



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**SÍNTESE DO COMPOSTO TETRAFLUORBORATO DE
COBRE (I) TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL ISONITRILA) -
(Cu[MIBI]₄BF₄): SUBSTRATO UTILIZADO NA PRODUÇÃO
DO RADIOFÁRMACO SESTAMIBI-^{99m}Tc**

KATIA SUZI DA SILVEIRA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo
2005**

**SÍNTESE DO COMPOSTO TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I)
TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL ISONITRILA)-(Cu[MIBI]₄BF₄):
SUBSTRATO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO RADIOFÁRMACO
SESTAMIBI-^{99m}Tc**

KATIA SUZI DA SILVEIRA SILVA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo

2005

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) nas pessoas do Superintendente Dr. Claudio Rodrigues e ao corpo docente e pesquisadores.
- ❖ À Dra. Constanca Pagano Gonçalves da Silva, Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade concedida.
- ❖ À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, pela orientação, apoio e sugestões durante o decorrer desta dissertação.
- ❖ À Dra. Emiko Muramoto, pelo apoio e colaboração fornecida na realização da distribuição biológica do produto e sugestões dadas na fase de dissertação deste trabalho.
- ❖ Ao Sr. Wagner Nieto, pelo apoio na montagem dos “aparatos” da síntese e desenvolvimento do sistema de vácuo.
- ❖ Ao Dr. Leoberto C.Tavares e Vanderson Galan, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração fornecida .
- ❖ Ao Dr Jorge Cruz Arencibia, do Centis (Centro de Isótopos)-Cuba, pelos conhecimentos técnicos compartilhados.
- ❖ Aos pesquisadores, técnicos e secretárias do Centro de Radiofarmácia que apoiaram durante a realização deste trabalho.
- ❖ Ao Centro de Medicina Nuclear, na pessoa de Miriam Roseli Yoshie Okamoto, pela colaboração prestada na realização das imagens cintilográficas deste trabalho.
- ❖ Aos colaboradores e, acima de tudo, amigos: Edson Vieira Alves, Bluma L. Faintuch, Eliane Aldegheri, Josefina Silva, Tatiana Lavinias, Maria Teresa Colturato, Katiane S.Silveira.
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes, pelo fornecimento da bolsa- auxílio concedida durante o tempo do projeto.

RESUMO

**SÍNTESE DO COMPOSTO
TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I) TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL
ISONITRILA)-(Cu[MIBI]₄BF₄): SUBSTRATO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO
RADIOFÁRMACO SESTAMIBI-^{99m}Tc**

Katia Suzi da Silveira Silva

RESUMO

O radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc apresenta interesse e aplicação na rotina clínica em Medicina Nuclear, especialmente para avaliação da função do miocárdio, além de aplicação no diagnóstico diferencial de alguns tipos de tumores e o Centro de Radiofarmácia do IPEN possui interesse no desenvolvimento deste radiofármaco para atendimento das necessidades da classe médica nuclear.

Neste trabalho foi demonstrada a síntese e caracterização do composto ativo tetrafluoroborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila)-(Cu[MIBI]₄BF₄), visando o preparo de reativos liofilizados para marcação com tecnécio-99m e realização de estudos de marcação e distribuição biológica do composto.

A síntese do composto Cu[MIBI]₄BF₄ foi realizada de acordo com procedimento descrito por diversos autores em 5 etapas e os compostos caracterizados por Infravermelho, Ressonância Nuclear Magnética, Ponto de Fusão e Cromatografia em Camada Delgada. A caracterização do sal quelato de MIBI - (Cu[MIBI]₄BF₄) foi realizada utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e os resultados foram comparados com uma amostra padrão do produto, apresentando resultados similares, conforme descrito em literatura.

Os reagentes liofilizados foram preparados e marcados com tecnécio-99m, tendo sido obtida a pureza radioquímica acima de 97%, mantendo-se estável em armazenamento. Nos resultados de distribuição biológica em diferentes animais foram observadas boas captações pelo coração, em tempo adequado para aquisição de imagens cintilográficas, demonstrando a aplicabilidade do reagente sintetizado na obtenção de imagens cintilográficas cardíacas.

ABSTRACT

**SYNTHESIS OF THE COMPOUND TETRAKIS (2- METHOXY ISOBUTYL
ISONITRILE) COPPER (I) TETRAFLUORBORATE -(Cu[MIBI]₄BF₄):
SUBSTANCE USED IN THE PRODUCTION OF THE
RADIOPHARMACEUTICAL SESTAMIBI-^{99m}Tc**

Katia Suzi da Silveira Silva

ABSTRACT

The radiopharmaceutical SESTAMIBI-^{99m}Tc presents interest and application in the clinical routine in Nuclear Medicine, especially for evaluation of the myocardium function and in the diagnosis of some tumors types, and the Center of Radiopharmacy of the IPEN has interest in the development of this radiopharmaceutical for attendance of the nuclear medicine class necessities.

In this work it was demonstrated the synthesis and characterization of the active compound tetrakis (2- methoxy isobutyl isonitrile) copper (I) tetrafluoroborate - Cu[MIBI]₄BF₄- to be used in the preparation of lyophilized reagents for labeling with technetium-99m as well as labeling studies and biological distribution.

The synthesis of the reagent Cu[MIBI]₄BF₄ was carried out in accordance with previously described procedures, in 5 steps and the compounds were characterized for Infra-red, Magnetic Nuclear Resonance, Melting Point and Thin Layer Chromatography. The characterization of the chelate of MIBI -Cu[MIBI]₄BF₄ - was carried out using High Performance Liquid Chromatography, compared with a standard sample of the product and presented similar results, as described in literature.

The lyophilized reagent was prepared and labeled with technetium-99m, showing high radiochemical purity, higher than 97%, with high stability. Biological distribution in different animals showed good uptake in the heart, in time compatible with the acquisition of scintigraphy images, demonstrating the applicability of the reagent synthesized in the attainment of cardiac scintigraphy images.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A radiação proveniente da desintegração dos radionuclídeos é largamente empregadas em ciências da saúde com a finalidade de diagnóstico e terapia de doenças, assim como no desenvolvimento de modelos experimentais em pesquisa. Esses isótopos radioativos podem ser artificiais ou naturais. Os naturais existem na natureza sem a intervenção do ser humano, enquanto os artificiais são representados pelos radionuclídeos produzidos em reatores nucleares ou máquinas aceleradoras de partículas (ciclotrons).

O uso dessas fontes está restrito aos laboratórios, nos quais os profissionais que neles trabalham, possuem experiência e qualificação para manipulação dessas fontes, sendo devidamente credenciados pela Comissão Nacional de Energia Nuclear. Inúmeros radionuclídeos são utilizados rotineiramente em todos os serviços de medicina nuclear, sendo que o critério de escolha depende do procedimento clínico a ser executado, diagnóstico ou terapia. De acordo com o procedimento, a seleção do isótopo radioativo depende de suas características físicas, como o tipo de emissão radioativa, a meia-vida e a energia da radiação emitida. Esses radionuclídeos estão normalmente ligados a uma estrutura mais complexa, molecular, particulada ou celular, sendo o conjunto denominado de radiofármaco ^(1,2). Os radiofármacos são submetidos a controles de qualidade, tais como o de apirogenicidade, esterilidade, dentre outros, que permitem que eles possam ser administrados a seres humanos ^(2,3,4).

Os radionuclídeos usados em diagnóstico em medicina nuclear são preferencialmente emissores de radiação gama, uma vez que essas radiações apresentam baixa taxa de transferência de energia e são facilmente detectadas externamente ao corpo humano quando ocorre a administração do radiofármaco ⁽⁵⁾. Preferencialmente são usados os isômeros nucleares e os radionuclídeos que realizam o fenômeno de captura eletrônica, também conhecido como captura K. Desse modo, os radiofármacos marcados com tecnécio-99m, iodo-123, índio-111, gálio-67 e tálio-201 estão largamente presentes na prática médica ^(3, 4).

