



**MARCAÇÃO DE SORO ALBUMINA HUMANA COM IODO-131
PARA DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR**

Rodza da Silva Valente Gonçalves

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 154
IEA - DT - 154**

FEVEREIRO/1979

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

**MARCAÇÃO DE SORO ALBUMINA HUMANA COM IODO-131
PARA DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR**

Rodza da Silva Valente Gonçalves

Dissertação para obtenção do Título de "Mestre - Área de Tecnologia Nuclear" - Orientador Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva. Apresentada e defendida em 28 de agosto de 1978, no Instituto de Energia Atômica.

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO - BRASIL**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

B13

ALBUMINS: Labelling

IODINE 131: Labelling

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

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO I

I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – Albumina Humana	1
I.2 – Princípios Gerais da Marcação da Soro Albumina Humana (SAH) com ^{131}I	2
I.3 – Métodos Gerais de Preparação de Soro Albumina Humana Marcada com ^{131}I	3
I.4 – Usos da Soro Albumina Humana- ^{131}I	5
I.5 – Objetivo	6

CAPÍTULO II

II – PARTE EXPERIMENTAL	7
II.1 – Materiais	7
II.1.1 – Aparelhagem	7
II.1.2 – Soluções e Reagentes	7
II.2 – Métodos	8
II.2.1 – Marcação de SAH	8
II.2.2 – Cálculo do Rendimento de Marcação	8
II.2.3 – Influência da Massa de SAH no Rendimento de Marcação	9
II.2.4 – Influência da Massa de Cloramina T na Marcação de SAH	9
II.2.5 – Influência do pH de Marcação de SAH no Rendimento	9
II.2.6 – Influência do Tempo de Reação no Rendimento de Marcação de SAH	9
II.2.7 – Influência da Atividade de ^{131}I no Rendimento de Marcação de SAH	9
II.2.8 – Purificação de SAH- ^{131}I	10
II.2.9 – Controle do Teor de $^{131}\text{I}^-$ e $^{131}\text{IO}_3^-$	10
II.2.10 – Esterilização da SAH- ^{131}I	10
II.2.11 – Controle de Estabilidade de SAH- ^{131}I	10

CAPÍTULO III

III – RESULTADOS	10
III.1 – Influência da Massa de SAH no Rendimento de Marcação	10

III.2 – Influência da Massa de Cloramina T no Rendimento da Marcação de SAH	11
III.3 – Influência do pH de Marcação de SAH no Rendimento	11
III.4 – Influência do Tempo de Reação no Rendimento de Marcação de SAH	14
III.5 – Influência da Atividade de ^{131}I no Rendimento de Marcação de SAH	16
III.6 – Purificação de SAH- ^{131}I	18
III.7 – Esterilização de SAH- ^{131}I	18
III.8 – Controle de Estabilidade de SAH- ^{131}I	19

CAPÍTULO IV

IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

MARCAÇÃO DE SORO ALBUMINA HUMANA COM IODO-131 PARA DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR

Ródza da Silva Valente Gonçalves

RESUMO

~~Tendo em vista o uso de soro albumina humana ¹³¹I em Medicina Nuclear, estudou-se neste trabalho a~~ ESTUDO - 50
~~marcação do referido produto, com I-131 a partir de solução de iodeto de sódio ¹³¹I utilizando-se como agente~~
~~oxidante a cloramina T.~~

Estudaram-se os fatores que podem influir no rendimento de marcação a saber: massa de soro albumina humana, massa de cloramina T, pH da reação, tempo de reação e a atividade de ¹³¹I.

Faz-se purificação do produto marcado, por meio de resina de troca iônica Amberlite IRA-410 na forma de Cl⁻ e a esterilização de soro albumina humana ¹³¹I pela passagem por filtro Millipore de 0,22 μ.

Faz-se o controle radioquímico do produto obtido por cromatografia em papel e o controle microbiológico por semeadura em meios líquidos: de caldo nutritivo, biogelato de sódio e Sabouraud.

Analisa-se a estabilidade do radiofármaco, durante dez dias após a preparação, por meio de controle radioquímico. (Autor)

CAPÍTULO I

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Albumina Humana

A albumina humana é o maior componente (55-60%) do complexo protéico no soro humano e tem uma função algo passiva, a de controlar a pressão osmótica e manter a capacidade tampão do sangue.

A albumina do soro tem peso molecular da ordem de 69.000, sendo uma proteína globular típica, com configuração em alfa-hélice e considerável estrutura terciária⁽⁹⁾.

É uma proteína que contém cerca de 560 aminoácidos e destas, 18 são do grupo tirosil em que os hidrogênios constituintes podem ser substituídos por radioiodo⁽¹⁴⁾.

A composição da albumina do soro em aminoácidos⁽⁷⁾ é a seguinte⁽⁸⁾:

Aproveita para publicação em fevereiro/1979.

(*) Em gramas de aminoácidos por 100 gramas de proteína.

Arginina	6,20	Leucina	11,00	Isoleucina	1,70
Ácido Aspártico	8,95	Lisina	12,30	Treonina	4,60
Cisteína	0,70	Metionina	1,30	Triptofano	0,2
Cistina/2	5,60	Fenilalanina	7,80	Tirosina	4,70
Ácido Glutâmico	17,00	Prolina	5,10	Valina	7,70
Histidina	3,50	Serina	3,34	Glutamina	0,88
				Glicina	1,60

O ponto isoelétrico⁽³²⁾ da albumina do soro é 4,9.

A soro albumina humana (SAH) é uma preparação estéril de soro albumina obtido por fracionamento de sangue humano onde até 96% da proteína total é albumina. É uma solução contendo, em cada 100 ml, 25 g de soro albumina osmoticamente equivalente a 500 ml, ou 5 g equivalente a 100 ml, de plasma humano normal. Não se adiciona agente antimicrobiano a soro albumina humana, mas pode conter agente estabilizante⁽³⁹⁾.

Por suas propriedades radioativas favoráveis à detecção e à medida "in vivo", o iodo-131 é um radioelemento adequado para a preparação de proteínas marcadas⁽⁴³⁾.

A meia vida do ¹³¹I de 8,04 dias é suficientemente longa para permitir distribuição comercial de compostos marcados com ¹³¹I e possibilitar o uso "in vivo". A emissão gama de 360 KeV é conveniente para mapeamento e outras detecções externas do corpo. Contudo, a emissão beta-menos de 610 KeV pode proibir o uso do ¹³¹I em situações onde a dose de radiação para o paciente deve ser minimizada⁽²⁾.

Desde que Hughes e Straessle⁽²³⁾ investigaram as reações que ocorrem entre albumina e iodo, o uso extensivo de albumina radioiodada para estudos metabólicos⁽⁴⁴⁾ tem dado oportunidade para correlacionar o comportamento biológico da proteína com mudanças química e estrutural devido a iodação: reconheceu-se assim que o comportamento biológico da albumina marcada é influenciada pelas condições de iodação.

1.2 – Princípios Gerais da Marcação da Soro Albumina Humana (SAH) com ¹³¹I

A soro albumina humana é marcada com ¹³¹I por substituição do hidrogênio, em média, por 1 átomo-grama de iodo por molécula-grama de albumina.

Sob certas condições, o iodo é incorporado principalmente nos anéis aromáticos dos radicais tirosil, formando derivados mono e diiodo, imediatamente. Outros aminoácidos não são marcados até que todos resíduos tirosina tenham sido convertidos ao estágio di-iodo, mas este processo é aplicável somente para tipos cíclicos e heterocíclicos, em particular a histidina⁽²⁴⁾. Este processo ocorre apreciavelmente, somente após a introdução de grandes quantidades de iodo na molécula proteica não sendo, portanto, importante em níveis de marcação⁽⁴²⁾.

Os fatores relacionados com as condições nas quais o processo de iodação ocorre e que interferem no comportamento biológico da proteína marcada são: natureza do agente oxidante usado para converter o iodeto a iodo elementar, a velocidade pelo qual o iodo elementar é formado ou adicionado à proteína e o pH da marcação⁽⁴²⁾.

O produto mercado deve ter as seguintes características:

- a) A ligação iodo-proteína não deve modificar o produto, o seu grau de comportamento deve corresponder àquele da molécula não marcada;
- b) A molécula marcada não deve liberar quantidades mensuráveis de iodo.

Investigações tem mostrado que proteínas com mais que dois átomos de iodo por molécula não possuem as mesmas propriedades da proteína não marcada. O método de marcação adotado não deve portanto permitir a incorporação de mais de um átomo por molécula de proteína e, ao mesmo tempo, deve permitir a obtenção de atividade específica adequada a sua aplicação⁽²⁴⁾.

Segundo as especificações da "United States Pharmacopeia", volume XIX, a soro albumina humana ¹³¹I é uma solução isotônica, estéril e tamponada, preparada para conter não menos do que 10 mg de SAH-¹³¹I por mililitro e não mais do que 1 mCi por mililitro. A SAH-¹³¹I é derivada de suave iodação de SAH, pelo iodo radioativo (¹³¹I) de forma que o produto contenha um átomo-grama de iodo por molécula grama de albumina.

