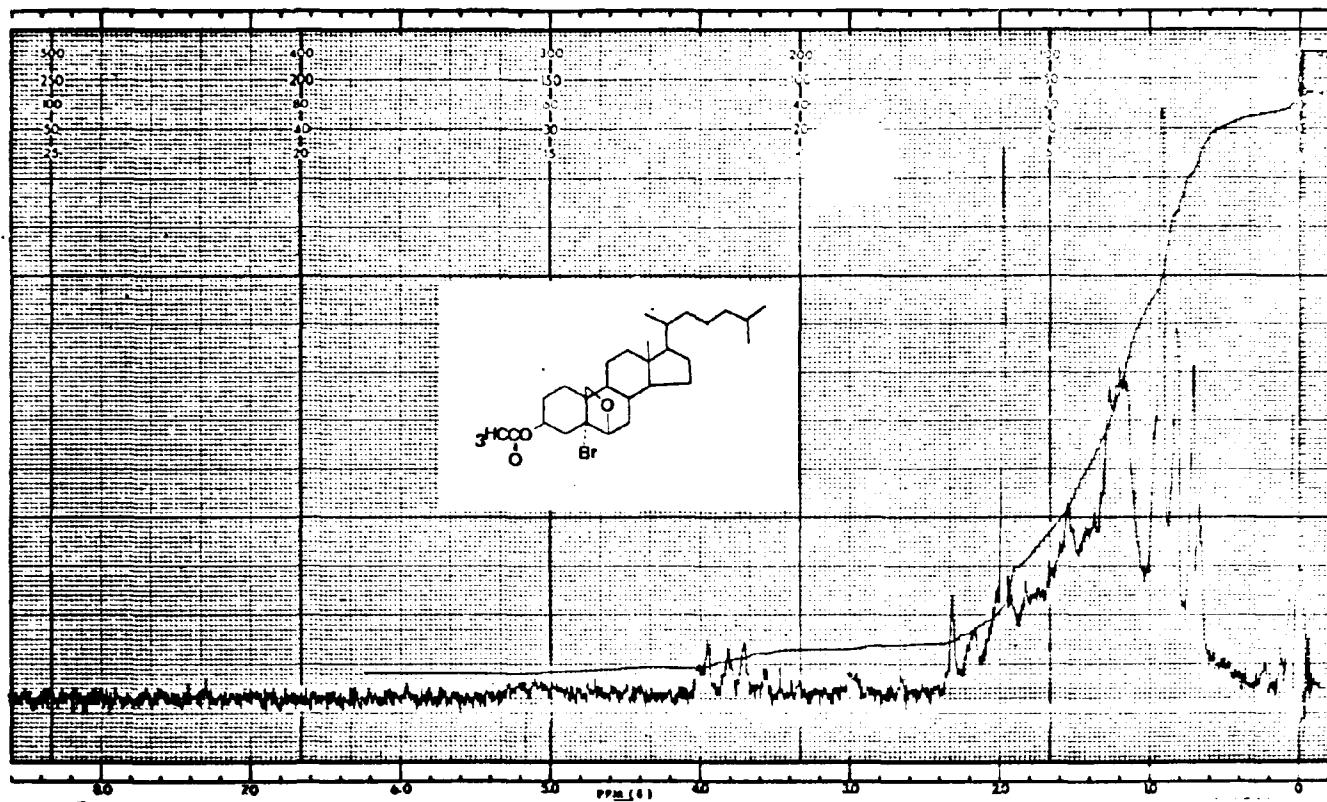


Figura 2.b - Espectro de Ressonância Nuclear Magnética do 3β-acetoxi-5α-Br-6β-19-óxido-colestano (III)

O espectro de ressonância nuclear magnética apresentou os seguintes picos (δ): 5,31 (p.l., 1H, C₃-H); 3,98 e 3,75 (2d, J = 11cps, 2H, C₁₉-CH₂); 2,11 (s, 3H, CH₃COO⁻).

4.1.4 – 3 β -Acetoxi-19-Hidroxi Colest-5-eno (IV)

Obteve-se 1,53 g do produto (IV), item 3.2.2.3., com rendimento de 60%.

Ponto de fusão: 118,5°C

Ponto de fusão segundo literatura: 119 – 120°C⁽²³⁾.

Análise elementar

Calculado para C₂₉H₄₈O₃: C = 78,32%; H = 10,88%

Encontrado: C = 78,86%; H = 10,95%

Infravermelho em CH₂Cl₂, concentração 5%. Figura 3.a.

O espectro de absorção infravermelho mostrou as seguintes bandas características (cm⁻¹):

3600 (ν OH); 2950 (ν C-H); 1740 (ν C=O); 815 (ν C=C)

Ressonância Nuclear Magnética em CCl₄. Figura 3.b.

O espectro de ressonância nuclear magnética apresentou os seguintes picos (δ): 4,10 (p.l., 1H, C₆-H); 4,61 (p.l., 1H, C₃-H); 3,80 e 3,58 (2d; J = 11cps, 2H, C₁₉-CH₂); 1,98 (s, 3H, C₃-CH₃COO⁻).

4.1.5 – 3 β -Acetoxi-19-p-Tolueno Sulfonato de Colest-5-eno (V)

Obteve-se 0,75 g do produto (V), item 3.2.2.4., com rendimento de 48%.

Ponto de fusão: 144°C

Ponto de fusão segundo literatura: 144 – 145°C⁽¹⁾.

Análise elementar

Calculado para C₃₆H₅₄O₃S: C = 72,20%; H = 9,09%

Encontrado: C = 71,91%; H = 9,18%

Infravermelho em CH₂Cl₂, concentração 5%. Figura 4.a.

O espectro de absorção infravermelho mostrou as seguintes bandas características (cm⁻¹):

2970 (ν C-H); 1720 (ν C=O); 1360 (ν_{as} SO₂); 1190 (ν_s SO₂); 820 (ν C=C).

Ressonância Nuclear Magnética em CCl₄. Figura 4.b.

O espectro de ressonância nuclear magnética apresentou os seguintes picos (δ): 7,99 e 7,17 (2d, J = 8cps, 4H, aromático); 5,83 (p.l., 1H, C₆-H); 4,50 (p.l., 1H, C₃-H); 4,05 (m., 2H, C₁₉-CH₂); 2,50 (s., 3H, CH₃- ϕ); 1,98 (s., 3H, C₃-CH₃COO⁻).