Além dos radioisótopos emissores de energia gama, os emissores de pósitrons são também utilizados em procedimentos diagnósticos. No primeiro caso, as imagens são adquiridas em tomógrafos para emissão de fótons,

conhecidos em inglês pela sigla SPECT (“Single Photon Emission Computer Tomography”) e no segundo caso, são detectados em tomógrafos para emissão de pósitrons denominados PET (“Positron Emission Tomography”) ⁽⁶⁾.

1.1 RADIOISÓTOPO TECNÉCIO-99m

1.1.1 Histórico

Uma vez que o tempo de meia-vida do isótopo mais estável de tecnécio é curto na escala de tempo geológica, o tecnécio não é um elemento particularmente abundante. Indicado como o elemento 43 na tabela periódica, logo abaixo do manganês, algumas das suas propriedades foram previstas por Mendeleev em 1869 o qual chamou-o, então, de ekamanganês e lhe deu o símbolo Em. Embora Noddack e Tacke afirmem ter isolado o elemento 43 em 1925, os créditos da descoberta são atribuídos a Perrier e Ségre, em 1937. Estes produziram quantidades mensuráveis a partir de reações de transmutação de dêuterons e prótons com molibdênio. Depois da Segunda Guerra Mundial, Perrier e Ségre deram ao elemento 43 o nome de tecnécio a partir do grego technetos (artificial) já que se tratava do primeiro elemento artificial produzido pelo homem ^(4, 6,7,8).

Na década de 60, os isótopos radioativos de iodo predominavam nos exames de diagnóstico, enquanto que a partir dos anos 70, o ^{99m}Tc passou a predominar nos exames de medicina nuclear como demonstrado em 1996 por estudos realizados nos Estados Unidos da América do Norte ⁽⁶⁾.

Um levantamento recente realizado em serviços de medicina nuclear nos EUA demonstrou que os procedimentos que utilizam o elemento tecnécio-99m representam cerca de 90 % dos realizados em medicina nuclear. O mesmo estudo comprova a importância dos estudos diagnósticos em cardiologia.

Nos EUA, 58 % dos procedimentos diagnósticos são destinados à cardiologia. Não existem levantamentos oficiais no Brasil. Sabe-se, entretanto, que a importância do tecnécio-99m na medicina nuclear diagnóstica é incontestável ⁽⁹⁾.

A sua aceitação como o radionuclídeo de escolha para inúmeros procedimentos nessa especialidade médica deve-se a algumas de suas

características, tais como: tempo de meia-vida de 6 horas, decaimento por transição isomérica a ^{99}Tc de 99,9%, correspondendo à emissão gama (γ) de 140 keV. É obtido por meio de gerador molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) a um custo relativamente baixo comparado a outros radioisótopos e suas reações radioquímicas possibilitam a marcação de várias moléculas ^(4,10).

1.1.2 Características químicas e obtenção

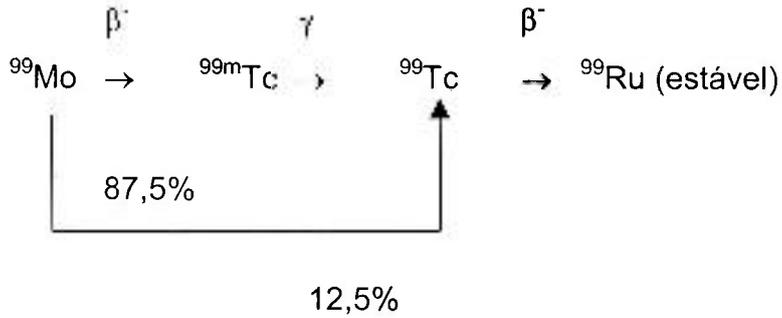
O isótopo de tecnécio utilizado em medicina nuclear é o tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). A química do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é semelhante a dos elementos de transição vizinhos, manganês e rênio. O tecnécio dá origem a uma multiplicidade de estados de oxidação e forma complexos de coordenação com uma variedade de ligantes orgânicos e inorgânicos ^(11,12).

Muitos dos compostos de tecnécio termodinamicamente estáveis têm oxigênio ligado ao metal (TcO_4^- , $\text{TcO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, TcOL , etc.). Em solução aquosa, o estados de oxidação mais estáveis são: +7 (TcO_4^-) e +4 (TcO_2) ^(4, 7,11).

A larga aceitação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ deve-se a uma série de propriedades vantajosas desse radionuclídeo, a começar pela facilidade de obtenção utilizando-se sistema gerador, que pode ser facilmente transportado e serve como fonte de radionuclídeo em instituições distantes do local onde foi produzido. Entre os sistemas geradores de radionuclídeos, alguns têm grande relevância em medicina nuclear além do molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), tais como o sistema estrôncio-90/ítrio-90 e tungstênio-188/rênio-188 ^(1,2,3,13,14).

O esquema a seguir representa o decaimento do ^{99}Mo , que pode ser obtido por reação (η , γ) a partir do ^{98}Mo , ou ainda a partir da fissão do ^{235}U .

Amostras de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ são obtidas a partir da eluição de geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A concentração de pertecnetato obtida por eluição de um gerador varia de 10^{-6} a 10^{-9}M .



${}^{99}\text{Mo} = 66$ horas (tempo de meia vida físico)

${}^{99\text{m}}\text{Tc} = 6,02$ horas

${}^{99}\text{Tc} = 2 \times 10^5$ anos

No gerador de ${}^{99}\text{Mo}/{}^{99\text{m}}\text{Tc}$, o molibdato (${}^{99}\text{MoO}_4$) é adsorvido em uma coluna de alumina colocada em contentor portátil com escudo de chumbo (figura 1). No dia de utilização, o ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$, na forma de pertechnetato (TcO_4^-), é eluido do gerador com solução salina. Na maioria dos radiofármacos, as soluções de pertechnetato são simplesmente injetadas em frascos contendo uma mistura liofilizada de agente redutor, o ligante complexante e algum estabilizador antioxidante originando complexos com diferentes aplicações clínicas, dependendo da natureza do ligante (12, 13).

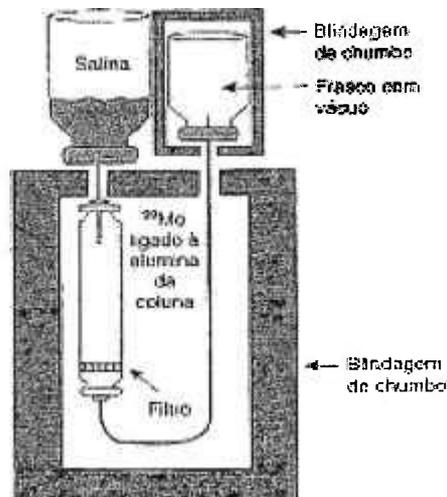


Figura 1: Esquema de um gerador de Tecnécio-99m

O pertecnetato (TcO_4^-) é o íon que o Tc tem o maior estado de oxidação possível. Ele não pode ligar-se diretamente a nenhum ligante. Agentes redutores são utilizados para transformar o estado de oxidação +7 do tecnécio em estados de oxidação menores, sendo o mais utilizado o cloreto estano (SnCl₂) (2,4,7,11).

Durante a redução, a presença do ligante estabiliza o tecnécio em seu estado de oxidação mais baixo; caso contrário, TcO₂ é formado como subproduto (2,4,7,11).