A SAH ¹³¹I contém não menos que 95% e não mais que 105% de quantidade de albumina marcada com ¹³¹I, expressa em μ Ci ou mCi por mililitro na data indicada da marcação. Outras formas de radioatividade não pode exceder 3% da radioatividade total. A validade do produto marcada é de até 30 dias após a iodação⁽²⁷⁾.

1.3 – Métodos Gerais de Preparação de Soro Albumina Humana Marcada com ¹³¹I

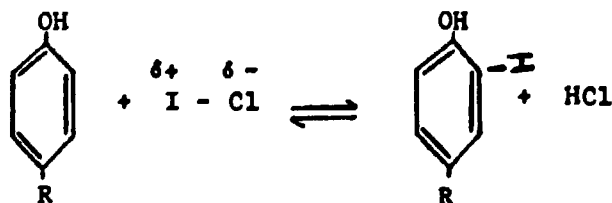
Diversos métodos de marcação têm sido propostos e são de uso rotineiro em diversos países.

A quantidade de iodo elementar para a marcação é liberada de uma solução de iodato de sódio-¹³¹I por agentes oxidantes, a saber: monoclóreto de iodo⁽³⁴⁾, cloramina T^(26,19), iodato de potássio⁽⁴⁹⁾ e nitrito de sódio⁽¹⁷⁾.

Diversos autores⁽⁴⁵⁾ propuzeram o método da iodação eletrolítica pois nesse método a concentração de iodo na solução pode ser regulada pelo simples controle da corrente de eletrólise, evitando reações laterais nos grupos cistina e cisteína, por exemplo.

Os métodos mais citados na literatura, são:

- a) Monoclóreto de Iodo – Neste processo descrito por McFARLANE⁽³⁴⁾ prepara-se inicialmente, o monoclóreto de iodo não radioativo. Este é adicionado ao iodo radioativo sendo então produzido, por troca isotópica, o monoclóreto marcado, pronto para ser usado na iodação de proteínas⁽²⁾. A equação para esta reação:



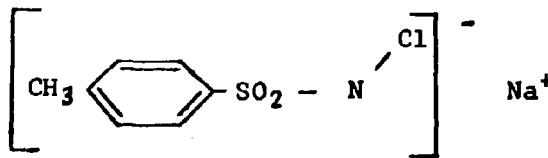
mostra que a utilização teórica do iodo é máxima⁽²⁶⁾. A quantidade de iodo incorporado à proteína é controlada pela quantidade de monoclóreto de iodo empregado antes de ser

adicionado o iodeto radioativo⁽²⁸⁾. A proporção do isótopo introduzido é inversamente proporcional à quantidade de iodeto presente. Consequentemente a atividade específica baixa do iodo limita o rendimento radioquímico e portanto a atividade específica do composto marcado.

Apropriadamente usado, o monoclóreto de iodo é um reagente brando de iodação com o qual podem ser obtidas preparações marcadas não alteradas. Sua desvantagem é que o iodo não radioativo é introduzido (em forma de monoclóreto de iodo) e isto limita a atividade específica final.

Quando a atividade específica é menos importante do que a alta qualidade do produto, o método que usa o monoclóreto de iodo é o preferido⁽²⁾.

- b) Cloramina T – Este método, descrito por GREENWOOD e HUNTER^(26,19) é amplamente usado para uma variedade grande de proteínas. Cloramina T é um sal sódico de N-monocloro-p-toluenosulfonamida:



É um agente oxidante suave e libera lentamente ácido hipocloroso em solução aquosa. O procedimento para iodação de proteínas consiste simplesmente em adicionar a proteína e depois a cloramina T a uma solução de iodeto de sódio-¹³¹I. O mecanismo da reação não é conhecido, mas presumivelmente forma-se um complexo de iodo com a sulfonamida, no qual o iodo possui uma carga positiva, pois que a reação dá uma substituição de 100% de iodo na proteína⁽²⁵⁾.

Existem duas grandes vantagens no uso do método da cloramina T:⁽²⁾

- Não necessita ser introduzido carregador de iodeto como no caso do método em que se usa o monoclóreto de iodo. Em vista disto é possível obter-se um produto com atividade específica alta;
- Completa utilização do isótopo é alcançada normalmente.

A cloramina T, entretanto, é uma substância muito reativa e pode causar diferenças químicas importantes na proteína. Por causa disto, deve ser empregada somente a cloramina T suficiente para uma determinada iodação. Em alguns casos, é preferível limitar o rendimento em 60-80% para evitar reações adicionais desta espécie⁽¹⁸⁾.

- c) Iodação eletrolítica – É o método mais recente de iodação de proteínas, e envolve liberação eletrolítica de iodo a partir de soluções de iodeto de sódio-¹³¹I⁽⁴⁵⁾. A aparelhagem necessária é simples, consistindo de uma célula eletrolítica na qual o catodo é circundado por uma membrana de diálise. A solução de proteína a ser iodada juntamente com o iodo-¹³¹I, é colocada no compartimento anódico, enquanto o compartimento catódico contém solução salina. Uma taxa lenta e controlada da corrente de eletrólise resulta em uma correspondente liberação de iodo⁽²⁾.

Neste método não há contacto de agente oxidante com a proteína, evitando portanto mudanças químicas e desde que o iodo seja liberado lentamente, é intrinsicamente muito

mais provável resultar em uma distribuição uniforme, do iodo liberado entre moléculas de proteína do que no caso de espécies reativas de iodo formadas por meios químicos. Diversos autores⁽²⁾ mostraram que por este método, a utilização do iodo-131 é de 90%. Não é necessário introduzir carregador de iodo e o nível de substituição pode ser convenientemente controlado pela quantidade de iodeto de sódio ^{131}I adicionado ou pelo controle da corrente elétrica.

Este método pode ser usado com eficiência quando são requeridas proteínas iodadas com qualidades metabólicas muito altas⁽³⁾.

- d) **Iodação Enzimática** — Tem sido descrito por vários autores^(35,38,47). A lactoperoxidase é usada para produzir pequena concentração de peróxido de hidrogênio, que oxida o iodeto a uma espécie reativa que iodará proteínas. Esta concentração baixa de agente oxidante, causa insignificante modificação à molécula de proteína, o que torna o método de grande valor.

Hormônios iodados com atividades específicas adequadas para radioimunoensaio têm sido preparados por este método⁽²⁾.

1.4 — Usos da Soro Albumina Humana- ^{131}I

A soro albumina humana- ^{131}I é usada em Medicina Nuclear para várias finalidades, a saber: determinação do volume sanguíneo e plasmático, localização de tumor no cérebro, estudos de circulação, estudos metabólicos, na placentografia e outros.

Materiais radioativos são usados para determinação de rendimento cardíaco desde 1950, quando NYLIN e CELANDER⁽⁴⁰⁾ usaram células vermelhas marcadas com ^{32}P . Posteriormente, CRANE e colaboradores⁽¹⁰⁾ usaram a albumina- ^{131}I , para determinação de rendimento cardíaco, por meio de curvas de diluição, pela injeção desse material em pacientes.

Porém, alguns pesquisadores achavam que o método mais conveniente para a determinação do rendimento cardíaco era um sistema no qual um traçador radioativo injetado intravenosamente, fosse monitorado externamente à sua passagem pelo coração. Neste método, como em outros usados para determinação de rendimento cardíaco, é essencial que o traçador desapareça lentamente do sangue. A albumina- ^{131}I foi então selecionada para este fim, sendo o traçador mais comumente usado, visto que é possível uma determinação simultânea de volume sanguíneo⁽⁴⁾. SHIPLEY e seus colaboradores⁽⁴⁶⁾ foram os primeiros a empregar um detector de cintilação colocado sobre o precórdio e a albumina- ^{131}I como um agente traçador.

CITRIN e colaboradores⁽⁸⁾, utilizaram albumina- ^{131}I administrada intravenosamente para a determinação de perda de proteína gastrointestinal. Este método é prejudicado pela secreção de iodeto inorgânico na saliva e suco gástrico e a reabsorção de iodeto no intestino delgado. Para superar o problema de reabsorção de iodeto, JEEJEEBHOY e COGHILL^(29,30) utilizaram resina de troca iônica por via oral, a qual complexa o iodo liberado da albumina digerida para formar um complexo não absorvível, que é excretado na evacuação.

Os radiofármacos mais corretamente usados em placentografia, são: $\text{SAH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, $\text{Pertechnetato-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, $\text{Cl-}^{113\text{m}}\text{In}$ e $\text{SAH-}^{131}\text{I}$.

A $\text{SAH-}^{131}\text{I}$ foi usada pela primeira vez como agente placentográfico em 1957, por WINEBERG e seus colaboradores⁽⁵⁰⁾ que relataram a superioridade de seu uso para este propósito.

O uso de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$ em placentografia é restrito a contagem externa de pontos, por injeção intravenosa em consequência de sua baixa dose (5-10 μCi), para evitar radiações desnecessárias à mãe e

ao feto; e necessita de um tratamento prévio com lugol para bloquear a tireóide. Porém apresenta as seguintes vantagens: é produto comercial, não é difusível e tem meia-vida relativamente longa⁽³¹⁾.