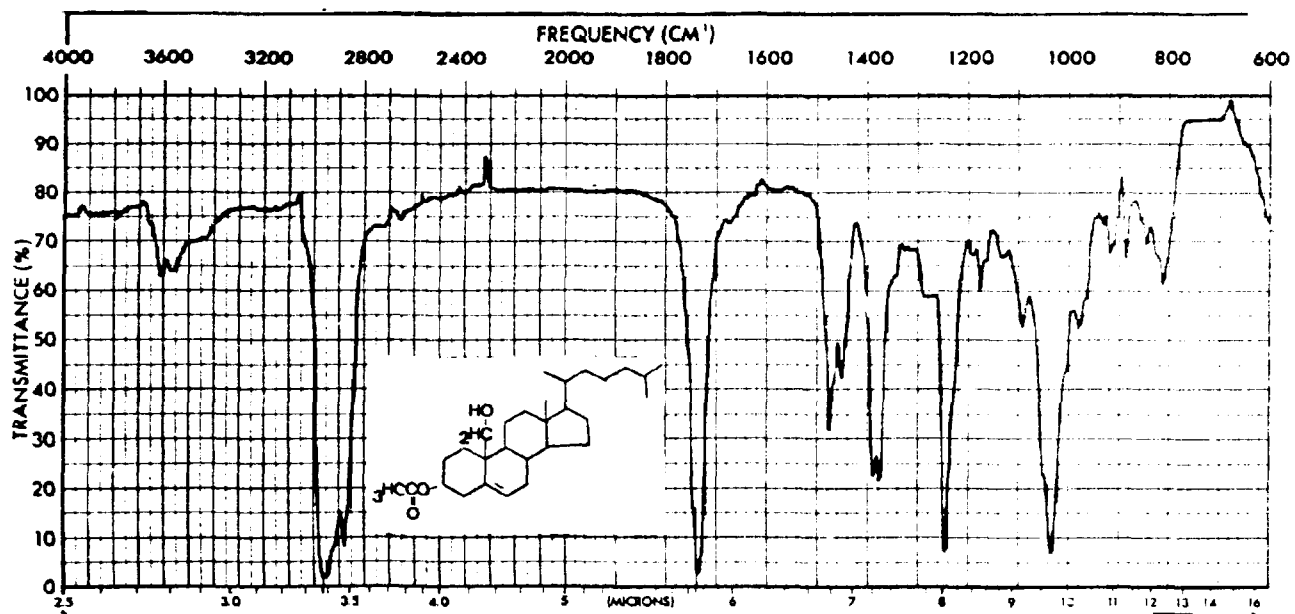


Figura 3.a - Espectro de Infravermelho do 3β-acetoxi-19-hidroxi-colest-5-eno (IV)

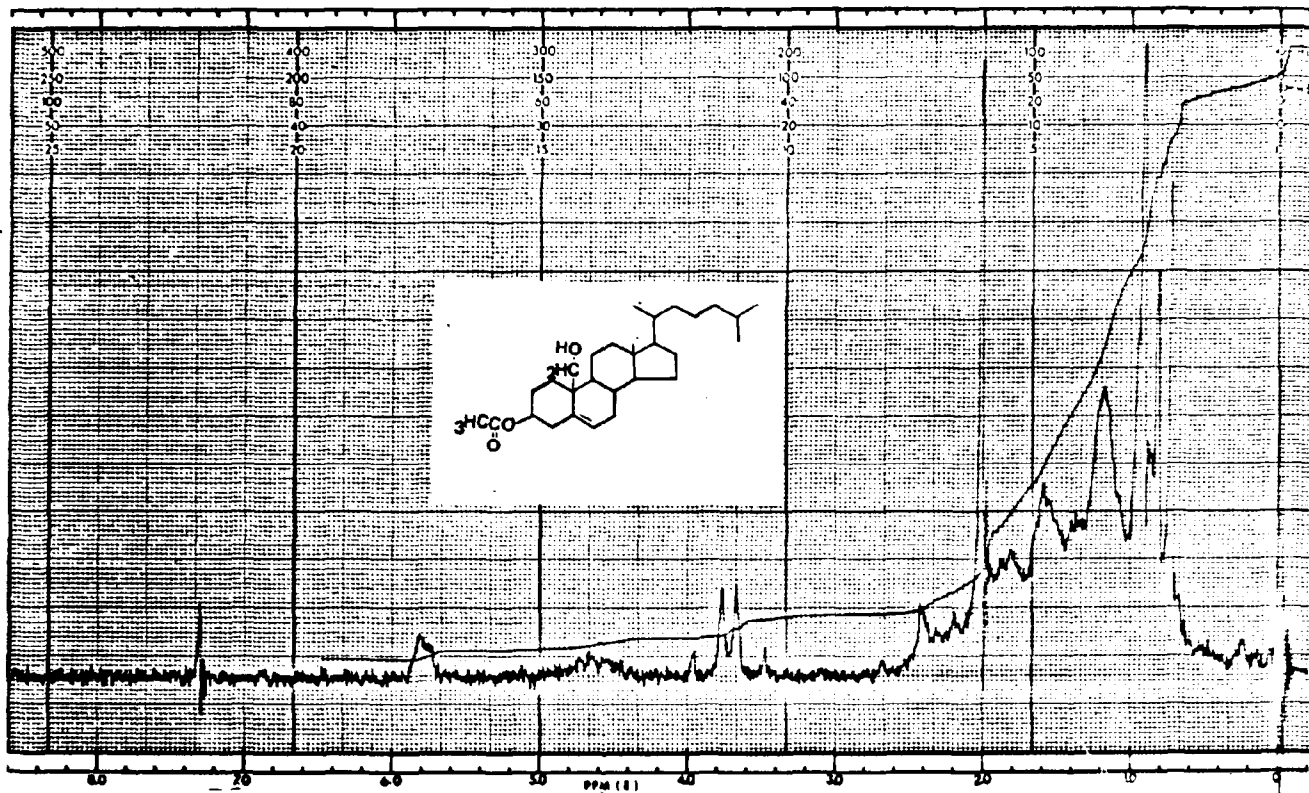


Figure 3.b - Espectro de Ressonância Nuclear Magnética do 3β-acetoxi-19-hidroxi-colest-5-eno (IV)

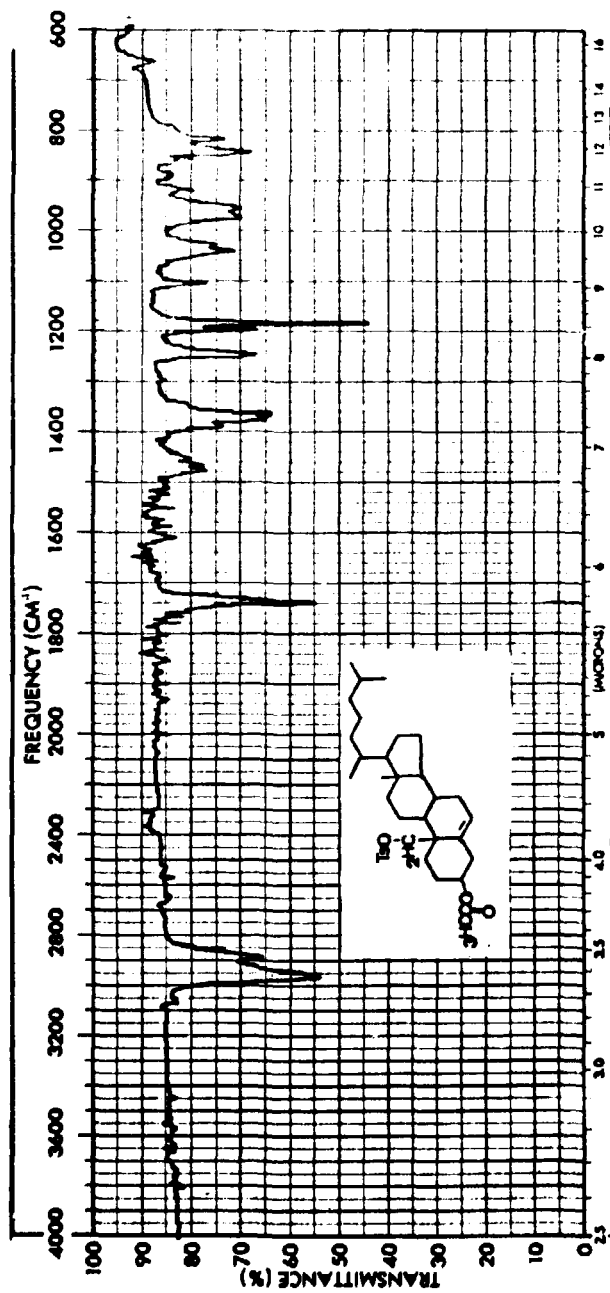


Figura 4.a – Espectro de Infravermelho do 3β-ecatoxi-19-p-tolueno Sulfonato de Colest-5-eno (V)