Pode haver um ou mais produtos resultantes dependendo do tipo de ligante, quando o tecnécio é reduzido. Um ligante pode ser um ânion inorgânico ou uma molécula orgânica contendo átomos doadores de elétrons para o átomo de tecnécio. Moléculas contendo átomos de oxigênio, enxofre ou nitrogênio geralmente servem como átomos de coordenação (2,4,7,8,11).

A estabilidade do complexo é fator preponderante para o sucesso do radiotraçador *in vivo*, porque se o ^{99m}Tc se desligar do complexo e se reoxidar, a biodistribuição da radiação correspondente será a do pertecnetato e não a do complexo injetado (15, 16).

A marcação com tecnécio envolve a coordenação de ligantes com peso molecular relativamente baixo para formar pequenos complexos de tecnécio. O comportamento biológico dos complexos de tecnécio é determinado pela molécula como um todo, entretanto, o metal central determina primariamente a estabilidade global do complexo e transmite a distribuição espacial dos ligantes e suas propriedades magnéticas e elétricas. É o ligante que determina as propriedades biológicas do complexo (de acordo com a geometria e carga do complexo) apresentando duas faces: uma dirigida ao metal central (Tc) e outra para o meio biológico, com o qual interage (15,16).

Sendo a massa de Tc presente nas ligações muito pequena, pode-se considerar que o ligante encontra-se presente em excesso e a sua massa é preponderante para o sucesso da marcação. A pequena massa do complexo de tecnécio resultante limita a sua caracterização. A análise estrutural dos complexos de Tc tem sido realizada utilizando-se o isótopo emissor beta, o ⁹⁹Tc ($t_{1/2} = 2,3 \times 10^5$ anos), que é disponível em quantidades macroscópicas (16,17).

Os métodos clássicos de espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, ultravioleta, análise elementar e cristalografia de raios-X, têm

permitido estabelecer a estrutura química tridimensional dos complexos. Estes dados não só contribuem para o conhecimento da reatividade química dos complexos como permitem estudar com mais detalhes o metabolismo ou toxicidade dos radiotraçadores de uso clínico, além de possibilitar a consideração da relação entre estrutura química e atividade biológica ^(16,17).

A associação entre radiotraçadores ou ^{99m}Tc com diferentes ligantes químicos formam complexos com coordenação que podem variar de 4 a 10. As características de lipofilicidade, caráter iônico e estérico dos complexos determinarão sua distribuição biológica ^(7,12).

Os complexos de Tc(I) são muito estáveis quando os seis sítios de coordenação são ocupados. A formação de tais complexos é favorecida sob as condições empregadas na síntese de radiofármacos de ^{99m}Tc sem carregadores, porque o excesso de ligantes induz a completa coordenação em torno do metal e mantém as condições redutoras ^(10,11,12,13).

A estabilidade do complexo é fator preponderante para o sucesso do radiotraçador *in vivo* ^(10,11,12,13).

1.2 AGENTES MIOCÁRDICOS

As enfermidades cardíacas constituem, na atualidade, uma das principais causas de morte em vários países. O resultado do tratamento destes pacientes, em grande parte, depende da detecção precoce da afecção e um correto seguimento durante a etapa terapêutica.

Os problemas coronários constituem uma das causas fundamentais que conduzem às afecções cardíacas, pois originam redução ou perda da perfusão sangüínea e, portanto, da oxigenação e aporte de nutrientes ao miocárdio, provocando disfunção do músculo cardíaco com defeitos na motilidade e diminuição da vazão cardíaca. Isto incrementa a hipóxia no miocárdio e extremidades a qual se manifesta com dor ou angina ^(4,18,19).

Uma avaliação cardiológica completa inclui estudos angiográficos, de perfusão sangüínea, metabólicos, localização e determinação da extensão de um infarto do miocárdio.

Um radiofármaco ideal para estudos do miocárdio deve apresentar (10,18, 20) .

- a) Características ótimas do radionuclídeo;
- b) Acúmulo alto e rápido no músculo cardíaco;
- c) Rápido clareamento sangüíneo e baixo nível de atividade em pulmões e fígado;
- d) Captação pelo miocárdio diretamente proporcional ao fluxo sangüíneo e à depuração cardíaca lenta, de modo que permita a realização de tomadas seqüenciais.

1.2.1 Histórico

Desde 1973, quando o ^{201}Tl foi produzido pela primeira vez, na forma de cloreto de tálio, este se tornou muito importante na Medicina Nuclear cardiovascular, pela sua aplicação nos estudos não invasivos de esforço e repouso, para avaliação do fluxo sangüíneo regional e distribuição entre miocárdio isquêmico e infartado (21).

Entretanto, o uso do $^{201}\text{TlCl}$ apresenta uma série de inconvenientes tais como tempo de meia-vida longo (73 horas), fóton gama de baixa energia (70-80 keV), requerendo a administração de altas doses. Além disto, seu custo é elevado, relacionado ao processo de produção em ciclotron e à baixa disponibilidade do composto (7,10 12,13).

Em função destas desvantagens apresentadas por este radionuclídeo, os esforços se concentraram no desenvolvimento de novos agentes marcados com o radionuclídeo tecnécio-99m que pudessem imitar as propriedades biológicas do cloreto de tálio (21).

Foram sintetizados numerosos complexos de tecnécio-99m, todos lipofílicos e com carga monopositiva obtendo-se, em muitos casos, a captação pelo miocárdio em algumas espécies animais, mas sem sucesso em humanos (22, 23,24).

Entre estes compostos, estão os complexos que utilizaram como ligantes os derivados de fosfinas e arsinas tendo como átomo central o Tc em estados de oxidação III e V (23,24.). Estes complexos mostraram-se favoráveis em

distribuição miocárdica canina, mas não foi demonstrado comportamento análogo em humanos ⁽²⁴⁾.

Posteriormente, as aplicações de complexos catiônicos monovalentes de isonitrilas $[Tc(CN-R)_6]$ se caracterizaram na obtenção de imagens cardíacas para localização de infartos do miocárdio, demonstrando oclusão coronária, anormalidade na perfusão e determinação da função ventricular e do fluxo sanguíneo regional miocárdico ^(25, 26,27)

1.2.2 Características químicas dos compostos isonitrilas

As isonitrilas ou nitrilas isômeras também chamadas carbilaminas foram descobertas por Gautier em 1866. São compostos orgânicos derivados do isocianeto de hidrogênio $[H-N=C:]$ ácido isocianídrico em solução aquosa], pela substituição do átomo de hidrogênio por radical orgânico monovalente alquila ou arila. A união nitrogênio- carbono é de natureza mista covalente coordenada e o carbono terminal atua como um aceptor do par de elétrons do nitrogênio. A isonitrila é um dos poucos ligantes, cujo átomo de carbono bivalente tem um par de elétrons separados e por isso são semelhantes à estrutura do monóxido de carbono ^(28,29,30) (figura 2).

FÓRMULA GERAL:	GRUPO SUBSTITUINTE
$R - NC \longrightarrow R - N \equiv C$	$- NC \longrightarrow - N \equiv C$
Sendo -R radical orgânico	grupo isonitrila

Figura 2– Grupos isonitrila

Nas alquilas, a valência livre está presa ao carbono saturado $(R-N \equiv C:$ ou $R-N^+ \equiv C^-)$ e nas arilas a valência livre está presa diretamente ao núcleo benzênico ^(28,29).

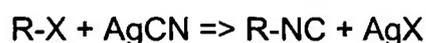
Os alquil derivados ou alquil-isonitrila e arilisonitrilas são líquidos incolores de odor repelente, pouco solúveis em água e, por aquecimento quase sempre se isomerizam em nitrilas correspondentes $(R - N \equiv C: \rightarrow R - C \equiv N:)$. As

isonitrilas são mais reativas do que as nitrilas e menos estáveis do que estas (28,29).