O volume plasmático é determinado rotineiramente por curva de diluição e GIBSON e colaboradores⁽¹⁶⁾, em 1946, foram os primeiros a usar a albumina-¹³¹I para medir o volume plasmático em cachorros e comparar estas medidas com aquelas obtidas usando o corante azul de Evans, T-1824. Somente em 1950, CRISPELL e colaboradores⁽¹¹⁾ usaram a albumina-¹³¹I para medir o volume plasmático no homem e comparar com o método do corante azul de Evans, T-1824^(20,15). Os autores concluíram que o método utilizando a albumina-¹³¹I para determinação de volume do plasma oferece a vantagem de poder se repetir determinações em séries, o que não pode ser feito com o azul de Evans, T-1824.

Em 1965, WEISS e colaboradores⁽⁵¹⁾ introduziram um método clínico prático para diagnóstico de enfermidade da articulação pela administração intravenosa de albumina marcada com ¹³¹I e mediram a acumulação articular do radionuclídeo por um detector fixo e um mapeador retilíneo. Um dos problemas encontrado neste método foi a dificuldade de identificar pequenas articulações nas imagens cintilográficas. Atualmente, são muito mais usados compostos de ^{99m}Tc, pois as cintilografias das articulações são superiores às aquelas obtidas com albumina-¹³¹I; o ^{99m}Tc podendo ser usado com atividades maiores que o ¹³¹I⁽²²⁾.

A albumina marcada com ¹³¹I foi o indicador usado por BAUER e YUHL⁽¹¹⁾ e por DI CHIRO⁽¹²⁾, respectivamente os introdutores da mielocintigrafia e da cisternocintigrafia, e continua, ainda hoje, a ser o mais empregado nos centros de neurocirurgia e de Medicina Nuclear, apesar dos vários substitutos propostos⁽³³⁾: SAH-^{99m}Tc, ácido dietileno-triamino-pentacético (DTPA)-^{113m}In, DTPA-¹⁶⁹Yb, etc.

A albumina-¹³¹I é o traçador mais usado em cisternografia radioisotópica, por meio de injeção intratecal e que estuda o fluxo do líquido cefalorraquiano (LCR)⁽⁵⁾.

Em 1948, MOORE⁽³⁷⁾ ao marcar a fluoresceína com o ¹³¹I, logrou pela primeira vez, demonstrar a existência de um tumor intracraniano pela detecção externa da radiação gama emitida. Esse produto foi rapidamente substituído pela albumina marcada com o ¹³¹I⁽³⁶⁾, sendo esse o radiofármaco mais usado durante a década de 1950. Além da albumina-¹³¹I, atualmente existem outros radiofármacos também usados em cintigrafia cerebral (encefalocintigrafia), a saber: Pertechnetato-^{99m}Tc, DTPA-^{113m}In e clormerodrino-²⁰³Hg, tendo então a albumina-¹³¹I seu uso restrito, dada a superioridade das cintigrafias obtidas pelo tecnécio e pelo Índio. Porém, a albumina-¹³¹I tem duas vantagens⁽³³⁾:

- a) dos indicadores considerados, é o que atinge proporcionalmente a concentração mais elevada ao nível de um processo patológico do parênquima cerebral;
- b) é o único indicador que permite um estudo a longo prazo, muito útil, por exemplo, para a identificação de lesões císticas.

1.5 – Objetivo

Este trabalho objetiva estudar a marcação de soro albumina humana com iodo-131, a partir de soluções de Na¹³¹I, utilizando-se como agente oxidante a cloramina T.

O método de radioiodação com cloramina T^(26,41) foi desenvolvido para a preparação de compostos de atividade específica alta.

HALLABA e DROUET⁽²¹⁾ estudando alguns métodos de iodação de SAH, concluíram que para a produção rotineira de SAH marcada, o método da cloramina T oferece a vantagem de ser um método direto, rápido e reprodutível. A utilização direta do conteúdo de iodo nas soluções de Na¹³¹I pode conduzir à obtenção de um produto com atividade específica de 500-1000 mCi ¹³¹I/mg de proteína.

Estuda-se o rendimento de marcação em função de diversas variáveis: massa de soro albumina humana, massa de cloramina T, pH da marcação, tempo de reação e atividade das soluções de iodeto de sódio- ^{131}I . Analisa-se o produto marcado quanto à pureza radioquímica, esterilidade e estabilidade durante 10 dias após a preparação.

CAPÍTULO II

II – PARTE EXPERIMENTAL

II.1 – Materiais

II.1.1 – Aparelhagem

Mediac – Nuclear Chicago, modelo 6362

Cuba de Cromatografia Gelman – modelo 51325-1

Cintilador de poço de cristal de NaI(Tl) , marca Nuclear Chicago – modelo Ultrascaler II.

II.1.2 – Soluções e Reagentes

Na^{131}I livre de carregador e redutor, Union Carbide USA

Albumina Humana 25% – Behring – Brasil

Albumina Humana Liofilizada – Behring Institut – W. Germany

Cloramina T – E. Merck A. G. – Darmstadt

Metabissulfito de Sódio – The British Drug Houses Ltda – Inglaterra

Iodeto de Sódio – Riedel de Haën A. G. – Seelze-Hannover

Iodato de Sódio – Carlo Erba – Itália

Álcool Metílico p.a. – J. T. Baker – Brasil

Acetato de Chumbo – J. T. Baker – Brasil

Ácido Acético Glacial – J. T. Baker – Brasil

Difenilamina – E. Merck A. G. – Darmstadt

Ácido Fosfórico concentrado – Carlo Erba do Brasil S.A.

Monohidrogênio Fosfato de Sódio – J. T. Baker – Brasil

Dihidrogênio Fosfato de Potássio – J. T. Baker – Brasil

Glicocola – Carlo Erba – Itália

Hidróxido de Sódio – Carlo Erba do Brasil S.A.

Sabouraud líquido – Difco Laboratories – USA

Tioglicolato de Sódio – E. Merck A. G. – Darmstadt

Tampão Fosfato pH 6,0

Tampão Fosfato pH 7,0

Tampão Fosfato pH 7,6

Tampão Fosfato pH 8,0

Tampão Glicina pH 9,0

Resina Trocadora de Íons – Amberlite IRA 410 – Tennant Química S.A. – Brasil

11.2 – Métodos

A marcação de soro albumina humana (SAH) consiste das seguintes fases:

- a) Marcação do produto com ^{131}I utilizando-se soluções de Na^{131}I , oxidante, redutor e carregador.
- b) Purificação da SAH- ^{131}I com a finalidade de remover íons iodetos não ligados a estrutura da albumina.
- c) Controle radioquímico com a finalidade de determinar a porcentagem de iodo livre no produto marcado.

11.2.1 – Marcação de SAH

Adotou-se a técnica de marcação de proteínas descrita por BOCCI⁽⁶⁾, que utiliza a cloramina T como agente oxidante.

Em frasco de penicilina (10 ml) colocou-se solução de ^{131}I livre de carregador e redutor, na forma de Na^{131}I , evaporada a 0,1 ml. Adicionou-se um mililitro de solução tampão, solução de soro albumina humana 25% e solução de Cloramina T (1 mg/ml em solução tampão). O frasco foi imediatamente fechado, agitado manualmente e deixado reagir na obscuridade.

Adicionou-se, então, solução de metabissulfito de sódio (1,25 mg/ml em solução tampão) para parar a reação e reduzir o iodo-131 que não reagiu, a $^{131}\text{I}^{-(25)}$ e solução de carregador NaI (10% em solução tampão).

As soluções de cloramina T, metabissulfito de sódio e iodeto de sódio foram preparadas no momento da sua utilização.

11.2.2 – Cálculo do Rendimento de Marcação

Para este propósito, utilizou-se a técnica de cromatografia ascendente em metanol 75%, tendo

como suporte fitas de papel Whatman nº 1 (com dimensões de 23,0 x 2,5 cm), usando carregadores de iodeto e iodato.

Sabendo-se que o Rf da albumina é igual a zero, o Rf do I^- é 0,75 e o Rf do IO_3^- é 0,47⁽¹³⁾, determinou-se o rendimento (%) da seguinte maneira: após corrida do cromatograma, secou-se a fita, revelou-se o iodeto, com acetato de chumbo 10% e o iodato, com difenilamina em ácido fosfórico. Contaram-se, no Cintilador de poço de cristal de NaI(Tl), as secções correspondentes ao radioiodo livre I^- e IO_3^- e à origem da fita onde está a SAH-¹³¹I. O rendimento de marcação é dado pela relação entre a porcentagem de SAH-¹³¹I, e as porcentagens de iodeto + iodato + SAH-¹³¹I.

11.2.3 – Influência da Massa de SAH no Rendimento de Marcação

Utilizando-se a mesma técnica de marcação e reagentes idênticos, variou-se a massa da SAH de 50 a 250 mg, em intervalos de 50 mg. Neste ensaio usou-se albumina humana liofilizada.

Para os critérios de controle, utilizou-se o rendimento químico da marcação e as quantidades finais de ¹³¹I⁻ livre e de iodato (¹³¹IO₃⁻). A massa ideal, entre as ensaiadas é a que acusa além do rendimento mais elevado, os mais baixos valores de radioiodo livre.

