

BR90 22924

ISSN 0101-3084



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO DO SULFATO DE
GENTAMICINA COM ^{99m}Tc . DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Olga Gonçalves de CARVALHO, Maria Aparecida T. M. de ALMEIDA e
Emiko MURAMOTO

IPEN - PUB - 277

PUBLICAÇÃO IPEN 277

OUTUBRO/1989

SÃO PAULO

1989

PUBLICAÇÃO IPEN 277

OUTUBRO/1989

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO DO SULFATO DE GENTAMICINA
COM ^{99m}Tc . DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA**

**Olga Gonçalves de CARVALHO, Maria Aparecida T. M. de ALMEIDA e
Emiko MURAMOTO**

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

CNEN/SP

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13.30

**ANTIBIOTICS
LABELLING**

IPEN - Doc - 3460

Aprovado para publicação em 29/08/89

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO DO SULFATO DE GENTAMICINA COM ^{99m}Tc .
DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA *

Olga Gonçalves de CARVALHO, Maria Aparecida T.M. de ALMEIDA,
Emiko MURAMOTO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

Sulfato de Gentamicina é um antibiótico do tipo aminoglicosídeo usado especialmente contra as infecções causadas por bactérias Gram-Negativas, e que apresenta a ototoxicidade com efeito colateral mais grave. As condições de marcação de sulfato de gentamicina com ^{99m}Tc , a partir de pertecnetato de sódio eluído de um gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc foram estabelecidas quanto à massa do antibiótico, do redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tempo de reação e pH final de marcação. O rendimento de marcação foi calculado por análise cromatográfica, tipo ascendente, tendo sido utilizados como solventes: metiletilcetona e solução de NaCl 0,9%. Do estudo de captação biológica do sulfato de gentamicina- ^{99m}Tc por grama de 8 órgãos e tecidos em ratos da linhagem Wistar, observou-se para uma dose de 0,3 mg de gentamicina- ^{99m}Tc injetada via endovenosa, uma maior afinidade dos rins pela droga, sendo este, o órgão excretor principal do produto.

(*) Trabalho a ser apresentado no "XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedad de Biología Y Medicina Nuclear" - ALASBIMN - Santiago - Chile, de 08 a 11 de Outubro de 1989.
Parte da Tese de Doutorado de Olga Gonçalves de Carvalho, defendida no IPEN-CNEN/SP - 1989

STUDIES OF LABELLING CONDITIONS FOR GENTAMICIN WITH ^{99m}Tc .
BIOLOGICAL UPTAKE *

Olga Gonçalves de CARVALHO, Maria Aparecida T.M. de ALMEIDA,
Emiko MURAMOTO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pirheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

ABSTRACT

Gentamicin sulphate is an aminoglycoside antibiotic type specifically used for treatment of infections produced by Gram-negative bacteria but on the hand it presents ototoxic reactions as a serious side effect. The optimal labelling conditions of gentamicin sulphate with ^{99m}Tc , using sodium pertechnetate solutions eluted from a $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$ generator, were established by testing different masses of antibiotic and reducing agent ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), and also different reaction times and final labelling pH. The labelling yields were determined through ascending type chromatographic analysis using methylacetone and 0,9% NaCl solution as solvents. From the studies of the biological uptake of ^{99m}Tc gentamicin sulphate per gram of eight different organs and tissues from Wistar rats, it was shown that for a dose of 0,3 mg of ^{99m}Tc -gentamicin intravenously administered. The kidneys, presented the greatest affinity for the drug, being thus the main excretory organs of the product.

(*) Paper to be presented at XI Congreso de La Asociación Latinoamericana de Sociedad de Biología y Medicina Nuclear - ALASBIMN, held in Santiago - Chile, Oct. 08 - 11, 1989.

This work is part of the thesis for the obtention of the philosopher doctor title of Olga Gonçalves de Carvalho, presented in IPEN-CNEN-SP. - 1989.