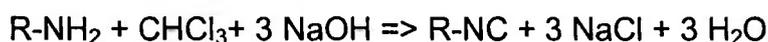
Os ácidos minerais diluídos hidrolisam as isonitrilas em amina primária e ácido fórmico (31, 32).

As isonitrilas podem ser obtidas por (31,32,33).

a) Reação de haletos com cianeto de prata segundo a reação :

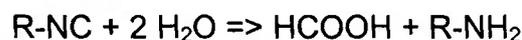


b) Reação de aminas primárias (aminas secundárias e terciárias não produzem esta reação) com clorofórmio, em meio fortemente básico:



As reações mais importantes das isonitrilas são:

a) Hidrólise (origina ácidos carboxílicos e aminas):

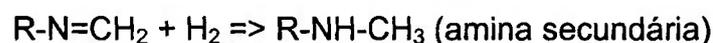


Com base na reação de hidrólise das isonitrilas em meio ácido, o armazenamento de complexos contendo como ligante uma isonitrila deve ser adequado de modo a proteger o produto de contato como o meio aquoso e ácido para evitar sua decomposição.

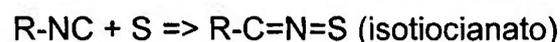
b) Reação com composto de Grignard (produz aldeídos e aminas):



c) Redução (produz aminas secundárias):



d) Reações de adição:



1.2.3 Complexos de isonitrila - ^{99m}Tc aplicados em estudos cardiológicos

Os complexos isonitrilas de ^{99m}Tc no estado de oxidação +1 são estruturas octaédricas com 6 ligantes isonitrilas ligados pelo carbono ao tecnécio. O grupo R de cada ligante (figura 3) pode ser variado, produzindo mudanças no tipo e tamanho da esfera de coordenação interna do complexo de tecnécio resultante, o que pode ocasionar alterações de densidade e lipofilicidade, com conseqüente alteração das propriedades biológicas do composto (34).

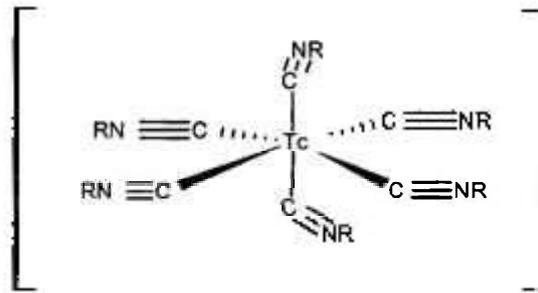


Figura 3 - Estrutura do complexo isonitrila-^{99m}Tc

Deutsch e colaboradores, manifestaram a importância do estado de oxidação do complexo (deve ser de +1) para que o composto seja captado pelo miocárdio já que, do contrário, a carga total do complexo será afetada pelos sistemas redox biológicos. Isto explica a ausência de acúmulo no miocárdio quando se administram em humanos complexos com estado de oxidação diferente ⁽³⁵⁾.

Foram desenvolvidos complexos monocatiônicos de hexaquis isonitrila tecnécio (I) para estudo de perfusão do miocárdio, em substituição ao ²⁰¹Tl⁺¹ ⁽³⁰⁾. Três isonitrilas desenvolvidas apresentaram resultados clínicos interessantes: tércio butil isonitrila (TBI), carboxi isopropil isonitrila (CPI) e 2-metoxi isobutil isonitrila (MIBI) ^(21,14, 36, 37).

Dos complexos catiônicos derivados de isonitrila, o primeiro ensaiado clinicamente foi o (TBI)₆^{-99m}Tc, desenvolvido por Davison e Jones ^(15,16). Este cátion exibe várias características favoráveis incluindo depuração sanguínea rápida, baixa ligação às proteínas plasmáticas e um fenômeno de redistribuição precoce que pode ser útil para distinguir entre isquemia e infarto, eliminação miocárdica mínima e uma razão coração/pulmão aceitável em 1 hora após a injeção. Entretanto, a persistente e alta captação hepática mascara o ápice cardíaco e este fenômeno é uma deficiência séria que limitou o uso deste composto na rotina clínica ⁽¹⁵⁾.

Para diminuir a atividade hepática associada ao (TBI)₆^{-99m}Tc, Jones e Davison ⁽³⁸⁾ desenvolveram um derivado relativamente próximo, o (CPI)₆^{-99m}Tc, que contém um éster hidrolisável. Este derivado exibe uma eliminação sanguínea rápida característica dos complexos de isonitrilas e também sofre eliminação rápida do pulmão e fígado. Porém, há duas formas nas quais a biodistribuição deste agente difere significativamente do análogo TBI:

- a) não há redistribuição miocárdica precoce após esforço;
- b) há uma eliminação relativamente rápida do miocárdio devido, provavelmente, ao metabolismo cardíaco do éster hidrolisável, permitindo que injeções repetidas sejam feitas dentro de um período de 3-4 horas.

O agente CPI poderia ser útil nas aplicações de rotina clínica, mas os grupos de éster hidrolisáveis tornaram-no difícil para a formulação de um radiofármaco com estabilidade aceitável⁽¹⁶⁾.

Complexos de ^{99m}Tc de TBI e CPI foram os primeiros compostos de isonitrila que apresentaram algumas características clínicas promissoras. Entretanto, ambos os agentes apresentaram baixa taxa de atividade miocárdio/radiação de fundo⁽¹⁷⁾.

Para contornar as desvantagens apresentadas por estes dois complexos, foi desenvolvido na classe dos compostos de isonitrila, o composto 2-metoxi isobutil isonitrila (MIBI) que marcado com ^{99m}Tc origina o complexo, hexaquis 2-metoxi isobutil isonitrila-^{99m}Tc (SESTAMIBI-^{99m}Tc ou (MIBI)₆-^{99m}Tc)⁽³⁹⁾.

O SESTAMIBI - ^{99m}Tc demonstrou ser o mais completo da série, com rápida captação pelo miocárdio, mantendo a concentração da atividade relativamente constante no tempo, rápida e completa depuração sangüínea, atividade pulmonar desprezível, permitindo a aquisição prévia de imagens e menor concentração no fígado, em comparação com os outros derivados. Ele foi comercializado como Cardiolite® pela DuPont Pharma .

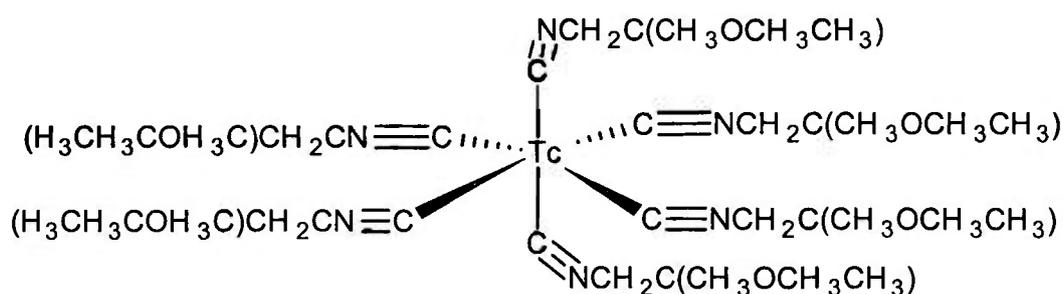


Figura 4- Estrutura do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc

O MIBI forma com o tecnécio um complexo de carga +1, coordenado com seis grupos de isonitrila (figura 4). Utilizado para detecção de anormalidades na perfusão do miocárdio, particularmente para localização de infarto do miocárdio. Também é útil na determinação da função do miocárdio usando a técnica de ventriculografia radionuclídica de primeira passagem ^(19,40, 41).