11.2.4 – Influência da Massa de Cloramina T na Marcação de SAH

Com a finalidade de se determinar a massa ideal de cloramina T, isto é, aquela que acusa um melhor rendimento de marcação, manteve-se constante todos os outros parâmetros da marcação, e variou-se a massa do oxidante em: 0,24; 0,32; 0,40; 0,48 e 0,60 mg.

Fez-se o controle pelo rendimento radioquímico.

11.2.5 – Influência do pH de Marcação de SAH no Rendimento

Mantendo-se constante todos os outros parâmetros da marcação, variou-se o pH usando-se tampão fosfato pH 6,0; 7,0; 7,6; 8,0; e tampão glicina pH 9,0.

Com a finalidade de verificar qual o melhor pH para a marcação, isto é, o que acusa um melhor rendimento de marcação, determinou-se o rendimento radioquímico.

11.2.6 – Influência do Tempo de Reação no Rendimento de Marcação de SAH

Desejando-se obter um melhor rendimento de marcação, em menor tempo de reação, manteve-se constante todos os outros parâmetros e variou-se o tempo de reação de 10 a 60 minutos, em intervalo de 10 minutos.

Fez-se o controle pela determinação do rendimento radioquímico.

11.2.7 – Influência da Atividade de ¹³¹I no Rendimento de Marcação de SAH

Estudou-se o efeito de atividades diferentes de radioiodo no rendimento de marcação. Para isto, manteve-se constante todos os outros parâmetros e variou-se a atividade de ¹³¹I em: 3,1; 8,0; 18,3; 31,2; 40,4 e 50,0 mCi.

Determinou-se o rendimento radioquímico da marcação.

II.2.8 – Purificação de SAH-¹³¹I

A purificação foi feita com a finalidade de reduzir ao mínimo o teor de ¹³¹I⁻ livre (ions não ligados a estrutura da albumina), percolando-se a albumina marcada por uma coluna (4,5 x 1,2 cm) de resina de troca iônica, Amberlite IRA-410 na forma de Cl⁻.

II.2.9 – Controle do Teor de ¹³¹I⁻ e ¹³¹IO₃

Após a purificação descrita no item II.2.8, fez-se o controle radioquímico da SAH-¹³¹I com a finalidade de desprezar marcações que ultrapassem o teor máximo permissível de 5% de ¹³¹I⁻ mais ¹³¹IO₃ (27).

Utilizou-se a técnica de cromatografia descrita no item II.2.2 e o teor de ¹³¹I⁻ mais ¹³¹IO₃ é dado pela reação entre as porcentagens de ¹³¹I⁻ livre + ¹³¹IO₃ e as porcentagens de iodeto + iodato + SAH-¹³¹I.

II.2.10 – Esterilização de SAH-¹³¹I

O composto purificado foi esterilizado através de um filtro millipore de 0,22 μ.

Fizeram-se ensaios microbiológicos em meios de cultura líquidos: caldo nutritivo, em temperatura de 37°C, cultivando o produto marcado durante 24 a 48 horas; tioglicolato de sódio, em temperatura de 37°C, cultivando o produto durante 24 a 48 horas; Sabouraud, em temperatura ambiente, observado dez dias após a inoculação.

II.2.11 – Controle de Estabilidade de SAH-¹³¹I

Para se aquilatar a estabilidade do composto marcado, alíquotas de uma mesma partida foram mantidas em temperatura ambiente (23°-25° C) e em temperatura baixa (4°-6°C), durante dez dias. Nos dias 0; 1; 2; 5 e 10 colheram-se amostras de cada alíquota, determinando-se o teor percentual de ¹³¹I⁻ livre, tomado como índice da degradação da proteína marcada.

CAPÍTULO III

III – RESULTADOS

Neste capítulo apresenta-se os resultados obtidos na marcação de SAH com ¹³¹I quando se estudou a influência da massa de albumina, de cloramina T, do pH e do tempo de reação no rendimento.

Os rendimentos (item II.2.2) destes experimentos foram determinados antes da purificação conforme descrita no item II.2.8 e esterilização (item II.2.10) da SAH-¹³¹I. Apresentam-se, também, neste capítulo, os resultados dos ensaios de purificação, esterilização e o controle de estabilidade.

III.1 – Influência da Massa de SAH no Rendimento de Marcação

Para o estudo da influência da massa de SAH no rendimento de marcação utilizou-se a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de $\text{Na}^{131}\text{I} = 4,0 \text{ mCi}$

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de SAH = 50; 100; 150; 200 e 250 mg. Usou-se albumina humana liofilizada e cada amostra foi dissolvida em 0,4 ml de tampão fosfato pH 7,6.

A Tabela III.1 apresenta os valores percentuais de $^{131}\text{I}^-$, de $^{131}\text{I}\text{O}_3^-$ e o rendimento radioquímico para cada massa de SAH. O gráfico 3.1 mostra o rendimento radioquímico em função da massa de SAH.

III.2 – Influência da Massa de Cloramina T no Rendimento da Marcação de SAH

Para o estudo da influência da massa de cloramina T na marcação de SAH utilizou-se a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de $\text{Na}^{131}\text{I} = 4,0 \text{ mCi}$

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,75 mg (cada amostra foi dissolvida em 0,4 ml de tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de cloramina T = 0,24; 0,32; 0,40; 0,48; e 0,60 mg. Cada amostra foi dissolvida em 0,4 ml de tampão fosfato pH 7,6.

Os dados numéricos percentuais relativos ao rendimento da marcação em função da massa de cloramina T, estão consignados na Tabela III.2 e Gráfico 3.2.

III.3 – Influência do pH de Marcação de SAH no Rendimento

Para o estudo da influência do pH de marcação de SAH no rendimento utilizou-se a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de $\text{Na}^{131}\text{I} = 2,5 \text{ mCi}$

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

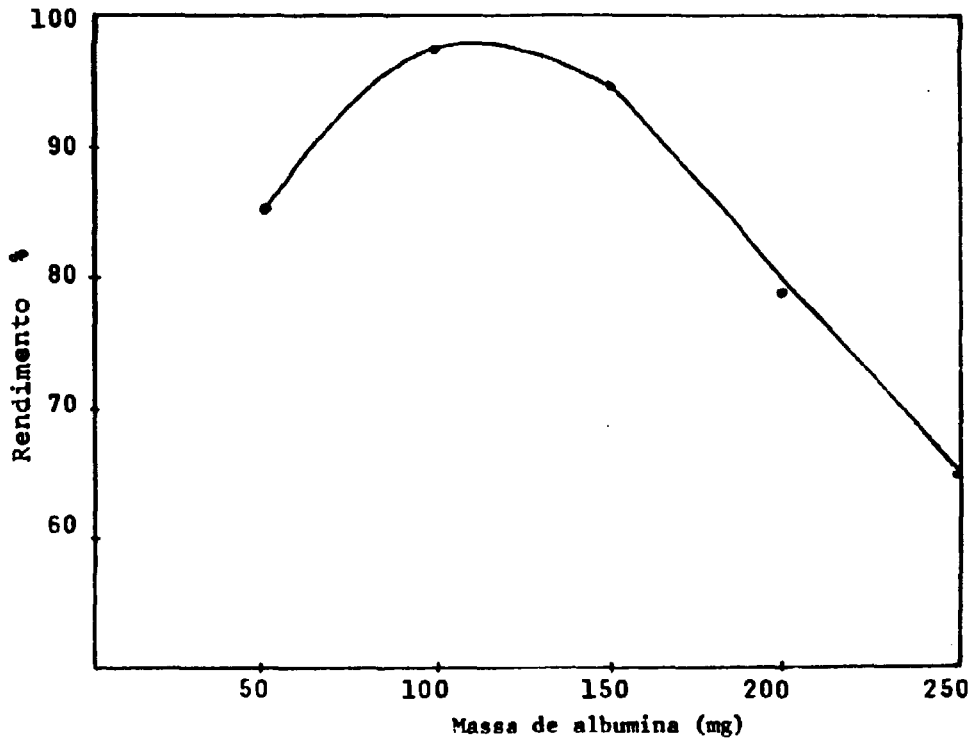


Gráfico 3.1 – Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função da Massa de Soro Albumina Humana

Tabela III.1

Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I e Valores Percentuais de ¹³¹I⁻ e ¹³¹IO₃⁻ em Função da Massa de Soro Albumina Humana

Experimento	Massa Albumina (mg)	¹³¹ I ⁻ (%)	¹³¹ IO ₃ ⁻ (%)	Rendimento (%)
1	50	14,0	0,2	85,6
2	100	2,8	0,1	97,0
3	150	5,6	0,1	94,3
4	200	21,0	0,1	79,0
5	250	36,3	0,1	64,8