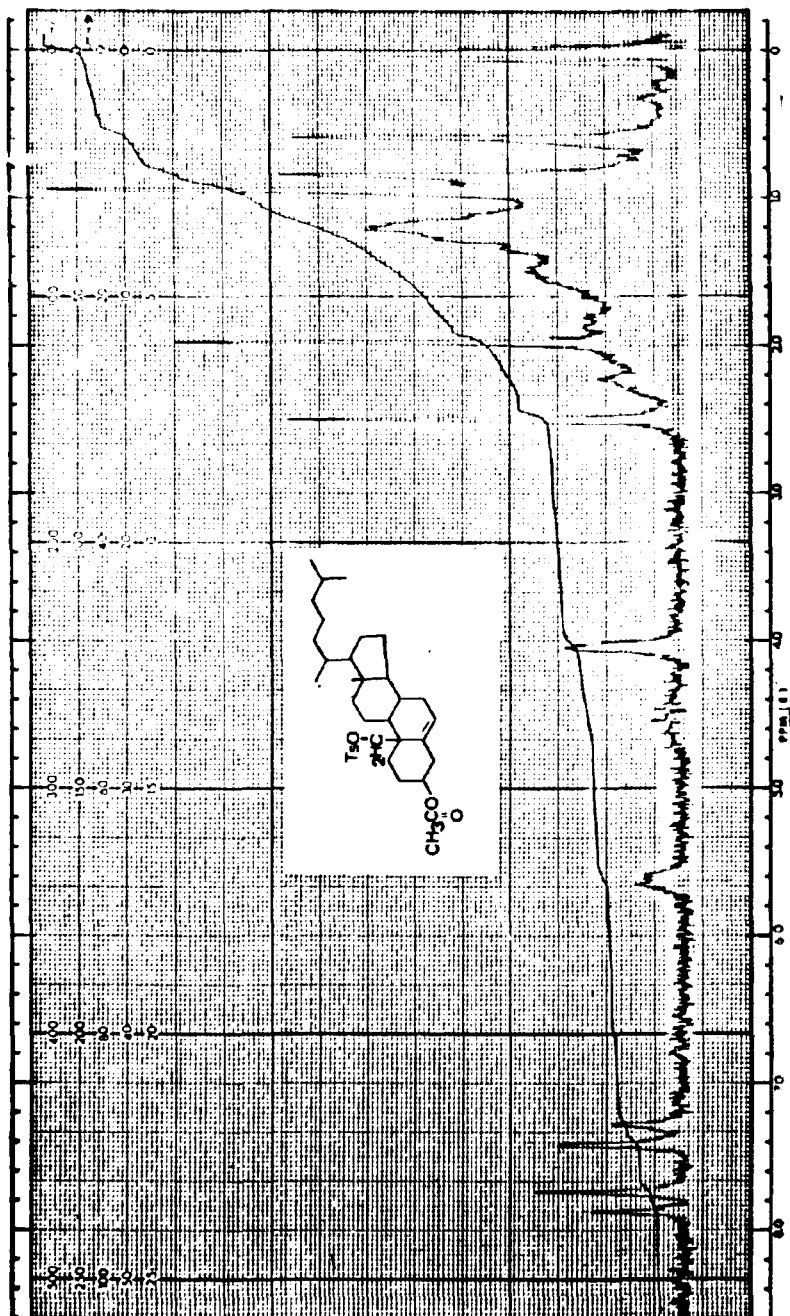


Figura 4.b — Espectro de ressonância nuclear magnética do 3 β -19-p-tolueno sulfonato de colest-5-eno (V)

4.1.6 – 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno

Obteve-se 98 mg do produto (VI), item 3.2.2.5., com rendimento de 37%.

Ponto de fusão: 92°C

Ponto de fusão segundo literatura: 91 – 93°C⁽¹⁴⁾.

Análise elementar

Calculado para C₂₉H₄₇IO₂: C = 62,79%; H = 8,54%

Encontrado: C = 62,70%; H = 8,85%

Resonância Nuclear Magnética em CCl₄. Figura 5.

O espectro de ressonância nuclear magnética apresentou os seguintes picos (δ): 5,70 (p.l., 1H, C₆-H); 4,68 (p.l., 1H, C₃-H); 3,58 e 3,34 (2d, J = 11cps, C₁₉-CH₂); 2,03 (s, C₃-CH₃COO⁻).

4.2 – Marcação

4.2.1 – Determinação do Rendimento da Marcação com ¹³¹I

O resultado do rendimento de troca isotópica foi determinado pela seguinte equação:

$$RTI = \frac{Af \text{ (após a marcação)}}{Ai \text{ (antes da marcação)}} \cdot 100$$

RTI = Rendimento de troca isotópica

Af = Atividade final em ¹³¹I

Ai = Atividade inicial em ¹³¹I

O RTI obtido foi da ordem de 36%.

4.2.2 – Controle Radioquímico

Os valores numéricos, percentuais, de radioatividade incorporada à molécula de 19-Iodocolesterol foram de cerca de 86% enquanto os de iodo livre (¹³¹I⁻) foram de 3,0%; os valores de R_f correspondentes foram 0,20 e 0,0 respectivamente.

A Figura 6 é representativa do perfil cromatográfico do 19-Iodocolesterol marcado com ¹³¹I.

4.3 – Formulação do 19-Iodocolesterol ¹³¹I

O veículo utilizado para a preparação injetável do 19-Iodocolesterol ¹³¹I foi o seguinte: 8,0% de álcool etílico, 1,6% de Tween 80 e 90,4% de solução fisiológica⁽¹¹⁾

A solução final do produto marcado apresentou as seguintes características:

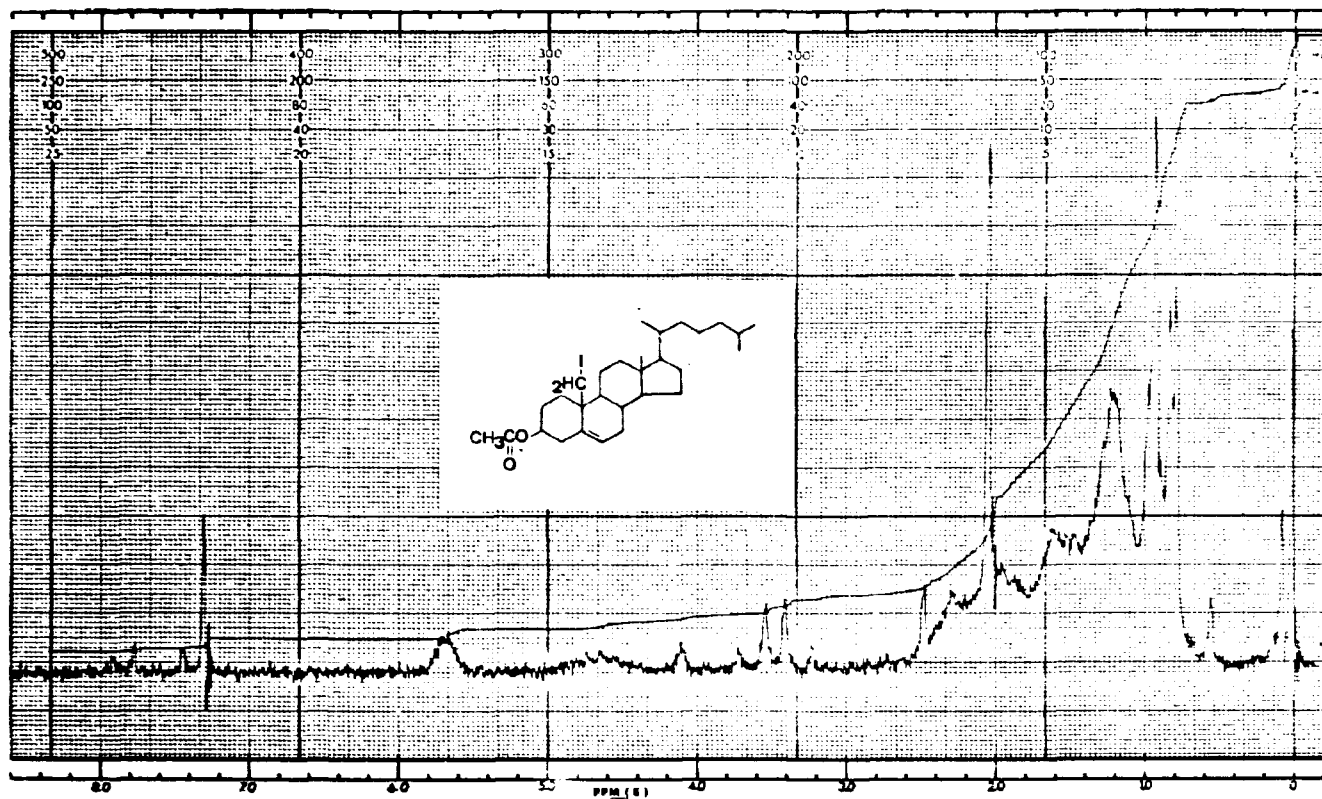


Figura 5 - Espectro de Ressonância Nuclear Magnética do 3β-acetoxi-19-iodocolesterol-5-eno (VI)

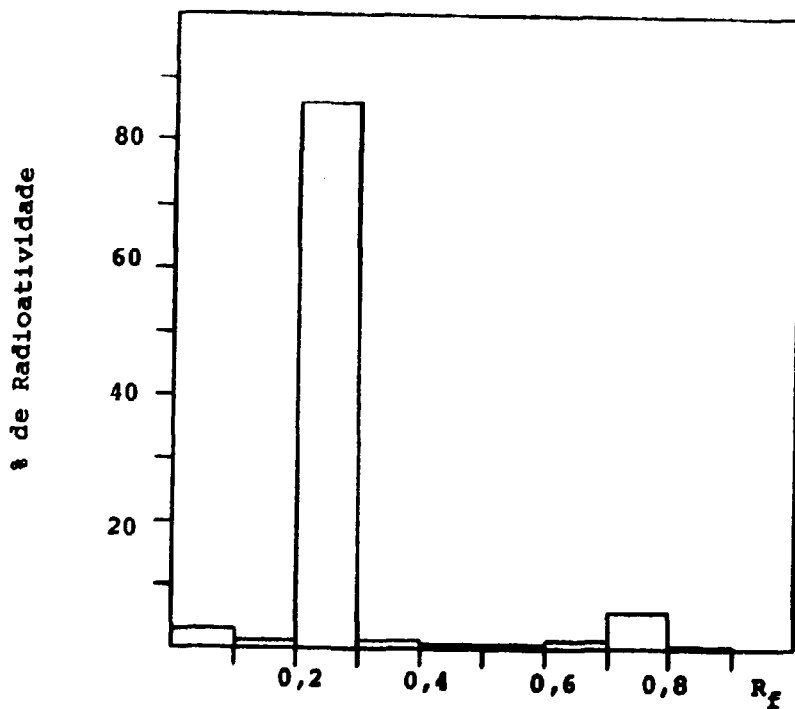


Figura 6 - Perfil Cromatográfico do 19-Iodocolesterol ¹³¹I em Camada Delgada.
 Placas de Sílica Gel G₂₅₄ - (20,0 x 20,0) cm.
 Solvente: CHCl₃.
 % de Radioatividade em ¹³¹I dada em Contagem por Minuto por Centímetro de Placa.
 O Pico em 0 (zero) corresponde ao Iodo Livre; o Pico em 0,2 ao 19-Iodocolesterol Marcado
 e o Pico em 0,7 à Impureza

concentração: 1,42 mg/ml

atividade/ml: 160 μ Ci/ml

atividade específica: 112,6 μ Ci/mg

4.4 – Distribuição Biológica

Na Tabela I são apresentados os dados referentes a porcentagem (%) de dose encontrada nos diversos órgãos, em tempos distintos. Cada valor numérico corresponde à média de dois animais. Os valores percentuais de radioatividade neles encontrados foram expressos em porcentagem de dose por grama de cada órgão e este, relacionado com a dose administrada.

$$\% \text{ de dose} = \frac{\frac{\text{Radioatividade no órgão (cpm)}}{\text{peso do órgão (g)}} \cdot 1 \text{ g de órgão}}{\text{Radioatividade da dose administrada}} \cdot 100$$

Os valores numéricos obtidos desta forma foram lançados em gráficos linear como mostra a Figura 7.

Tabela I

Percentual da Atividade * de 19-Iodocolesterol ¹³¹I Absorvida em Órgãos de Ratos em Diversos Tempos

ÓRGÃOS	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Gl. suprarenal	10,203	9,912	12,342	13,156	9,880	8,070	6,219
Tireóide	84,199	88,500	78,014	70,247	74,298	80,087	75,186
Rins	0,875	0,734	0,690	0,413	0,325	0,156	0,135
Baço	0,080	0,081	0,078	0,048	0,030	0,027	0,010
Fígado	1,434	1,382	1,091	1,091	0,972	0,713	0,683
Coração	0,062	0,050	0,028	0,028	0,021	0,018	0,009
Pulmões	0,981	0,912	0,570	0,570	0,492	0,202	0,187

* Radioatividade em contagem por minuto (cpm) por grama (g) de órgão.