1. INTRODUÇÃO

O sulfato de gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo derivado de microorganismos actinomicetos do gênero *Micromonospora*, utilizado nas infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas⁽²⁾.

Os objetivos do presente trabalho são:

- a. Otimização das condições de marcação do sulfato de gentamicina com ^{99m}Tc .
- b. Distribuição biológica do sulfato de gentamicina marcado com ^{99m}Tc , em ratos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Sulfato de gentamicina: Procedência Sigma-USA.

^{99m}Tc : Obtido do Gerador IPEN-TEC.

2.1 MÉTODO DE MARCAÇÃO⁽⁴⁾

Uma solução de 37 MBq de pertecnetato de sódio (1 mL), foi adicionado em um frasco tipo penicilina, contendo 10 mg de sulfato de gentamicina dissolvidos em 1 mL de água destilada, em seguida adicionaram-se 0,5 mL de solução de cloreto estânico (0,5 mg/mL em HCl 0,5N).

A solução foi agitada por um minuto e mantida à temperatura ambiente por 30 minutos afim de completar a reação. O volume final foi de 2,5 mL e pH de 1,7.

O rendimento de marcação foi calculado por meio de análise cromatográfica, sistema ascendente, em papel Whatman nº 3 MM e como solventes foram utilizados: solução de NaCl 0,9% e metiletilcetona. Em cada fita de papel de 25x1,5 cm foi semeada a solução do produto marcado. Após o desenvolvimento cromatográfico, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm num total de 15 e as suas atividades avaliadas em contador gama tipo poço Abbot.

O Rf do produto marcado em solução salina foi zero e em metiletilcetona foi 1.

2.2 DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Utilizaram-se 14 grupos de 6 ratos machos para o estudo de captação do sulfato de gentamicina marcado com ^{99m}Tc pelos órgãos, músculo e para avaliação dos níveis plasmáticos.

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com uretana (100mg/100g peso). Prepararam-se amostras com pH ajustado

para o valor 6,5 com solução fisiológica, contendo cada uma 0,075mL de solução gentamicina marcada com ^{99m}Tc (4 mg/mL), com atividades específicas entre 7992 e 11692 KBq/mg, as respectivas doses foram injetadas na artéria dorsal do penis de cada animal.

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca em frascos heparinizados nos seguintes tempos: 3, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 minutos e 2, 3, 4, 6, 16, 20 e 24 horas após injeção. Parte do sangue foi destinado a leitura do hematócrito. O plasma foi obtido por centrifugação (2.500 rpm por 30 minutos), o volume medido e determinada a radioatividade.

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados e retirados os seguintes órgãos: baço, coração, rins, estômago, fígado, pulmão, intestino delgado e grosso, amostra do músculo da pata traseira e parte da cabeça (região auricular).

Os materiais biológicos foram pesados e em seguida contados em contador gama.

Todas as contagens foram efetuadas e calculadas em relação a um padrão contendo exatamente a mesma dose injetada nos animais. Manteve-se a mesma geometria e o tempo de contagem para todas as medidas.

3. RESULTADOS

3.1 Otimização das Condições de Marcação

As Tabelas 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, e 3.1.4 mostram os resultados da porcentagem de marcação quando se variou a massa de gentamicina, o pH, a massa do redutor e o tempo de reação, respectivamente.

A Tabela 3.2 apresenta a distribuição biológica do sulfato de gentamicina em ratos.

TABELA 3.1.1 - VARIAÇÃO DA MASSA DE SULFATO DE GENTAMICINA.