O SESTAMIBI-^{99m}Tc é um complexo catiônico, lipofílico, que é captado pelos miócitos na proporção do fluxo sanguíneo do miocárdio. A captação miocárdica regional de um traçador difusível é dependente do fluxo regional e da extração do miocárdio. A proporção da atividade do traçador para o fluxo sanguíneo do miocárdio decai quando as taxas de fluxo são mais altas, o que ocorre durante hiperemia reativa ou vasodilatação farmacológica, provavelmente em função da diminuição da eficiência de extração ⁽⁴²⁾.

Aproximadamente 90% do SESTAMIBI-^{99m}Tc intracelular está associado com a mitocôndria como um complexo catiônico livre ^(39,42).

O fato da depuração miocárdica do SESTAMIBI-^{99m}Tc ser mais lenta que do ²⁰¹TlCl, obriga a empregar-se, geralmente, injeções em situação de repouso e esforço separadamente. Imagens obtidas com SESTAMIBI-^{99m}Tc em série apresentam importante papel na avaliação clínica da viabilidade miocárdica após o infarto ^(13,17,18).

A permeabilidade capilar do miocárdio para o ²⁰¹TlCl é maior que para o SESTAMIBI-^{99m}Tc, mas a permeabilidade do parênquima celular e o volume de distribuição do SESTAMIBI-^{99m}Tc são muito maiores que o do ²⁰¹TlCl, resultando em um tempo de residência maior no miocárdio para o SESTAMIBI-^{99m}Tc. A causa destas diferenças no transporte miocelular dos dois radiofármacos é devida a pequenas diferenças observadas no acúmulo inicial no miocárdio dos dois agentes, apesar do SESTAMIBI-^{99m}Tc demonstrar depuração miocárdica mais lenta que o ²⁰¹TlCl ^(13,17,18).

O radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc não é puramente um traçador de fluxo e não é retido em áreas necróticas. Desta forma, o complexo, assim como o ²⁰¹TlCl é um marcador da viabilidade miocárdica. Em presença de necrose, a distribuição miocárdica do SESTAMIBI-^{99m}Tc é criticamente dependente do momento em que a injeção é realizada em relação a reperfusão e de quando a imagem é realizada em relação à injeção do traçador ^(13,17,18).

Imagens tomográficas de repouso utilizando SESTAMIBI-^{99m}Tc permitem o diagnóstico não invasivo quantitativo do tamanho e localização do infarto. O tamanho da área infartada determinada com o radiofármaco correlaciona-se com a função ventricular esquerda e tem importante valor prognóstico ^(13,17,18,)

Desta forma, o radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc apresenta interesse e aplicação na rotina clínica em Medicina Nuclear, especialmente para avaliação da função do miocárdio, em substituição ao radiofármaco ²⁰¹TlCl, além de aplicação no diagnóstico diferencial de alguns tipos de tumores.

1.2.4 Outras Aplicações do SESTAMIBI-^{99m}Tc

Além da aplicabilidade em estudos cardíacos, o uso do SESTAMIBI-^{99m}Tc, à semelhança do ²⁰¹TlCl, também tem sido relatado em estudos de diferenciação entre lesões benignas e malignas, para diferentes tipos de tumores ^(43, 44, 45, 46). As vantagens da molécula marcada com ^{99m}Tc é que, além da meia-vida curta que permite o uso de altas doses do radiofármaco, também propicia imagens nítidas, em tempos curtos e sequenciais ^(47, 48).

Conforme descrito em literatura, o SESTAMIBI-^{99m}Tc tem sido usado para detecção de tumores/lesões nas mamas de até 4 mm, para avaliar lesões mamárias com imagens de alta resolução para lesões maiores que 1,5 cm de tamanho e distinguir tumores mamários benignos dos malignos com sensibilidade de 70-96% e especificidade de 71- 100% ^(49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60).

Existem relatos do uso do SESTAMIBI-^{99m}Tc para avaliar metástase de câncer de tireóide em pacientes de alto risco que apresentam nível elevado de tireoglobulina e radioiodeto negativo, em pacientes com células de Hunthle ou carcinoma medular ^(58,59,60) e em prognóstico de resposta para terapias em osteosarcomas ⁽⁴⁸⁾.

O uso do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc também tem sido relatado em estudos clínicos preliminares como agente de imagem para tumor cerebral. Os resultados com o uso de ²⁰¹TlCl e SESTAMIBI-^{99m}Tc em tumores cerebrais em crianças foram similares para astrocitomas, que puderam ser claramente identificados. Tumores como meduloblastomas, gliomas e disgerminomas não apresentaram avidéz pelos radiofármacos ⁽⁶¹⁾.

A síntese do sal de MIBI, $\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4$, utilizado na produção do reagente liofilizado para pronta marcação com Tc representa economia substancial, quando considerada a necessidade de importação deste insumo.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Para elaboração dos reagentes liofilizados de MIBI pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN, ocorre a necessidade primeira de sintetizar-se o sal de MIBI $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4]$, de modo a viabilizar os custos de produção do reagente liofilizado.

Tendo em vista que, o reagente liofilizado de MIBI para marcação com tecnécio-99m somente pode ser adquirido no mercado, de empresa internacional, sendo oferecido a um custo alto e o interesse no desenvolvimento deste radiofármaco para atendimento das necessidades da classe médica nuclear na utilização do SESTAMIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na rotina clínica, especialmente para avaliação da função do miocárdio, em substituição ao radiofármaco $^{201}\text{TlCl}$, além de aplicação no diagnóstico diferencial de alguns tipos de tumores, nosso objetivo consistiu em:

- Promover a síntese e caracterização do composto tetrafluorborato de cobre(I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)- $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4]$ e avaliar sua utilização na formulação de reagentes liofilizados para pronta marcação com tecnécio-99m.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e Soluções

- 3-cloro-2-metil-1-propeno, grau de pureza 98 %, Merck;
- Acetato de etila, grau HPLC, Merck;
- Acetato de mercúrio II, grau de pureza p.a., Merck;
- Acetato de sódio, grau de pureza p.a., Merck;
- Acetonitrila, grau de pureza p.a., Merck;
- Acetonitrila, grau de pureza de 99,9%, Mallinckrodt;
- Ácido acético, grau de pureza p.a., Merck;
- Ácido acético glacial, 99,9%, Merck;
- Ácido bórico, grau de pureza p.a., Merck;
- Ácido Clorídrico 37%, grau de pureza p.a., Merck;
- Ácido fluorobórico à 50%, grau de pureza p.a, Fluka;
- Benzeno , grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Borohidreto de sódio, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Cloreto de cálcio anidro, grau de pureza 99,8 %, Merck;
- Cloridrato de L-cisteína monoidratada para bioquímica, Merck;
- Cloroformio anidro grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Clorofórmio, grau de pureza HPLC, Merck., Mallinckrodt;
- Clorofórmio deuterado, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Diclorometano anidro, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- D-manitol, reagente ACS, Sigma-Aldrich;
- Etanol absoluto, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Etanol, grau de pureza p.a., Merck;
- Éter dietílico anidro, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Éter etílico, grau de pureza p.a., Merck;
- Etilformiato, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Ftalimida de potássio, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Hidrato de hidrazina 85%, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Hidróxido de potássio, grau de pureza p.a., Merck;