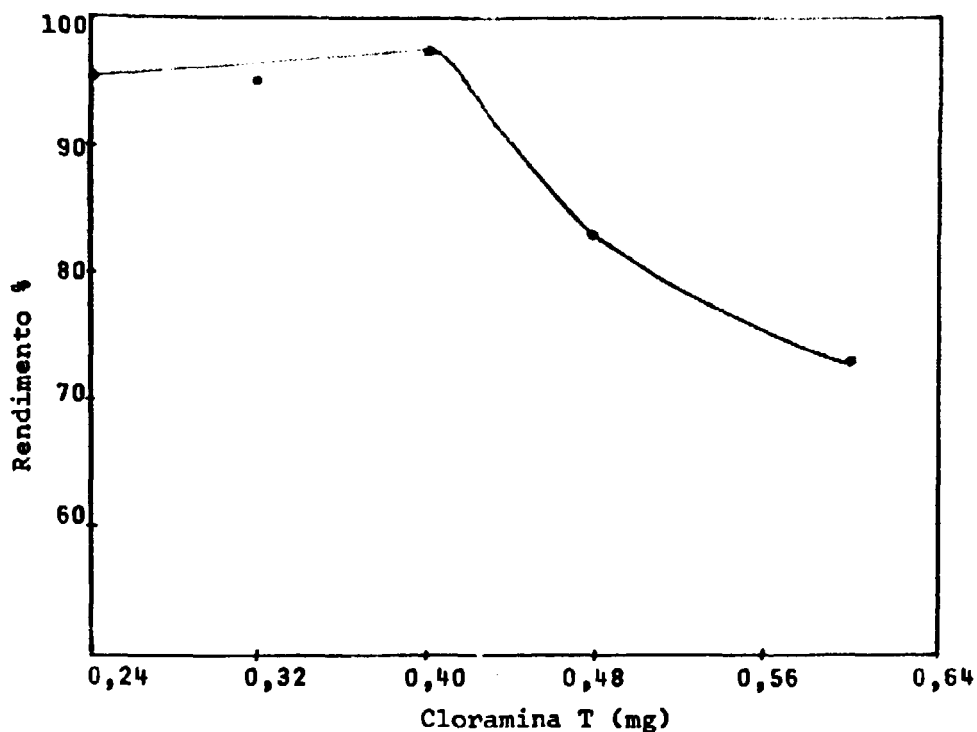


Gráfico 3.2 - Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função da Massa de Cloramina T

Tabela III.2

Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função da Massa de Cloramina T

Experimento	Massa de Cloramina T (mg)	Rendimento (%)
1	0,24	96,8
2	0,32	96,3
3	0,40	97,4
4	0,48	83,0
5	0,60	73,0

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 6,0; 7,0; 7,6; 8,0 e tampão glicina pH 9,0)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfato de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 6,0; 7,0; 7,6; 8,0 e tampão glicina pH 9,0)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 6,0; 7,0; 7,6; 8,0 e tampão glicina pH 9,0)

Tampão = 1,0 ml de tampão fosfato pH 6,0; 7,0; 7,6; 8,0; e tampão glicina pH 9,0.

A Tabela III.3 e o Gráfico 3.3 mostram os valores numéricos do rendimento em função do pH de marcação.

Tabela III.3

Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função do pH

Experimento	pH	Rendimento (%)
1	6,0	67,0
2	7,0	86,2
3	7,6	89,0
4	8,0	88,0
5	9,0	88,5

III.4 – Influência do Tempo de Reação no Rendimento da Marcação de SAH

Para o estudo da influência do tempo de reação no rendimento da marcação de SAH utilizou-se a técnica descrita no item 11.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de Na¹³¹I = 4,0 mCi

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de metabissulfato de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

Tempo de reação = 10; 20; 30; 40; 50 e 60 minutos.

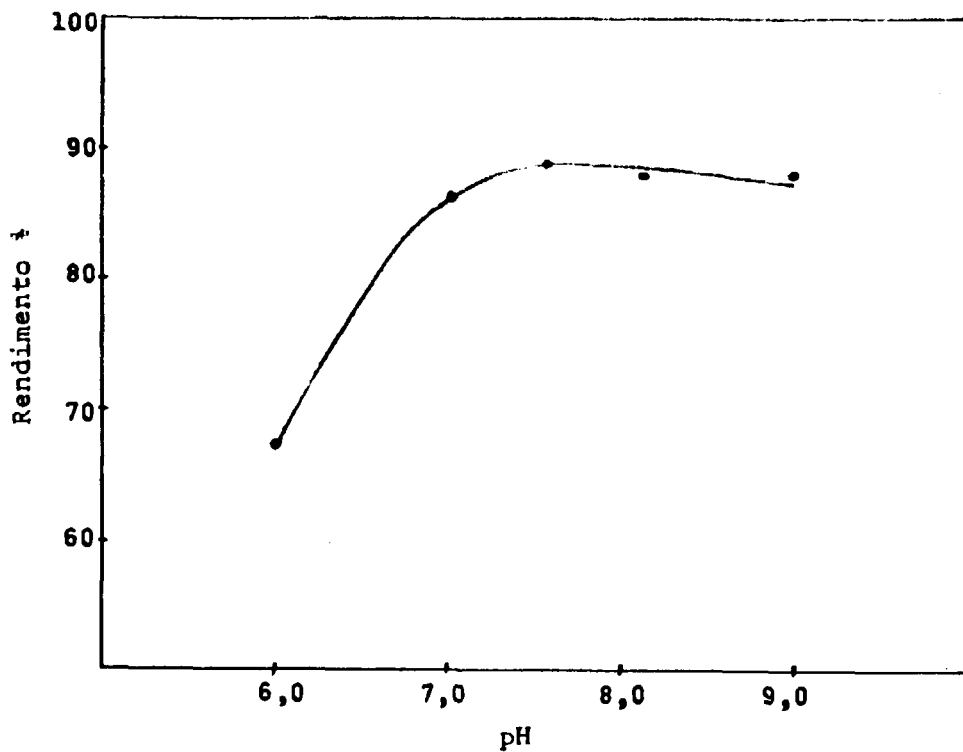


Gráfico 3.3 – Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função do pH

Variando-se o tempo de reação e levando-se em consideração o rendimento da marcação, obtiveram-se os dados apresentados na Tabela III.4 e Gráfico 3.4.

Tabela III.4

Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função do Tempo de Reação

Experimento	Tempo (minuto)	Rendimento (%)
1	10	81,3
2	20	79,5
3	30	78,0
4	40	88,9
5	50	85,0
6	60	83,5

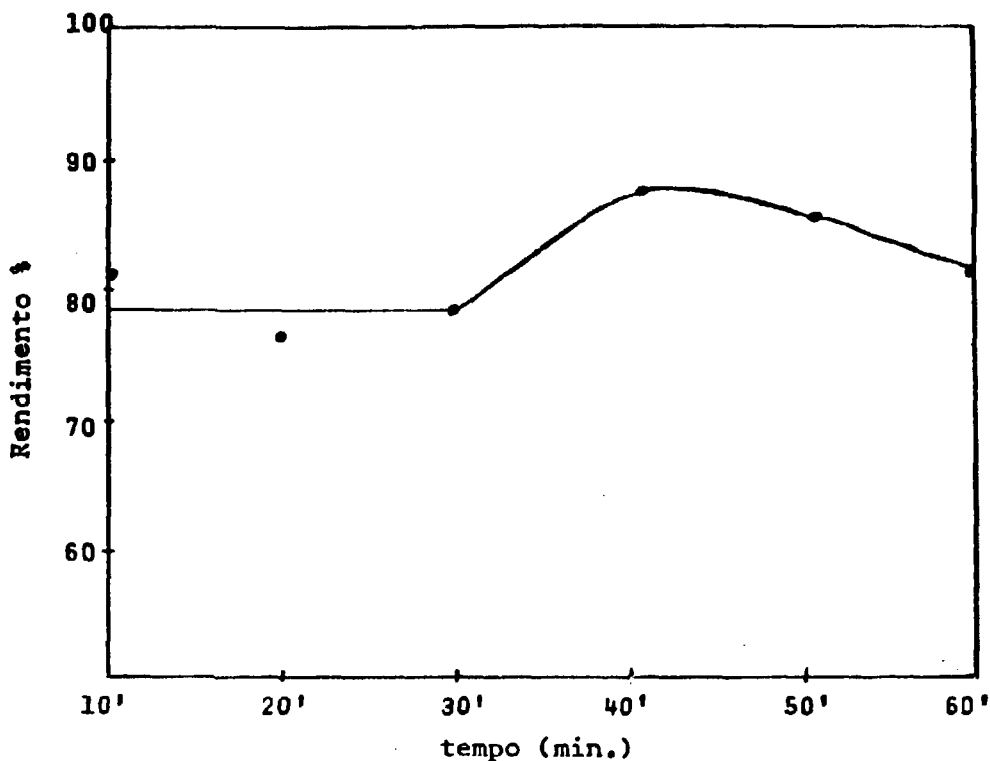


Gráfico 3.4 - Rendimento da Marcação de SAH-¹³¹I em Função do Tempo de Reação

III.5 - Influência da Atividade de ¹³¹I no Rendimento da Marcação de SAH

Para o estudo da influência da atividade de ¹³¹I no rendimento da marcação de SAH utilizou-se a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Tempão fosfato pH 7,8 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tempão fosfato pH 7,8)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tempão fosfato)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tempão fosfato pH 7,8)

Atividade de solução de Na¹³¹I = 3,1; 8,0; 18,3; 31,2; 40,4 e 50,0 mCi.