Massa de Sulfato de Gentamicina(mg)	Vol. SnCl_2 (mL) (0,5 mg/mL)	Atividade $^{99m}\text{TcO}_4$ (MBq)	pH Final	Marcação %	
				\bar{x}	δ
05	0,5	37	1,7	96,0	2,5
10	0,5	37	1,7	95,5	2,4
15	0,5	37	1,7	95,4	2,3
20	0,5	37	1,7	96,8	1,0
25	0,5	37	1,7	95,5	1,9

TABELA 3.1.2 - VARIAÇÃO DO pH FINAL DE MARCAÇÃO

Massa de Sulfato de Gentamicina(mg)	Vol. SnCl ₂ (mL) (0,5 mg/mL)	Atividade ^{99m} TcO ₄ (MBq)	pH Final	Marcação %	
				\bar{x}	δ
10	0,5	37	1,3	80,2	5,2
10	0,5	37	1,7	96,4	3,8
10	0,5	37	2,1	48,5	4,8
10	0,5	37	4,0	32,5	1,0
10	0,5	37	4,3	39,1	2,9
10	0,5	37	4,5	25,0	1,2

TABELA 3.1.3 - VARIAÇÃO DE MASSA DO REDUTOR Sn²⁺

Massa de Sulfato de Gentamicina(mg)	pH Final	Atividade ^{99m} TcO ₄ (MBq)	Massa de Redutor SnCl ₂ (mg) (0,5 mg/mL)	Marcação %	
				\bar{x}	δ
10	1,7	37	0,063	75,6	5,5
10	1,7	37	0,125	81,9	0,4
10	1,7	37	0,250	95,9	2,5
10	1,7	37	0,375	83,1	5,5

TABELA 3.1.4 - VARIAÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO

Massa de Sulfato de Gentamicina(mg)	PH Final	Atividade ^{99m} TcO ₄ (MBq)	Volume SnCl ₂ (mL) (0,5 mg/mL)	Tempo de Reação (min)	Marcação %	
					\bar{x}	δ
10	1,7	37	0,5	15	90,5	7,8
10	1,7	37	0,5	30	97,6	1,9
10	1,7	37	0,5	60	98,6	0,6
10	1,7	37	0,5	90	99,0	0,3

TABELA 3.2 - PORCENTAGEM DE RADIOATIVIDADE POR g DE ÓRGÃOS E TECIDOS DE RATOS WISTAR:
 VIA ENDOVENOSA DE SULFATO DE GENTAMICINA ^{99m}Tc: VOLUME INJETADO: 0,075 mL
 CONCENTRAÇÃO RADIOATIVA 7992 - 11692 KBq/mg.

9

Tempo (min)	BAÇO		CORÇÃO		RINS		ESTÔMAGO		PULMÃO		INTESTINO GROSSO		INTESTINO DELGADO		MÚSCULO		CABEÇA		FÍGADO	
	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ	\bar{x}	δ
05	0,31	0,01	0,27	0,03	0,48	0,02	0,33	0,03	0,50	0,01	0,35	0,02	0,37	0,03	0,12	0,01	0,26	0,04	0,44	0,02
10	0,24	0,03	0,22	0,01	0,36	0,02	0,42	0,02	0,44	0,01	0,46	0,04	0,44	0,03	0,21	0,01	0,40	0,02	0,44	0,04
15	0,35	0,01	0,37	0,02	2,54	0,27	0,32	0,02	0,50	0,03	0,28	0,02	0,42	0,01	0,12	0,02	0,30	0,01	0,66	0,04
20	0,36	0,03	0,28	0,01	1,75	0,13	0,33	0,02	0,46	0,02	0,11	0,01	0,30	0,01	0,04	0,00	0,10	0,01	0,55	0,04
30	0,24	0,03	0,29	0,02	2,03	0,61	0,62	0,62	0,43	0,03	0,23	0,01	0,56	0,03	0,12	0,02	0,24	0,01	0,48	0,02
45	0,23	0,01	0,23	0,03	2,50	0,34	0,61	0,03	0,38	0,02	0,29	0,01	0,40	0,03	0,11	0,01	0,37	0,02	0,55	0,04
60	0,26	0,03	0,24	0,03	4,00	0,41	1,05	0,16	0,45	0,02	0,36	0,02	0,35	0,01	0,19	0,02	0,40	0,03	1,02	0,06
90	0,36	0,04	0,26	0,02	4,55	0,22	1,09	0,01	0,38	0,08	0,42	0,04	0,42	0,01	0,09	0,00	0,26	0,04	0,89	0,05
120	0,23	0,02	0,16	0,02	4,95	0,30	1,30	0,02	0,34	0,03	0,28	0,01	0,67	0,02	0,09	0,01	0,19	0,02	0,68	0,01
180	0,36	0,04	0,18	0,02	6,96	0,48	0,38	0,02	0,43	0,02	0,31	0,02	0,43	0,03	0,11	0,02	0,25	0,04	0,74	0,04
240	0,47	0,02	0,17	0,02	6,53	0,62	0,35	0,05	0,44	0,03	0,34	0,01	0,42	0,03	0,06	0,01	0,14	0,03	0,67	0,04
360	0,55	0,03	0,23	0,02	4,66	0,52	0,29	0,03	0,36	0,04	0,34	0,03	0,62	0,02	0,08	0,02	0,14	0,03	0,77	0,02
980	0,13	0,03	0,04	0,00	2,34	0,16	0,24	0,04	0,10	0,01	0,06	0,01	0,09	0,01	0,02	0,01	0,10	0,01	0,39	0,01
1440	0,05	0,01	0,02	0,01	1,65	0,14	0,24	0,01	0,04	0,01	0,03	0,00	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,19	0,02