- Hidróxido de sódio, grau de pureza p.a., Merck;
- Liquemine®, heparina sódica 5.000 UI/ mL, Roche;
- Metanol anidro, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Metanol, grau de pureza p.a., Merck;
- N,N,dimetilformamida (DMF), grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Nitrogênio gasoso seco, White Martins;
- Oxicloreto de fósforo, grau de pureza 99,9 %, Fluka;
- Óxido de cobre I, grau de pureza 98,9 %, Merck;
- Pentóxido de fósforo, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Piridina, grau de pureza p.a., Merck;
- Sílica gel azul (1-3 mm), Merck;
- Solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) obtido de gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (IPEN-TEC);
- Sulfato de amônia, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Sulfato de magnésio anidro, grau de pureza 99,9 %, Merck;
- Tamiz molecular 3 Å, 4 Å e 5 Å (3-5 nm), Merck;
- Tetrahidrofurano (THF), grau de pureza de 99,9%, Merck;
- Trietilamina (TEA), grau de pureza de 99,9%, Merck;

3.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético com placa de aquecimento, Heidolph, Alemanha;
- Agitador mecânico, Hipperquímica, Brasil;
- Aparelho medidor de pH, modelo DMF/NTC, Digimed, Brasil;
- Aparelho para determinação do ponto de fusão tipo capilar, modelo FP5, Mettler, Suíça;
- Aparelho Vortex Genie 2-VWR Scientific Ind.,USA;
- Balança analítica, modelo B6, Mettler, Alemanha;
- Banho Ultratermostático, Fanem, Brasil;
- Bomba de Vácuo-Edwards 2, Edwards, Inglaterra;
- Bomba refrigeradora Polysat mod.12101, Cole Parmer, USA;
- Calibrador de doses modelo CRMTM-35R, Carpintec, Inc, EUA;

- Câmara de cintilação, modelo Gammatomo MB9300, matriz 128, zoom 70, Siemens LEM/IMAGAMMA- Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP (C.M.N. -FMUSP);
- Capela de exaustão, Bras Lab., Brasil;
- Contador automático tipo poço, com cristal NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, Packard, Camberra, EUA;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência composto pelos seguintes módulos:
 - ◆ Bomba de solventes com injetor manual de amostras, modelo 600 E, Waters, EUA;
 - ◆ Desgaseficador, Waters, EUA;
 - ◆ Detector UV/visível (210 - 600 nm), modelo 486, Waters, EUA;
 - ◆ Integrador, modelo 746, Waters, EUA;
 - ◆ Radiocromatógrafo de fluxo, modelo Radiomatic™-150TR, Packard, Camberra, EUA;
- Espectrômetro na região do infravermelho, Shimadzu IR-470, Japão, do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo;
- Espectrômetro de ressonância nuclear magnética, modelo 300 MHz, Brooker, EUA- Laboratório de análise instrumental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo;
- Estufa para secagem, Hipperquímica, Brasil;
- Lacrador e deslacrador manual, Wheaton, EUA;
- Lâmpada UV- 8W, GE;
- Liofilizador Edwards, supermódulo 40, BOC do Brasil;
- Máscara com filtro para amônia e nitrilas, 3M, Niosh, EUA;
- Micropipetas: de 1 -1000,0 µL, Weaton Socorex, Suíça;
- Purificador de água, Water Purification System, modelo Milli-RX 45, Millipore, EUA;
- Rotaevaporador Waterbath B-480, BUCHI R-124, Suíça;
- Termômetro, -30°C a 300°C, Incoterm, Brasil.

3.1.3 Outros

- Coluna Partisil 10 ODS-1 (RP-C₁₈) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), 250 x 4,6 mm, 10 µm, WCS Analytical column, Whatman;
- Papel 3MM para cromatografia, Whatman;
- Papel filtro qualitativo, Whatman;
- Papel indicador de pH (1-11), Merck;
- Placas cromatográficas de silicagel G-60 F 254 20x20 0,2mm, Alufolien, Kieselgel 60, Merck;
- Membrana filtrante de poro 0,22 µm, Millipore;
- Vidraria:
 - Adaptadores
 - Aspirador de pipetas 0-20 mL com válvula de vácuo rápido
 - Balão esférico de 2 bocas 250 mL
 - Balão esférico de 2 bocas 500 mL
 - Balão esférico de 3 bocas 1000 mL
 - Balão forma de coração de 2 bocas esmerilhadas de 50 mL
 - Frascos erlenmeyer com junta esmerilhada 250,500,1000 mL
 - Balões esféricos de colo curto de 5 mL ,10,100,250,500 e 1000 mL
 - Balões esféricos para Rotaevaporador de 250,500 e 1000 mL
 - Balões volumétricos com tampa de vidro 5,10,25,250,500 mL
 - Barra para agitação magnética
 - Bequeres 50,100,250,500,1000,2000 mL
 - Coluna vigraux com junta esmerilhada
 - Condensador de serpentina
 - Condensador Serpentina para refluxo (boca 29/32)
 - Condensador Liebing-West com boca esmerilhada
 - Cubas cromatográficas
 - Dessecadoras para vácuo
 - Equipamento de microdestilação para alto vácuo
 - Frasco lavador de gases
 - Funil de separação cônico de 100, 250, 500 e 1000 mL com torneira de agulha de teflon tampa de vidro e união esmerilhada inferior

- Funil Buchner
- Funil cônico, conicidade 60⁰, curto e largo
- Hélice com aspás e eixo de vidro
- Kitassato 100, 250, 500 e 1000 mL para vácuo
- Mangueiras para água
- Mangueiras para vácuo
- Multi suporte universal
- Peça moldada em 75⁰ com junta esmerilhada para termômetro
- Pipetas graduadas 1,2,5,10 mL
- Proveta graduada base hexagonal 10,25,50,100,250,500,1000 mL
- Tampões machos com oliva
- Terminal moldado em 105⁰ com conexão para vácuo
- Tubo para cloreto de cálcio com união esmerilhada

3.1.4 Animais

- Camundongos da raça *Swiss*, adultos, machos, pesando entre 22 - 28 g, biotério IPEN-CNEN/SP;
- Ratos da raça *Wistar*, adultos, machos, pesando entre 200-250 g, biotério do IPEN-CNEN/SP;
- Coelhos da raça *New Zeland*, do Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP (C.M.N. -FMUSP):
 - adulto macho, idade 1 ano e seis meses, pesando aproximadamente 3,60 Kg;
 - adulto macho, idade 5 anos, pesando aproximadamente 3,45 Kg .

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 Rota de síntese do tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)-(Cu[MIBI]₄BF₄)

A síntese do composto ativo MIBI foi realizada adaptando-se os procedimentos descritos por diversos autores ^(14,19,20,34,41,62) em 5 fases, detalhadas abaixo, a partir do cloridrato de N-(2-metilalil) amina.

Como a N-(2-metilalil) amina, produto de partida da síntese, deixou de ser um produto disponível comercialmente (apenas sob encomenda), foi executada inicialmente sua síntese ^(27,28).