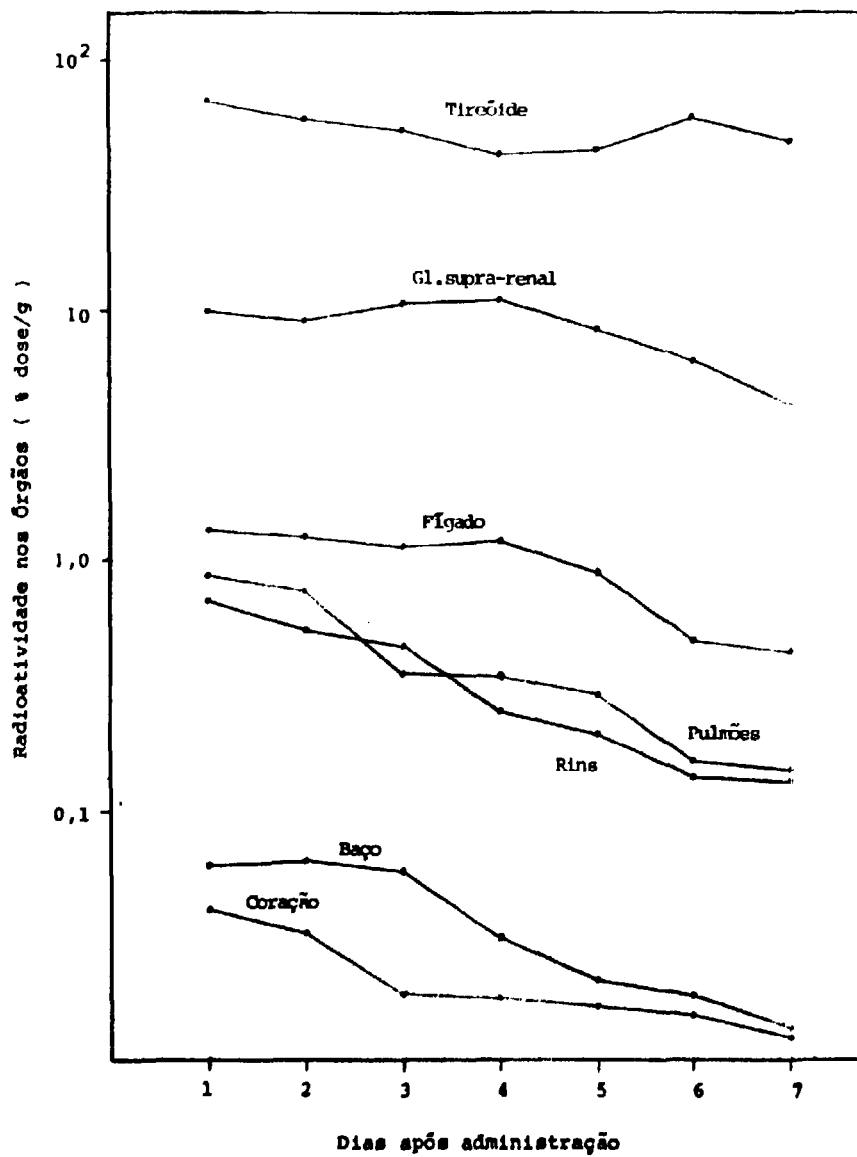


Figura 7 - Concentração de 19-Iodocolésterol ^{131}I em cada Órgão, por dia, Após Administração

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Síntese e Análise

O presente trabalho de preparação de 19-Iodocolesterol ¹³¹I trouxe como resultado alguns dados fundamentais, dos quais destacamos em primeiro lugar, a laboriosa síntese química, desenvolvida em etapas sucessivas e, posteriormente, a preparação do composto marcado com ¹³¹I, evidenciada no mapeamento da glândula supra-renal.

A preparação de compostos marcados para uso em Medicina Nuclear – mormente aqueles com ¹³¹I – já é, de certa forma, tradicional no Instituto de Energia Atômica de São Paulo, desde 1964. Entretanto, deve ser salientado que os radiofármacos ali produzidos, quase sempre, são preparados partindo-se do composto estável, já na fase de receber o isótopo radioativo, quer seja a reação de troca isotópica, de adição ou de substituição.

A preparação de 19-Iodocolesterol ¹³¹I parece ser a primeira tentativa em nosso setor, de desenvolver radiofármacos a partir de precursores, à custa do estabelecimento de reações de síntese química.

Embora tivéssemos utilizado métodos e técnicas já descritos na literatura, somos de opinião que o trabalho ofereceu a perspectiva de aprofundar nosso conhecimento nos aspectos relacionados com a síntese orgânica, trazendo um valioso subsídio para aqueles que, como nós, dentro do Instituto de Energia Atômica, desejam desenvolver outros compostos com finalidade radiofarmacêutica, a partir de precursores.

É bom lembrar, porém, que inúmeras dificuldades foram encontradas durante a síntese química, mesmo levando em consideração o fato de que estávamos reproduzindo, dentro do possível, o que outros autores já haviam feito. Dentre várias dificuldades, poderíamos citar aquelas relacionadas com a segunda etapa da síntese, em que na oxidação por meio de tetraacetato de chumbo, o tempo anotado na literatura era de 40 minutos; para nós, a oxidação só foi conseguida, após 4 horas. Outras vezes, as dificuldades era superadas somente depois de duas ou mais cristalizações sucessivas, indicativas de que se havia alcançado a pureza química.

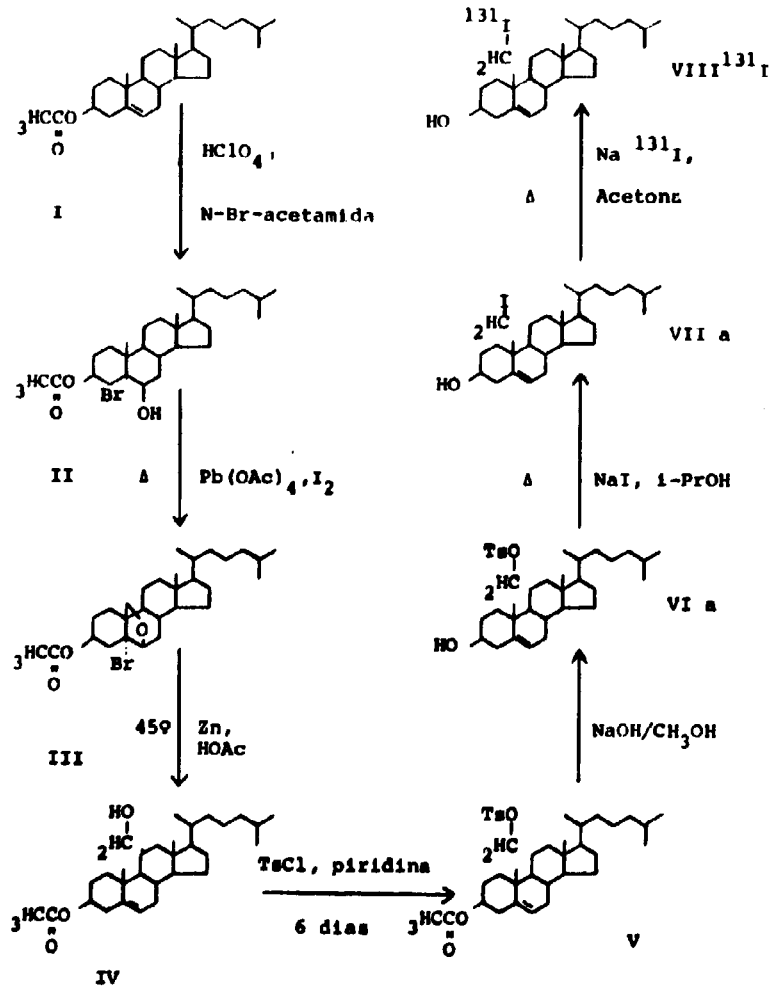
As modificações e adaptações necessárias foram, de qualquer forma, tentadas com sucesso, haja vista as análises elementares e determinação de ponto de fusão a que submetemos os produtos de cada etapa da síntese, em concordância com os valores citados na literatura.