No Gráfico 3.5 e Tabela III.5 estão contidos os dados relativos ao rendimento em função da atividade de radioiodo (Na^{131}I).

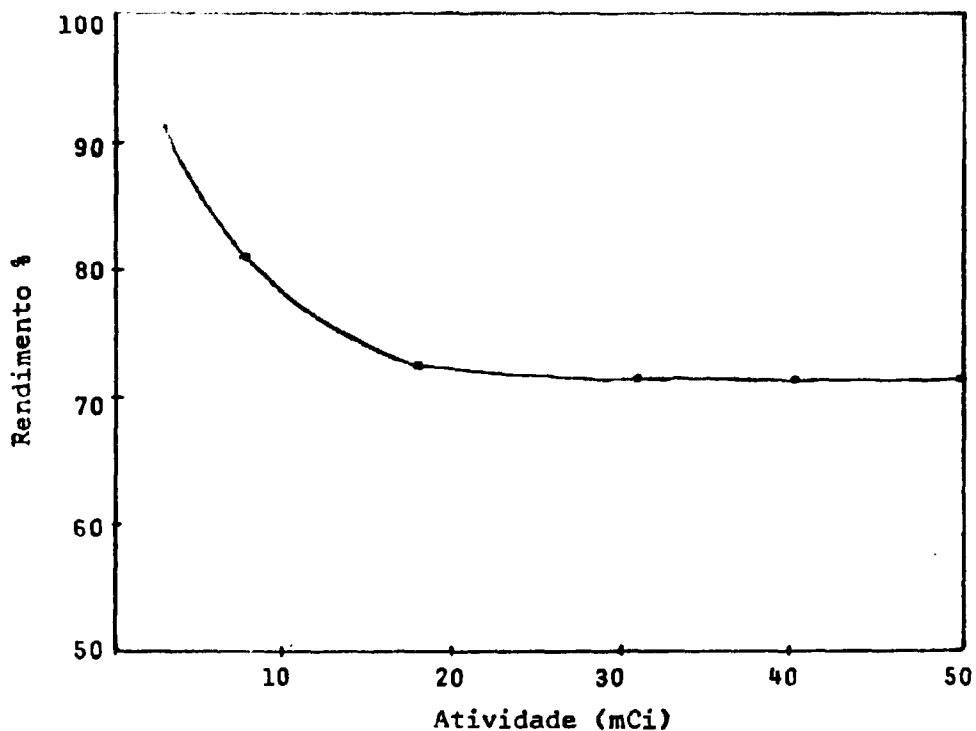


Gráfico 3.5 - Rendimento da Marcação de SAH- ^{131}I em Função da Atividade de ^{131}I

Tabela III.5

Rendimento da Marcação de SAH- ^{131}I em Função da Atividade do ^{131}I

Experimento	Atividade (mCi)	Rendimento (%)
1	3,1	91,2
2	8,0	81,4
3	18,3	72,3
4	31,2	71,8
5	40,4	73,5
6	50,0	74,8

III.6 – Purificação de HSA.¹³¹I

Par. o estudo da purificação prepararam-se amostras de SAH.¹³¹I conforme a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de Na¹³¹I = 5,5 e 10,0 mCi

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

As soluções de SAH.¹³¹I foram purificadas conforme descrito no item II.2.8.

Na Tabela III.6 estão contidos os valores numéricos percentuais de radioiodo livre ¹³¹I⁻ e ¹³¹IO₃⁻ antes e após a purificação de duas preparações de SAH.¹³¹I.

Tabela III.6

Valores Numéricos Percentuais de ¹³¹I⁻ e ¹³¹IO₃⁻ Antes e Após a Purificação de SAH.¹³¹I

Experimento	Atividade (mCi)	Antes da Purificação		Depois da Purificação	
		¹³¹ I ⁻ (%)	¹³¹ IO ₃ ⁻ (%)	¹³¹ I ⁻ (%)	¹³¹ IO ₃ ⁻ (%)
1	5,5	9,3	0,1	0,8	0,7
2	10,0	15,0	0,1	0,8	0,7

III.7 – Esterilização de SAH.¹³¹I

Para o estudo da esterilização prepararam-se amostras de SAH.¹³¹I conforme a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de Na.¹³¹I = 4,0 mCi

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

Fizeram-se ensaios microbiológicos de SAH-¹³¹I em meios de cultura líquidos: caldo nutritivo e tioglicolato de sódio, ambos em temperatura de 37°C, cultivando o produto durante 24 e 48 horas; Sabouraud, em temperatura ambiente, observando dez dias após a inoculação.

Os resultados foram negativos em diversas amostras do produto analisado, não sendo portanto necessário outros tipos de controles microbiológicos para garantir a esterilidade do produto.

Estes ensaios foram feitos após a purificação (item II.2.8) e esterilização (item II.2.10) da SAH-¹³¹I.

III.8 – Controle de Estabilidade de SAH-¹³¹I

Para o estudo do controle de estabilidade prepararam-se amostras de SAH-¹³¹I conforme a técnica descrita no item II.2.1 nas condições seguintes:

Atividade de solução de Na¹³¹I = 5,5 mCi

Tampão fosfato pH 7,6 em volume = 1,0 ml

Massa de SAH = 100 mg (0,4 ml de albumina humana 25%)

Massa de cloramina T = 0,4 mg (0,4 ml de uma solução 1 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Tempo de reação = 40 minutos

Massa de metabissulfito de sódio = 0,5 mg (0,4 ml de uma solução 1,25 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6)

Massa de iodeto de sódio = 3,0 mg (0,3 ml de uma solução 10% em tampão fosfato pH 7,6)

Amostras de uma mesma partida de SAH-¹³¹I foram mantidas em temperatura ambiente (23°-25°C) e em temperatura baixa (4°-6°C) durante dez dias. Fez-se o controle do teor de ¹³¹I livre nos dias 0; 1; 2; 5 e 10 após as preparações.

Os valores numéricos percentuais de radioiodo livre (¹³¹I⁻) e ¹³¹I₂ em função do tempo e temperatura, estão contidos na Tabela III.7.

Este controle foi feito após a purificação (item II.2.8) e esterilização (item II.2.10) de SAH-¹³¹I.

Tabela III.7

Valores Numéricos Percentuais de $^{131}\text{I}^-$ e $^{131}\text{IO}_3^-$ em Função do Tempo para as Diferentes Faixas de Temperatura Ensaçadas

Dias	$^{131}\text{I}^-$ (%)		$^{131}\text{IO}_3^-$ (%)	
	4° – 6°C	23° – 25°C	4° – 6°C	23° – 25°C
0	—	0,8	—	0,06
1	1,4	1,1	0,04	0,07
2	1,1	1,5	0,05	0,05
5	2,8	3,7	0,05	0,75
10	4,7	21,7	0,18	1,48

CAPÍTULO IV

IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A radioiodação pelo método da oxidação de soluções de iodeto de sódio- ^{131}I pela cloramina T de HUNTER e GREENWOOD⁽²⁶⁾ tem sido a de emprego mais corrente para a introdução do ^{131}I na molécula protéica. Assim, empregou-se para as marcações de soro albumina humana com ^{131}I o referido método, com modificações introduzidas por BOCCI⁽⁶⁾.

A cloramina T, sal sódico do ácido N-monocloro-p-tolueno-sulfonâmido, libera lentamente ácido hipocloroso em soluções aquosas, com conseqüente formação de iodo (^{131}I) livre das soluções de iodeto de sódio- ^{131}I .

O processo de iodação usado em nosso trabalho consistiu em adicionar à uma solução de iodeto de sódio- ^{131}I , primeiramente a proteína e em seguida a cloramina T. O mecanismo dessa reação não é conhecido⁽²⁵⁾ mas presumivelmente forma-se um complexo do iodo com a sulfonamida no qual o iodo apresenta-se com carga positiva.

Um radiofármaco⁽⁴⁸⁾ pode ser definido como uma preparação de composição adequadamente constante, de pureza radioquímica e radionuclídica e uniformidade de ação fisiológica (farmacológica) para uso em medicina nuclear como um agente terapêutico ou em diagnóstico.

Estudaram-se, nesta dissertação, os parâmetros que influenciam a marcação de soro albumina humana com ^{131}I , a fim de escolher-se as melhores condições para uma produção rotineira do referido radiofármaco.

No estudo de cada variável que pode influenciar o rendimento de marcação, utilizou-se sempre a mesma partida de iodo-131 sendo que os experimentos foram feitos em duplicata e em temperatura ambiente. Pelo fato das soluções de Na^{131}I usadas, serem de procedência norte-americana, não tínhamos condições de saber a data de preparação.

Deve-se ressaltar que as soluções de iodeto de sódio- ^{131}I livres de carregadores, na realidade não o são pois que as preparações de ^{131}I obtidas pela irradiação de telúrio natural com nêutrons, ou pela fissão de ^{235}U contém ^{127}I estável e ^{129}I com meia-vida de $1,6 \times 10^7$ anos. A quantidade de iodo total

depende do tempo de irradiação do alvo e varia com o decorrer do tempo. Soluções de Na^{131}I recentemente preparadas podem ter um conteúdo de iodo três a quatro vezes maior do que aquela do ^{131}I presente ($0,8 \mu\text{g}/100 \text{ mCi}$). Em nossos experimentos não se determinou a atividade específica (mCi/mg) real das soluções de Na^{131}I .