Desta forma, a síntese do Cu(MIBI)₄ BF₄ pode ser dividida em cinco etapas (figura 5):

Etapa I. Síntese de Cloridrato de N-(2-metilalil) amina [1]

Etapa II. Síntese de N-(2-metilalil) formamida [2]

Etapa III. Síntese de N-(2-metoxi isobutil) formamida [3]

Etapa IV. Síntese de 2-metoxi isobutil isonitrila, (MIBI) [4]

Etapa V. Em duas fases:

A) Preparação do aduto : tetrafluorborato de tetracetonitrila de cobre (I) [5A]

B) Síntese de tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)-(Cu[MIBI]₄BF₄) [5B]

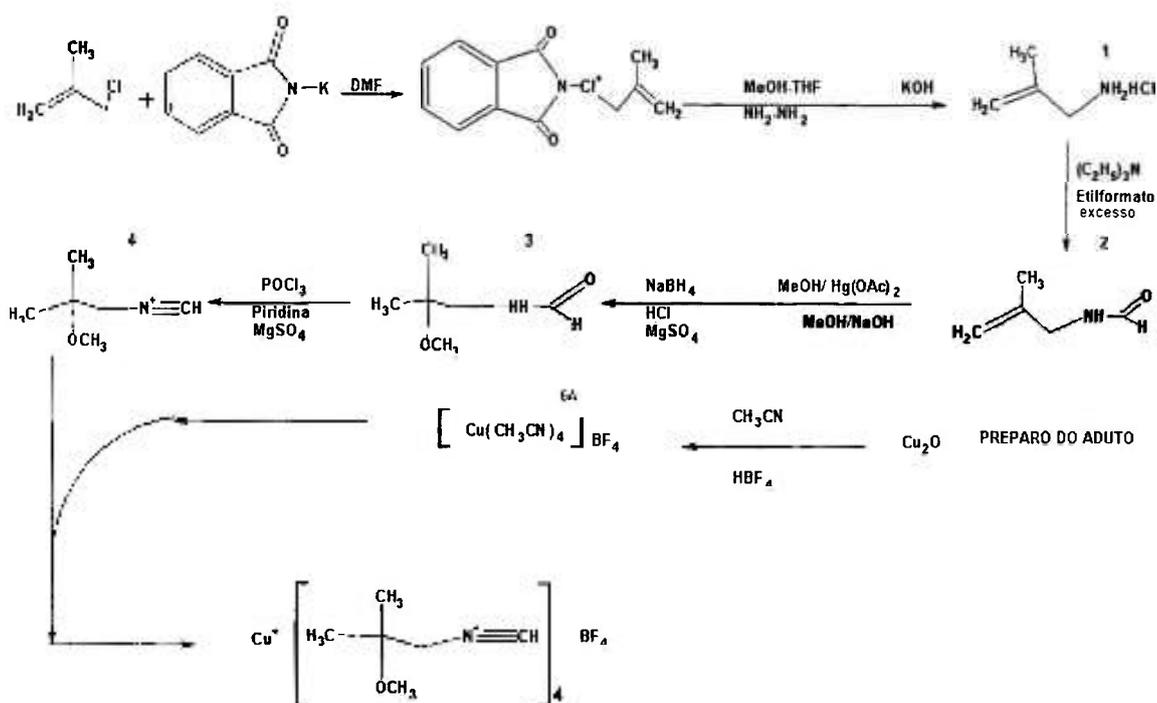


Figura 5- Rota de síntese de tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2- metoxi isobutil isonitrila)

3.2.2 Preparação das soluções de trabalho ⁽⁶³⁾

Hidróxido de sódio 50%

Foram pesados 50 g de NaOH e dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após alcançar a temperatura ambiente, o volume do balão volumétrico foi completado com água destilada a 100 mL.

Solução de hidróxido de sódio em metanol

Foram pesados 45,2 g de NaOH e dissolvidos em 390 mL de metanol (absoluto). Após alcançar a temperatura ambiente foi mantido em geladeira para posterior uso.

Acetato de sódio 0,5 M

Foram pesados 340 mg de acetato de sódio e dissolvidos em água destilada até 10 mL em balão volumétrico.

3.2.3 Purificação dos solventes orgânicos ^(63,64,65)

Metanol anidro

Em um balão de 2 litros de capacidade foram misturados 10 a 15 g de magnésio em fita e 0,10 g de cloreto de mercúrio (II). Em seguida, foi adicionado 1000 mL de metanol em pequenas porções. A mistura foi refluxada durante 1 hora e destilada sobre tamiz molecular tipo 3 Å. Foi coletada a fração com ponto de ebulição de 65^oC.

Éter dietílico anidro

Em um balão equipado com condensador de refluxo e tubo de CaCl₂ foram adicionados 1000 mL de éter dietílico e lâminas bem finas de sódio metálico. A mistura foi refluxada durante uma hora, destilada e coletada sobre tamiz molecular tipo 4 Å a fração com ponto de ebulição de 35^o C.

Precauções: sódio metálico é explosivo em contato com ar.

Diclorometano

Foi refluxado um litro de diclorometano durante 1 hora com cloreto de cálcio anidro, destilado e coletada a fração com ponto de ebulição de 40-41^o C. Conservado sob tamiz molecular tipo 3 Å.

Piridina

Foram aquecidos 100 mL de piridina sob refluxo com pérolas de hidróxido de potássio ou de sódio. A mistura foi destilada com coluna de fracionamento em pressão reduzida a 115^o C a 40 mm Hg.

N, N, Dimetilformamida

Foi mantida em tamiz molecular tipo 3 Å por 72 horas para secagem, destilada sob pressão reduzida e coletada a fração com ponto de ebulição 76^o C a 40 mm Hg.

Clorofórmio

Foi refluxado 1000 mL de clorofórmio sobre cloreto de cálcio anidro, durante 60 minutos, destilado e coletada, sobre tamiz molecular tipo 4 Å, a fração com ponto de ebulição 60-62^o C.

Benzeno

Foi mantido com CaCl_2 anidro por 24 horas, filtrado e conservado com tamiz molecular tipo 5 Å.

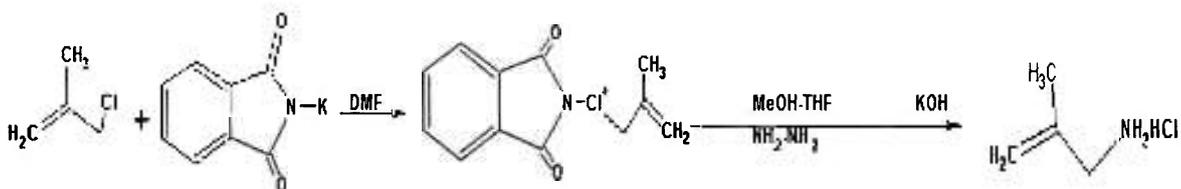
Nitrogênio gasoso seco

O nitrogênio utilizado durante as diferentes etapas de síntese foi passado por frascos lavadores de gases em série contendo separadamente CaCl_2 anidro, P_2O_5 e silicagel indicador, para secagem.

3.2.4 Procedimentos de Síntese

Etapa I - Síntese de cloridrato de N-(2-metilalil) amina [1] ^(30, 66)

Síntese de Gabriel: partindo-se de uma ftalimida e uma alila, seguida de uma reação de hidrazinólise, foi obtida uma amina primária. Esta síntese não produz aminas secundárias ou terciárias.



PROCEDIMENTO:

Em um balão de 250 mL equipado com condensador de refluxo, acoplado a um tubo com cloreto de cálcio e sob agitação magnética (entre 300-550 rpm), foram adicionados 90 mL de dimetilformamida (*purificada recentemente*), 30 mL (0,3 moles) de 3-cloro-2-metil-1propeno e 55,5 g (0,3 moles) de ftalimida de potássio. Esta mistura foi refluxada por 5 h (banho de óleo em temperatura de 165-170 °C), mantendo-se sempre a temperatura da água do condensador de refluxo entre 10-14 °C e o balão envolto em papel alumínio. A dimetilformamida (DMF) foi eliminada mediante a rotaevaporação. O sólido denso de cor amarelo escuro obtido foi lavado com 800 mL de água destilada formando imediatamente um sólido de cor bege.

Os cristais obtidos foram mantidos em dessecador com NaOH e silicagel durante uma noite (ponto de fusão dos cristais secos: 88-92 °C). O sólido foi triturado para ser dissolvido em 90 mL de uma solução de MeOH:THF (1:1) com agitação magnética e um suave aquecimento (30-35 °C) até desaparecer o sólido no fundo do balão. Em seguida, foi adicionado 21,2 mL de solução de hidrato de hidrazina a 85 % e mantido em repouso até o aparecimento de um sólido gomoso compacto. Em seguida, o sólido foi ressuspenso em 250 mL de uma solução de HCl 1,5 N e, filtrado o precipitado até que deixou de aparecer o sólido. O filtrado recolhido foi rotaevaporado até aparecer um sólido amarelo (cloridrato impuro) aderido às paredes do frasco. Foi adicionado lentamente 135 mL de uma solução de KOH a 50 % (usando banho de gelo e NaCl).