A identificação dos esteróides do 19-Iodocolesterol foi feita nas várias fases de preparação, mediante estudos comparativos de análises de pureza química e análises espectroscópicas.

Análises de absorção no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear foram importantes no sentido de confirmar, no primeiro caso, as bandas de absorção registradas para os produtos obtidos no presente trabalho, com aquelas referidas na literatura e, no segundo caso, cotejar o aparecimento dos picos correspondentes aos grupos funcionais com aqueles descritos em trabalhos anteriores. As duas técnicas, em um ou outro caso, foram sugestivas para indicar que os produtos por nós obtidos apresentaram as estruturas químicas previstas.

Na preparação do Iodocolesterol marcado, duas opções são oferecidas: uma, utilizando-se do método de COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾, que consiste na preparação do 19-Iodocolesterol por síntese química e a outra, pela incorporação direta de iodo radioativo no anel esteróide da molécula do colesterol, proposto por NAGAI e colaboradores⁽²⁸⁾.

Nossa escolha recaiu no método utilizado por COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾, modificado por COUCH e colaboradores^(11,12), que utilizam diretamente o produto (V) 3β-Acetoxi-19-p-tolueno sulfonato de colest-5-ano para iodar e depois marcar com o iodo radioativo.



Com relação à incorporação direta de iodo radioativo na molécula de colesterol, observa-se que trabalhos anteriores, como o de NAGAI e colaboradores⁽²⁸⁾ e o de ALMEIDA e colaboradores⁽²⁾, entre nós, já referiam alguns inconvenientes como, por exemplo, a baixa especificidade da marcação na posição 19 acarretando, em consequência, uma liberação contínua de iodo, após a purificação. Provavelmente devida à incorporação do iodo radioativo em outros sítios do colesterol, como por exemplo, na dupla ligação existente entre os Carbonos 5 e 6; daí a liberação de iodo que se faria à custa dessa ligação inespecífica.

Para que se possa justificar a modificação proposta por COUCH e colaboradores⁽¹²⁾, na técnica descrita por COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾, é interessante destacar os pontos comuns entre os autores e o instante em que ocorre essa proposta.

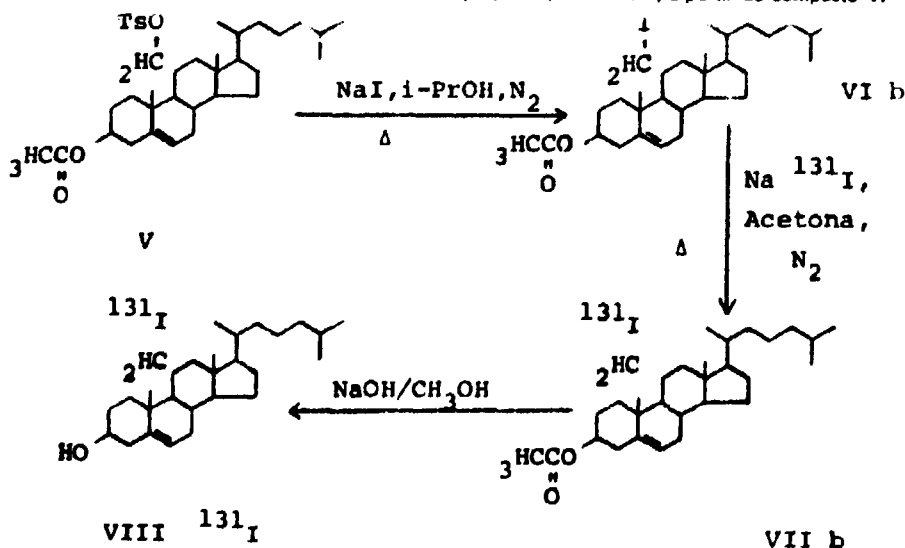
Verifica-se, pois, que até a obtenção do produto (V) – 3 β -Acetoxi-19-p-tolueno sulfonato de colest-5-eno nenhuma diferença existe. COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾ hidrolisam a forma acetato, havendo a formação do produto intermediário (VIa) – 3 β -ol-19-p-tolueno de colest-5-eno – em que a hidroxila ocupa o lugar do radical acético. Este composto, segundo os autores, tem melhor condição para receber o iodo, adicionado na forma de NaI, adição que se faz na posição 19 formando 3 β -ol-19-iodocolest-5-eno ou 19-iodocolesterol (VIIa). Este composto iodado, agora, tem condições de incorporar iodo radioativo, por meio da reação de troca isotópica (VIII.¹³¹I).

O esquema, à página 24, indica a técnica utilizada por COUNSELL.

COUCH e colaboradores⁽¹²⁾, recentemente, constataram através de análises espectroscópicas, que o produto intermediário (VIa), a forma hidrolisada 3 β -ol-19-tolueno sulfonato de colest-5-eno é pouco estável, apresentando, alguns dias após sua preparação, impurezas da ordem de 20 a 60%. HOTTE e ICE⁽²²⁾ também verificaram a instabilidade do produto intermediário preparado por COUNSELL e colaboradores⁽¹⁴⁾.

Segundo COUCH e colaboradores, a decomposição ocorria durante o refluxo do composto VIa, nas reações VIa \rightarrow VIIa de VIIa \rightarrow VIII.¹³¹I. Desta forma, propuseram uma modificação que foi a iodação do produto V – acetato – para formar o composto iodado mais estável e, em seguida, realizar a reação de troca isotópica. Só depois de obter o composto marcado é que os autores propuseram a hidrólise.

O esquema abaixo, refere-se à modificação proposta por COUCH, a partir do composto V.



Esta modificação traz vantagens interessantes, como por exemplo, o fato de que o composto (VIb) — 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno, é muito estável, podendo ser estocado por muito tempo⁽³²⁾. Pudemos, também, verificar a vantagem de preparar o produto (VIb) pela facilidade de armazená-lo, evitando repetidas sínteses.

5.2 — Marcação

A reação química com radioiôdo consistiu na reação de troca isotópica do produto 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno em acetona, com uma solução de Na¹³¹I, livre de carregador e redutor. Obteve-se assim, o 3 β -Acetoxi-19-Iodocolest-5-eno¹³¹I que, a seguir, foi submetido a hidrólise seletiva em solução metanólica de hidróxido de sódio para formar o 19-Iodocolesterol¹³¹I.

O produto final marcado foi submetido ao controle radioquímico para determinação quantitativa do iôdo radioativo não incorporado.

Pelo resultado obtido por análise cromatográfica e pela confirmação da radioatividade na mancha detectada pela luz ultra-violeta, o R_f igual a 0,2, encontrado, é concordante com aqueles observados por outros autores^(11,24).

Como mostra a Figura 6 o pico em 0,0 cm (R_f = 0,0) correspondeu ao iôdo livre (¹³¹I) e em 2,0 cm (R_f = 0,2) ao 19-Iodocolesterol marcado. A 7,0 cm (R_f = 0,7) detectou-se uma atividade igual a 6%; de acordo com a literatura^(5,24) parece tratar-se de uma impureza presente, representada pela 6-Iodometil-nor-colesterol¹³¹I substância que apresenta propriedades semelhantes ao 19-Iodocolesterol¹³¹I, concentrando-se, igualmente, na glândula supra-renal⁽³¹⁾.