Para estudar-se a influência da massa de SAH no rendimento de marcação, usou-se albumina liofilizada diluída em 0,4 ml de tampão fosfato pH 7,6, para manter-se constante o volume de reação.

Em todos os experimentos manteve-se sempre o mesmo volume total da solução de reação (2,6 ml). Segundo HUNTER⁽²⁵⁾, o rendimento da reação depende da concentração da proteína, e por isto procurou-se minimizar o volume de solução para a reação de iodação.

Dentre as massas de SAH usadas, a massa de 100 mg correspondeu um maior rendimento (97,04%) e conseqüentemente uma menor percentagem de $^{131}\text{I}^-$ livre (Tabela III.1). Como podemos notar as percentagens de $^{131}\text{I}^-$ foram as mesmas em todos os experimentos.

Ao estudar-se a influência da massa de cloramina T no rendimento da marcação de SAH- ^{131}I , seguindo-se o trabalho de BOCCI⁽⁶⁾, variou-se a massa de cloramina T de valores abaixo a valores acima daquele usado pelo autor. Pelo Gráfico 3.2 e Tabela III.2 verifica-se que o maior rendimento de marcação correspondeu a 0,4 mg de cloramina T, e que aumentando-se a massa do oxidante o rendimento da marcação decresce.

BOCCI⁽⁶⁾ provou que usando essa massa de cloramina T (0,4 mg) e 100 mg de albumina, a proteína não apresentou alterações.

Segundo GREENWOOD e HUNTER⁽¹⁹⁾, a quantidade de cloramina T requerida para ótima iodação é, para todos os propósitos práticos, independente da concentração do iodeto-131.

O grau de substituição química é minimizado (0,5-1,0 átomo de iodo/molécula de proteína) pelo uso de ^{131}I livre de carregador.

Para estudar-se a influência do pH de marcação, usou-se diferentes tampões sendo que as marcações efetuadas em pH 7,6 forneceram melhores rendimentos (Tabela III.3). A partir deste pH, houve um leve decréscimo no rendimento da marcação. Em pH básico ocorre ionização dos grupos tirosina acelerando a iodação da proteína. HUNTER⁽²⁶⁾ ao determinar o pH ótimo para a iodação do hormônio de crescimento, encontrou uma curva semelhante.

Com a finalidade de obter-se um bom rendimento de marcação em menor tempo possível para evitar-se um grande contacto da molécula protéica com o oxidante, fizeram-se várias marcações em tempos diferentes. Após determinados tempos de reação, parou-se a mesma com o redutor metabissulfito de sódio e depois de adicionar-se o carregador NaI, fez-se o controle radioquímico e determinou-se o rendimento da marcação (item II.2.2). O melhor rendimento correspondeu a 40 minutos de reação (Tabela III.4).

Ao estudar-se a influência da atividade de ^{131}I no rendimento da marcação de SAH- ^{131}I , usou-se Na^{131}I com atividades crescentes. Verificou-se que com atividades baixas ($3,1 \text{ mCi}$) o rendimento de marcação é alto ($\sim 90\%$) e que com o aumento da atividade vai havendo um pequeno decréscimo no rendimento (Tabela III.5). A partir de uma determinada atividade ($\sim 20 \text{ mCi}$) o rendimento de marcação tornou-se constante de 75%, aproximadamente.

O decréscimo do rendimento de marcação em função da atividade do ^{131}I pode ser explicado da seguinte maneira: utilizou-se em todos os experimentos a mesma partida de ^{131}I de uma determinada concentração radioativa (millicuries por mililitro); com atividades crescentes aumenta também a quantidade de iodo total da solução, resultando rendimento de marcação elevado ($\sim 90\%$), apenas quando esse teor de iodo é mais baixo.

Um estudo mais minucioso deve ser feito, por exemplo, adicionando carregador de iodeto em quantidades crescentes com as atividades das soluções de ^{131}I .

Por outro lado, a determinação de resíduos tirosínicos mono e diiodados em relação ao total de moléculas polipeptídicas conduzirá a resultados que permitirão saber se a incorporação de um determinado número de átomos de iodo na molécula protéica, não altera suas propriedades biológicas.

O metabissulfito de sódio é adicionado para parar a reação e reduzir a iodeto o iodo-131 que não reagiu. Segundo HUNTER⁽²⁵⁾ a quantidade de metabissulfito de sódio usada é simplesmente o equivalente químico de toda cloramina T adicionada mais um pequeno excesso. Então, se a quantidade de cloramina T for acrescida, automaticamente a quantidade de metabissulfito de sódio também deve ser acrescida. Porém, não deve haver grande quantidade de agente redutor, pois pode provocar uma alteração na molécula da proteína.

Com a finalidade de retirar-se o $^{131}\text{I}^-$ livre da solução de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$, passou-se o radiofármaco através de uma coluna de resina de troca iônica, Amberlite IRA-410 na forma de Cl^- . Depois fez-se o controle radioquímico e determinou-se as percentagens de $^{131}\text{I}^-$ e $^{131}\text{IO}_3^-$. Esta resina mostrou-se eficiente conforme pode-se notar pelos dados na Tabela III.6.

Por ser, a albumina humana- ^{131}I , um radiofármaco e ter sua administração em forma de injetável, esterilizou-se o material passando-se a solução através de filtro millipore de 0,22 μ .

Acrescentou-se, então, solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para obter-se uma solução final de 1,0 mCi/ml.

Fez-se controle microbiológico do radiofármaco obtendo-se resultados negativos, concluindo-se que o material estava estéril (item III.7).

Para estudar-se a estabilidade do radiofármaco guardou-se amostras de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$ em temperatura ambiente e temperatura baixa. Durante alguns dias fez-se controle radioquímico das amostras, verificando-se (Tabela III.7) que a solução de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$ é mais estável quando guardada em temperatura baixa (4°C - 6°C).

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, conclui-se que as condições ótimas para a preparação de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$, são:

- a) Massa de SAH 100 mg;
- b) Massa de cloramina T 0,4 mg;
- c) pH de marcação 7,6;
- d) Tempo ideal de reação 40 minutos.

Verificou-se ainda que:

- a) Com atividade baixa de ^{131}I o rendimento é alto (em torno de 90%) e a partir de uma determinada atividade (20 mCi) o rendimento torna-se constante (ao redor de 75%);
- b) A resina de troca iônica, Amberlite IRA-410 na forma de Cl^- mostrou-se eficiente na purificação de $\text{SAH-}^{131}\text{I}$;

- c) O filtro Millipore de 0,22 μ mostrou-se eficiente na esterilização do radiofármaco;
- d) O radiofármaco deve ser conservado em temperatura de 4°C – 8°C.

ABSTRACT

~~Results of the test on the~~ LABELING OF ¹³¹I-human serum albumin in ~~Nuclear Medicine~~ ~~labeling~~ with I-131 from a solution of ¹³¹I-sodium iodide using chloramine T as an oxidant agent is studied.

Parameters which can influence on the labelling yield like mass of human serum albumin, and chloramine T, pH of the reaction, reaction time and activity of ¹³¹I are also studied.

The purification of the labeled product by means of IRA-410 Amberlite ion-exchange resin in chloride form and the sterilization of the ¹³¹I-human serum albumin by its passage through a 0,22 μ millipore filter are carried out. The radiochemistry control of the final product by paper chromatography and the microbiological control by cultivation of microorganisms in fluid medium: nutrient broth, sodium thioglycollate broth and Sabouraud, are performed.

The stability of the radiopharmaceutical until ten days after its preparation ^{is} analysed by means of radiochemical control. (Author)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. BAUER, F. K. & YUHL, E. T. Myelography by means of ¹³¹I: the myeloscintigram. *neurology (Minneapolis)*, 3:341-6, 1953.
2. BAYLY, R. J.; EVANS, E. A.; GLOVER, J. S.; RABINOWITZ, J. L. Synthesis of labeled compounds. In: TUBIS, M. & WOLF, W., editores. *Radiopharmacy*. New York, N. Y., Wiley, 1976. p.348-55.
3. BIANCHI, R.; ROSA, U.; FEDERIGHI, G.; PENNISI, G. F.; SCASELLATI, G. A.; DONATO L. Iodinated albumin as a metabolic tracer. In: DONATO, L.; MILHAUD, G.; SIRCHIS, J., editores. *Labeled proteins in tracer studies: proceedings of a conference, Pisa, 17-19 January, 1966*. Brussels, Euratom, 1966. p.61-9.
4. BLAHD, W. H. Cardiovascular disease and disorders of the circulation. In: BLAHD, W. H. *Nuclear medicine*. New York, N. Y., McGraw-Hill, 1971. p.487-525.
5. BLAHD, W. H. Diagnosis of central nervous system disease. In: BLAHD, W. H. *Nuclear medicine*. 2.ed., New York, N. Y., McGraw-Hill, 1971. p.236-312.
6. BOCCI, V. Efficient labelling of serum proteins with ¹³¹I using chloramine T. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 15:449-56, 1964.
7. CANTAROW, A. & SCHEPARTZ, B. *Biochemistry*. Philadelphia, Pa., Saunders, 1954. p.80.
8. CITRIN, Y.; STERLING, K.; HALSTED, J. A. The mechanism of hypoproteinemia associated with giant hypertrophy of the gastric mucosa. *New Engl. J. Med.*, 257:906-12, 1957.
9. CONN, E. E. & STUMPF, P. K. *Manual de bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, 1972. p.84.
10. CRANE, M. C.; ADAMS, R. A.; WOODWARD, I. Cardiac output measured by the injection method with use of radioactive material and continuous recording. *J. Lab. Clin. Med.*, 47:802-10, 1956.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-66 de ABNT.