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos na otimização das condições de marcação do sulfato de gentamicina com ^{99m}Tc , observou-se que:

- a. não houve variação apreciável na porcentagem de marcação, para o aumento da massa do sulfato de gentamicina. (Tabela 3.1.1)
- b. para um pH final de valor 1,7 obtivemos a melhor porcentagem de marcação. (Tabela 3.1.2)
- c. para uma massa de redutor de 0,25 mg de cloreto estanoso obtivemos a mais alta porcentagem de marcação. (Tabela 3.1.3)
- d. não há variação sensível na porcentagem de marcação com o aumento do tempo de reação, todas as variações encontram-se dentro do erro estatístico. (Tabela 3.1.4)

Portanto as melhores condições encontradas na marcação do sulfato de gentamicina com ^{99m}Tc foram:

- a. Massa de sulfato de gentamicina = 10 mg
- b. pH final de marcação = 1,7
- c. Massa de Redutor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,25 mg
- d. Volume final de marcação = 2,5 mL
- e. Tempo de reação = 30 minutos

Desta fórmula foi estabelecido o protocolo de marcação.

Analisando-se os dados relativos à captação de sulfato de gentamicina ^{99m}Tc por grama de órgãos e de tecidos, em ratos, (Tabela 3.2), no intervalo de tempo estudado até 24 horas, observou-se que para uma dose de 0,3 mg de gentamicina ^{99m}Tc injetada, os rins representam os órgãos de maior seletividade com captação máxima às 3 horas da dose administrada.

Observa-se ainda uma captação relativamente alta no estômago após 2 horas; isto provavelmente pode ser devido ao Tc na forma iônica não complexada.

Quanto ao efeito colateral ototóxico da gentamicina verificou-se que a captação pela região auricular foi desprezível no intervalo de tempo estudado e nas doses utilizadas. Isso nos leva a deduzir que o acúmulo de antibiótico na região do ouvido interno, provavelmente pode estar relacionada com repetidas doses do antibiótico e com níveis plasmáticos mais elevados. (1,5)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FALCO, F.G.; SMITH, H.M.; ARCIERI, G.M. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. J. Infect. Dis., 119:406-9, 1969.
2. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. As Bases farmacológicas da terapêutica. 7. ed. s.l., Guanabara, 1987. p.754.
3. LUFT, F.C. & KLEIT, S.A. Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. J. Infect. Dis., 130(6):656-9 1974.
4. ÖZKER, K. & URGANCIÖGLU, I. ^{99m}Tc-Gentamicin: chemical and biological evaluation. Eur. J. Nucl. Med., 6:173-6, 1981.
5. WERSALL, J.; LUNDQUIST, P.-G.; BJÖRKROTH, B. Ototoxicity of gentamicin. J. Infect. Dis., 119:411-6, 1969.