O processo de marcação revelou-se eficiente, de acordo com a literatura, embora o rendimento possa ser considerado regular, da ordem de 36%.

5.3 — Distribuição Biológica

Com a finalidade de confirmar a captação do 19-Iodocolesterol¹³¹I pela glândula supra-renal foram realizados estudos de distribuição biológica em ratos.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela I e na Figura 7 verifica-se que no 1º dia, após a administração da droga aparece uma considerável atividade na glândula supra-renal, ocorrendo a maior captação neste órgão no 3º e 4º dias.

Por outro lado, acentuada radioatividade foi detectada na glândula tireóide, certamente devido à liberação de ¹³¹I, proveniente, da metabolização da droga, já que se sabe, de acordo com COUNSELL e ICE⁽¹³⁾, que é boa a estabilidade de compostos que apresentam iôdo na posição C-19, tais como o 1 β -iôdo sitosterol e o 19-iodocolesterol.

Não há dúvida de que, face à rápida metabolização da droga, sua utilização para fins diagnósticos deverá ser precedida da administração de solução de Lugol, com vistas ao bloqueio da glândula tireóide, como habitualmente se procede.

No presente trabalho, como o objetivo primeiro era estudar a distribuição biológica, o composto foi administrado sem esse tratamento.

Os resultados obtidos concordam com aqueles encontrados na literatura^(11,24).

Nos demais órgãos, embora fosse detectada a presença de radioatividade, as quantidades foram consideravelmente menores àquela encontrada na glândula supra-renal.

Finalmente, com relação à informação "in vivo", vale registrar as boas possibilidades do 19-Iodocolesterol, aqui sintetizado e marcado, como agente de localização da glândula supra-renal.

A Figura 8 é representativa do mapeamento realizado quatro horas após a administração de 19-Iodocolesterol ¹³¹I, cerca de 70 μ Ci de atividade injetada — verificando-se a concentração da substância na região onde se situa a glândula supra-renal.

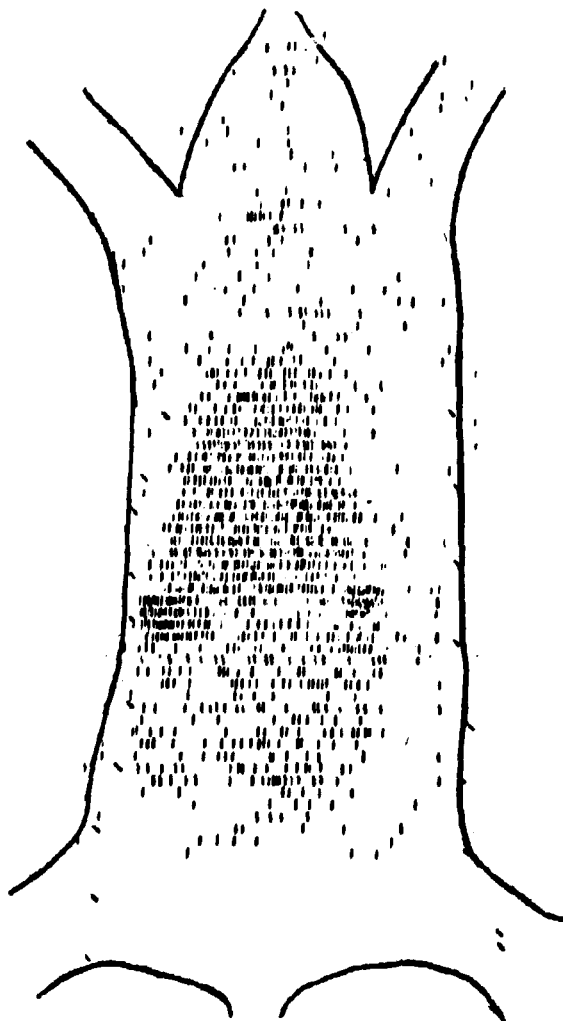


Figura 8 - Cintigrafia de Rato, 4 horas Após Administração Endovenosa de 19-Iodocolesterol — ¹³¹I

Deve ser levado em conta a massa de glândula correspondente a um rato de cerca de 250 g, da ordem de 20 a 30 miligramas, e o fato de que o mesmo não era portador de tumor ou hiperplasia da glândula supra-renal.

É interessante observar, ainda, a inexpressiva concentração radioativa na região da glândula-tireóide, numa clara evidência de que somente após ter iniciado o processo de metabolização, o iodo que se libera da estrutura do colesterol é captado pela glândula.

6 - CONCLUSÕES

Pelo exposto e de acordo com as condições experimentais do trabalho, podemos concluir que:

- 1) Mediante síntese química e posterior marcação por reação de troca isotópica com radioiodo (^{131}I), obteve-se o 19-Iodocolesterol ^{131}I , a partir do acetato de colesterila (3 β -Acetoxi-colest-5-eno).
- 2) Através de análises físico-químicas, espectroscópicas e cromatográficas, foi possível identificar os vários compostos, desenvolvidos em etapas sucessivas.
- 3) O método de marcação, o rendimento obtido, o controle radioquímico e a distribuição biológica, do composto 19-Iodocolesterol ^{131}I podem ser considerados satisfatórios quando comparados com os da literatura consultada.
- 4) Verifica-se considerável concentração de 19-Iodocolesterol ^{131}I na glândula supra-renal dos ratos no 3º e 4º dias após a administração. Em vista dessa efetividade pela glândula supra-renal, evidenciada nos ensaios de distribuição biológica, o radiofármaco poderia, eventualmente, ser utilizado em Medicina Nuclear para fins de diagnóstico de tumores ou hiperplasia da referida glândula.

ABSTRACT

Considering the increasing interest in obtaining agents for visualization of the adrenal gland with radioisotopic techniques, 19-Iodocholesterol was prepared by means of chemical synthesis and radioiodine (^{131}I) introduced by isotopic exchange reaction.

The reaction product was identified by determination of the melting point and elementary spectroscopic analysis (infra-red absorption and magnetic nuclear resonance).

Radiochemical analysis of the labelled compound was performed by means of thin-layer chromatography in silica-gel.

In order to confirm its capacity of concentration in the adrenal gland, the distribution of 19-Iodocholesterol ^{131}I after intravenous injection, was tested in rats. (Author)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AKHTAR, M. & BARTON, H. R. Reactions at position 19 in the steroid nucleus. A convenient synthesis of 19-Norsteroids. *J. Am. chem. Soc.*, 86:1528-36, 1964.
2. ALMEIDA, D. O.; BARBÉRIO, J. C.; PIERONI, R. R. Preparação de colesterol marcado com ^{131}I . *Ciênc. Cult. (São Paulo)*, 25(8) (Suppl.):68, jun. 1973.
3. ANDERSON, B. G. & BEIERWALTES, W. H. Adrenal imaging with radioiodocholesterol in the diagnosis of adrenal disorders. *Adv. internal. Med.*, 19:327-43, 1974.

* As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-68 da ABNT.