11. CRISPELL, K. R.; PORTER, B.; NIESET, R. T. Studies of plasma volume using human serum albumin tagged with radioactive ^{131}I . *J. clin. Invest.*, 29:513-6, 1950.
12. DI CHIRO, G. Movement of the cerebrospinal fluid in human beings. *Nature (London)*, 204:290-1, 1964.
13. FIELDS, T. & SEED, L. Radioactive materials for medical use. In: FIELDS, T. & SEED, L. *Clinical use of radioisotopes*. Chicago, Ill., Year Book Pub, 1957. p.271-2.
14. GALATZEANU, I. & COOK, G. B. Self-decomposition of some ^{131}I - labelled radiopharmaceuticals. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Analytical control of radiopharmaceuticals*. Vienna, 1970. p.150. (IAEA-PL-336/12)
15. GIBSON, J. G. & EVANS JR., W. A. Clinical studies of the blood volume. *J. clin. Invest.*, 16:301, 1937 apud CRISPELL, K. R.; PORTER, B.; NIESET, R. T. Studies of plasma volume using human serum albumin tagged with radioactive ^{131}I . *J. clin. Invest.*, 29:513, 1950.
16. GIBSON, J. G.; SELIGMAN, A. M.; PEACOCK, W. C.; AUB, J. C.; FINE, J.; EVANS, R. D. The distribution of red cells and plasma in large and minute vessels of the normal dog determined by radioactive isotopes of iron and iodine. *J. clin. Invest.*, 25:848-57, 1946.
17. GILMORE, R. C.; ROBBINS, M. C.; REID, A. F. Labelling bovine and human albumin with ^{131}I . *Nucleonics*, 12:65-8, 1954.
18. GLOVER, J. S.; SALTER, D. N.; SHEPHERD, B. P. A study of some factors that influence the iodination of ox insulin. *Biochem. J.*, 103:120-8, 1967.
19. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
20. GREGERSEN, M. I.; GIBSON, J. J.; STEAD, E. A. Plasma volume determination with dyes: errors in colorimetry; use of blue dye T-1824. *Am. J. Physiol.*, 113:54-5, 1935.
21. HALLABA, E. & DROUET, J. ^{131}I -labelling of human serum albumin by the iodine monochloride and chloramine T methods. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 22:46-9, 1971.
22. HOFFER, P. B. & GENANT, H. K. Radionuclide joint imaging. *Semin. nucl. Med.*, 6(1):121-37, 1976.
23. HUGHES, JR., W. L. & STRAESSLE, R. Preparation and properties of serum and plasma-proteins. XXIV. Iodination of human serum albumin. *J. Am. chem. Soc.*, 72:452-7, 1950.
24. HÜGLI, H. The labelling of proteins with ^{131}I . In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Protein metabolism*. Vienna, 1965. p.7. (Technical reports series, 45).
25. HUNTER, W. M. Iodination of protein compounds. In: ANDREWS, G. A.; KNISELEY, R. A.; WAGNER, H. N., editores. *Radioactive pharmaceuticals: proceedings of a symposium, Nov. 4-11, 1965*. Oak Ridge, Tenn., United States Atomic Energy Commission, Apr. 1966. p.245-64. (CONF-651111).
26. HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)*, 194:495-8, 1962.
27. IODINATED I-131 serum albumin. In: THE PHARMACOPEIA of the United States of America. 19.rev. Rockville, Md., United States Pharmacopeial Convention, 1975. p.16-7.

28. IZZO, J. L.; BALE, W. F.; IZZO, M. J.; RONCONE, A. High specific activity labeling of insulin with ^{131}I . *J. biol. Chem.*, 239:3743-8, 1964.
29. JEEJEBHOY, K. N. Cause of hypoalbuminemia in patients with gastrointestinal and cardiac disease. *Lancet*, 1:343-8, 1962.
30. JEEJEBHOY, K. N. & COGHILL, N. F. The measurement of gastrointestinal protein loss by a new method. *Gut*, 2:123-30, 1961.
31. JOHNSON, P. M. & KING, D. I. The placenta: evaluation by radionuclides and ultrasound. *Semin. nucl. Med.*, 4(1):75-93, 1974.
32. LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*. Barcelona, Omega, 1972. p.140.
33. LUBIN, E. & THOM, A. F. Aplicações em neurologia. In: ROCHA, A. F. G. *Medicina Nuclear*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.304-34.
34. McFARLANE, A. S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature (London)*, 182:53, 1958.
35. MARCHALONIS, J. J. An enzymic method for the tracer iodination of immunoglobins and other proteins. *Biochem. J.*, 113:299-305, 1969.
36. MOORE, G. E. *Diagnosis and localization of brain tumors: a clinical and experimental study employing fluorescent and radioactive tracer methods*. Springfield, Ill., Thomas, 1953.
37. MOORE, G. E. Use of radioactive diiodo fluorescein in the diagnosis and localization of brain tumors. *Science (New York)*, 107:567-71, 1948.
38. MORRISON, M.; BAYSE, G. S.; WEBSTER, R. G. Use of lactoperoxidase catalysed iodination in immunochemical studies. *Immunocytochemistry*, 8:289-97, 1971.
39. NORMAL serum albumin. In: THE PHARMACOPEIA of the United States of America. 19.rev. Rockville, Md., United States Pharmacopeial Convention, 1975. p.17.
40. NYLIN, G. & CELANDER, H. Determination of blood volume in the heart and lungs and the cardiac output through the injection of radiophosphorus. *Circulation*, 1:76-83, 1950.
41. REITH, W. S. & TAMPION, W. Preparation of (^{131}I)-3-monoiodotyrosine and (^{131}I)-3,5-diiodotyrosine of very high specific activity. *Nature (London)*, 197:180-1, 1963.
42. ROSA, U. A method for protein labelling with radioiodine. *Atompraxis*, 6(Suppl. 5/66), 1966. (Separata).
43. ROSA, U.; BIANCHI, R.; FEDERIGHI, C.; SCASELLATI, G. A.; DONATO, L. Marquage de protéines à l'aide de l'iode radioactif par une méthode électrochimique. Effet de l'iodation progressive sur le comportement métabolique de la serumalbumine humaine. *Bull. Acad. suisse Sci. med.*, 21(3-4):185-96, 1965 (Separata).
44. ROSA, U.; PENNISI, F.; BIANCHI, R.; FEDERIGHI, G.; DONATO, L. Chemical and biological effects of iodination on human albumin. *Biochim. biophys. Acta*, 133:486-88, 1967.
45. ROSA, U.; SCASELLATI, G. A.; PENNISI, F.; RICCIONI, N.; GIAGNONI, P.; GIORDANI, R. Labelling of human fibrinogen with ^{131}I by electrolytic iodination. *Biochim. biophys. Acta*, 86:519-26, 1964.

46. SHIPLEY, R. A.; CLARK, R. E.; LIEBOWITZ, D. M.; KROHMER, J. S. Analysis of the radiocardiogram in heart failure. *Circulation Res.*, 1:428-38, 1953.
47. THORELL, J. I. & JOHANSSON, B. G. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. biophys. Acta* 251:363-9, 1971.
48. TUBIS, M. Radiopharmaceuticals. In: TUBIS, M. & WOLF, W., editores. *Radiopharmacy*. New York, N. Y., Wiley, 1976. p.410.
49. VEALLI, W. et alli. The preparation of ^{132}I , ^{131}I labelled human serum albumin for clinical tracer studies. *J. Radiology*, 28:633, 1955 apud AMBROSINO, C.; LIBERATORI, J.; ROSA, U.; SCASSELLATI, G. A.; PENNISI, F. Protein labelling with radioiodine by electrochemical way. Note 1: Iodination of tyrosine. *Ricerca scient., Serie 2*, 4(5):669-80, 1964. (Separata).
50. WEINBERG, A.; RIZZI, J.; McMANUS, R.; RIVERA, J. Localization of the placental site by radioactive isotopes. *Obstet. Gynec.*, 9:692-5, 1957.
51. WEISS, T. E.; MAXFIELD, W. S.; MURISON, P. I.; HIDALGO, J. U. Iodinated human serum albumin (I-131) localization studies of rheumatoid arthritis joints by scintillation scanning. *Arthritis Rheum.*, 8:976-87, 1965.



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

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