4. APPELGREN, L. E. Sites of steroid hormone formation. Autoradiographic studies using labelled precursors. *Acta physiol. scand.*, 301(Suppl.):3-101, 1967.
5. SMADJIAN, G. P.; HETZEL, K. R.; ICE, R. D.; BEIERWALTES, W. H. Synthesis of a new adrenal cortex imaging agent 6 β -¹³¹I-iodomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -ol(NP-59). *J. Labelled Compd.*, 11(3):427-34, 1975.
6. BEIERWALTES, W. H.; LIEBERMAN, L. M.; ANSARI, A. N.; NISHIYAMA, H. Visualization of the human adrenals in vivo by scintillation scanning. *J. Am. med. Ass.*, 216:275-7, 1971.
7. BLAIR, R. J.; BEIERWALTES, W. H.; LIEBERMAN, L. M.; BOYD, C. M.; COUNSELL, H. E.; WEINHOLD, P. A.; VARMA, V. M. Radiolabeled cholesterol as an adrenal scanning agent. *J. nucl. Med.*, 12(4):176-82, 1971.
8. CHARBONNEL, B.; CHATAZ, J. F.; CHUPIN, M.; GUILLON, J. Intérêt de la scintigraphie surrénalienne au ¹³¹I-19-iodocholestérol dans l'exploration des syndromes de Cushing. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 37(4):315-6, 1976.
9. CONN, J. W.; BEIERWALTES, W. H.; COHEN, E. L.; MORITA, R.; ANSARI, A. N.; HERWIG, K. H. Visualization of adrenal abnormalities by photoscanning after administration of radiocholesterol. In: ENDOCRINE and non endocrine hormone producing tumors: proceedings of the 16th annual clinical conference on cancer, 1971, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas. Chicago, Ill., sem editor, 1973. p.9-24.
10. CONN, J. W.; BEIERWALTES, W. H.; LIBERMAN, L. M. O.; ANSARI, A. N.; COHEN, E. L.; BOOKSTEIN, J. J.; HERWIG, K. R. Primary aldosteronism: preoperative tumor visualization by scintillation scanning. *J. clin. Endocr. Metab.*, 33:713-6, 1971.
11. COUCH, M. W. & WILLIAMS, C. M. Comparison of 19-iodocholesterol and 6-iodomethylnorcholesterol as adrenal-scanning agents. *J. nucl. Med.*, 18(7):724-7, 1977.
12. COUCH, M. W.; SCOTT, K. N.; WILLIAMS, C. M. New method for the synthesis of radioactives 19-iodocholest-5-en-3 β -ol. *Steroids*, 27(4):451-8, Apr. 1976.
13. COUNSELL, R. E. & ICE, R. D. The design of organ-imaging radiopharmaceuticals. In: ARIENS, E. J., editor. *Drug design*, v.6. New York, N. Y., Academic, 1975. p.171-259.
14. COUNSELL, R. E.; RANADE, V. V.; BLAIR, R. J.; BEIERWALTES, W. H.; WEINHOLD, P. A. Tumor localizing agents. IX. Radioiodinated cholesterol. *Steroids*, 16:317-28, 1970.
15. COUNSELL, R. E.; RANADE, V. V.; KULKARNI, P. G.; AFIAIPOUR, P. Potencial organ or tumor imaging agents. 12. esters of 19-radioiodinated cholesterol. *J. nucl. Med.*, 14(11):777-80, 1973.
16. COUNSELL, R. E.; RANADE, V. V.; POCHA, P.; WILLETE, R. E.; DIGIULIO, W. Tumor localizing agents. VI. Radioiodinated analogs of dichlorodiphenyl dichloroethane (DDD). *J. Pharm. Sci.*, 57(10):1657-61, 1968.
17. COUNSELL, R. E.; WILLETE, R. E.; DIGIULIO, W. Tumor localizing agents. II. Radioiodinated analogs of 1,1-dichloro-2,2-bis (chlorophenyl) ethane. *J. Med. Chem.*, 10:975, 1967.
18. DIGIULIO, W. Adrenal photoscanning with an iodinated analog of p,p'-DDD(2,2-bis (4-iodophenyl)-1,1 dichloroethane-¹³¹I). *J. nucl. Med.*, 8:352, 1967.
19. FIESER, L. F. & FIESER, M. *Reagents for organic synthesis*. New York, N. Y., Wiley, 1967. p.1179-80, 1276.

20. GOODMAN, D. S. Cholesterol ester metabolism. *Physiol. Rev.*, 45:747-839, 1965.
21. HANNGREN, A.; HANSSON, E.; SJÖSTRAND, S. E.; ULLBERG, S. Autoradiographic distribution studies with ^{14}C -Cortisonse e ^{14}C -cortisol. *Acta endocrinol.*, 47:95-104, 1964.
22. HOTTE, C. E.; & ICE, R. D. Thermal and radiolytic decomposition of ^{131}I -19-Iodocholesterol. *J. nucl. Med.*, 15(1):38-41, 1974.
23. KALVODA, J.; HEUSLER, K.; UEBERWASSER, H.; ANNER, G.; WETTSTEIN, A. 19-Norsteroido, IV. Über die reduktive Ätherspaltung bei 5 α -Halogen-6 β , 19-oxido-steroiden. *Helv. chim. Acta*, 46:1361-9, 1963.
24. KOJIMA, M.; MAEDA, M.; OGAWA, H.; NITTA, K.; ITO, T. New adrenal scanning agent. *J. nucl. Med.*, 16(7):666-8, 1975.
25. LIEBERMAN, L. M.; BEIERWALTES, W. H.; CONN, J. W.; ANSARI, A. N.; NISHIYAMA, H. Diagnosis of adrenal disease by visualization of human adrenal glands with ^{131}I -19-Iodocholesterol. *N. Engl. J. Med.*, 285:1387-93, 1971.
26. MORITA, R.; LIEBERMAN, L. M.; BEIERWALTES, W. H.; CONN, J. W.; ANSARI, A. N.; NISHIYAMA, H. Percent uptake of ^{131}I radioactivity in the adrenal from radioiodinated cholesterol. *J. clin. Endocr. Metab.*, 34:36-43, 1972.
27. MORITA, T. & ASSUMPCÃO, R. *Manual de soluções, reagentes & solventes*. 2.ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1972. p.477.
28. NAGAI, T.; SOLIS, B. A.; KOH, C. S. An approach to developing adrenal-gland scanning. *J. nucl. Med.*, 9:576-81, 1968.
29. NAGAI, T.; SOLIS, B. A.; KOH, C. S.; HASEGAWA, M. A progress report on the development of adrenal gland scanning. *J. nucl. Med.*, 8:352, 1967.
30. OLIVETO, E. P. & GEROLD, C. N. Bromoacetamide. *Org. Synth.*, 31:17-8, 1951.
31. SARKAR, S. D.; BEIERWALTES, W. H.; ICE, R. D.; BASMADJIAN, G. P.; HETZEL, K. R.; KENNEDY, W. P.; MASON, M. M. A new and superior adrenal scanning agent, NP-59. *J. nucl. Med.*, 16(11):1038-42, 1975.
32. SCOTT, K. N.; MARECI, T. H.; COUCH, M. W.; WILLIAMS, C. M. Chemical and radiochemical stability of the adrenal scanning agents, 6 β -iodomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -ol and 19-Iodocholest-5-en-3 β -ol. *Steroids*, 30(4):511-9, Oct. 1977.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IEATOMICA
Telex – 011-23592 IENA BR