Por meio de destilação fracionada com coluna Vigraux, foram coletadas as frações em temperatura de 75-77 °C. O destilado foi acidificado com HCl a 0-5 °C (lentamente) e rotaevaporado. Os cristais brancos foram mantidos em dessecador (NaOH e silicagel) sob vácuo. Rendimento de literatura de 43,3%.

O produto foi avaliado por meio da determinação do ponto de fusão e por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Etapa II -Preparação de N-(2-Metilalil) formamida [2] (14,19,36,40,41,62)

Na etapa II, a amida foi obtida por meio de uma reação de formilação. O cloridrato de N-(2-metilalil) amina foi formilado utilizando-se o etilformiato como agente formilante na presença de trietilamina para formar a N-(2-metilalil) formamida.



PROCEDIMENTO:

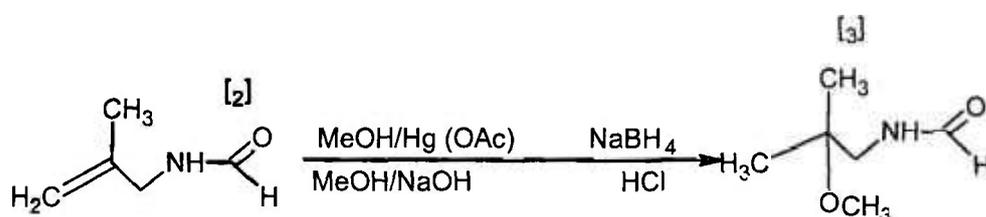
Em um balão de fundo redondo de 250 mL equipado com um condensador de refluxo e tubo com cloreto de cálcio foram adicionados 25 g (0,23 moles) de cloridrato de N-(2-metilalil) amina [produto 1], 57 mL (0,71 moles) de etilformiato e 36 mL (0,19 moles) de trietilamina. A mistura foi refluxada durante 17 horas entre 73-74° C. Após 5 horas de reação foram adicionados 15 mL de etilformiato. Ao finalizar a reação a mistura foi resfriada e adicionado o éter dietílico anidro. O precipitado suspenso na fase orgânica foi filtrado em vácuo e lavado com éter (100 – 200 mL). O sólido foi desprezado. O filtrado foi rotaevaporado para eliminar a fase etérea até aparecer um líquido denso de cor acinzentada.

A purificação foi realizada mediante destilação fracionada à pressão reduzida com rendimento teórico de 80 % de N-(2-metilalil) formamida, coletando-se a fração com ponto de ebulição de 88-92 ° C a 64 mmHg.

O produto incolor foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Etapa III - Preparação de N-(2-metoxi isobutil) formamida [3] ^(14,19,36,40,41,62)

Por meio de uma reação de oximercuriação foi feita uma adição seletiva de metanol no produto [2], N-(2-metilalil) formamida, na presença de acetato de mercúrio, seguida por uma redução com borohidreto de sódio para originar o produto N-(2-metoxi isobutil) formamida. Os estágios de oximercuriação e redução, fortemente exotérmicos, foram controlados com a adição lenta dos reagentes e temperatura baixa.



PROCEDIMENTO:

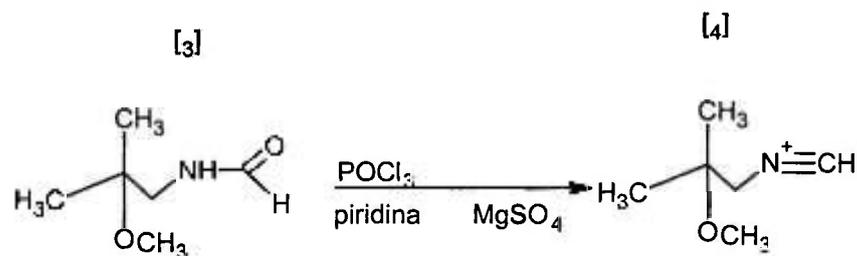
Em um balão de fundo redondo de 3 bocas de volume de 1000 mL, com agitação mecânica constante e funil de adição acoplado, foram adicionados 190 mL de metanol anidro e 60 g de acetato de mercúrio II. A mistura foi aquecida suavemente até 52 °C. Nesta temperatura foram adicionados 18,6 g de N-(2-metilalil)formamida (produto 2), através do funil e por um período de 5 minutos com agitação contínua. A mistura de reação foi mantida em agitação a 25 °C por mais 45 minutos. Durante este tempo foram dissolvidos os grumos formados.

A mistura foi resfriada em banho de gelo (0 - 5°C) e adicionou-se a solução pré-gelada de hidróxido de sódio em metanol (conforme item 3.2.2) por gotejamento através do funil de adição em um período de tempo de 15 minutos e agitação contínua. Durante a adição a solução tornou-se escura. O funil foi retirado e adicionou-se 3,55 g de borohidreto de sódio em pequenas porções, mantendo-se a agitação. Durante a etapa de adição a temperatura foi mantida abaixo de 20 °C. Em seguida, a mistura foi agitada durante 10 horas a 0-5 °C (em banho de gelo e sal em uma câmara fria com temperatura 6 °C).

A mistura da reação foi filtrada em celite (para eliminar o mercúrio elementar formado). Então, foram adicionados 400 mL de água destilada ao filtrado e a fase orgânica foi extraída com 138 mL de clorofórmio, repetindo a operação quatro vezes. As frações de clorofórmio reunidas foi mantida com sulfato de magnésio anidro, para secagem durante dois dias (com troca diária). O sólido foi filtrado e desprezado. O filtrado foi rotaevaporado para eliminação do clorofórmio. A purificação do produto foi realizada por destilação fracionada em pressão reduzida e a fração foi coletada no ponto de ebulição de 97-115°C a 64 mmHg, para se obter um líquido transparente com característica de óleo, com rendimento teórico de 46% . O produto incolor foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Etapa IV - Preparação de 2-metoxi isobutil isonitrila - MIBI [4] ^(14,19,36,40,41,62)

O produto [3], N-(2- metoxi isobutil) formamida, foi desidratado com oxiclreto de fósforo na presença de piridina para produzir a isonitrila, MIBI.



PROCEDIMENTO:

Em um balão de fundo redondo de 2 bocas de 250 mL equipado com um condensador de serpentina, tubo com cloreto de cálcio e agitação magnética, foram adicionados 11,4 g de N-(2-metoxi isobutil) formamida e 42 mL de piridina (purificada recentemente, item 3.2.3). Quando a mistura alcançou a temperatura de 0-5 ° C foi adicionado 4,4 mL de POCl₃ , lentamente, por um período de 45 minutos sob agitação constante. Durante a adição a mistura foi mantida a 0-5 ° C (banho de gelo e sal), e sob agitação constante.

No início da adição a solução se tornou amarela e ao terminar a mesma adquiriu aspecto pastoso de cor caramelo claro. A mistura da reação foi aquecida à 65 ° C por outros 45 minutos, tornando-se marron escura. Quando a mistura foi resfriada novamente e atingiu a temperatura de 0-5 ° C, foram adicionados 85 mL de água destilada gelada para dissolver todo o sólido. Em seguida, a fase orgânica foi extraída com 66 mL de benzeno. A operação de extração foi repetida por quatro vezes. O extrato orgânico coletado foi lavado com 1000 mL de água destilada e mantido com sulfato de magnésio anidro durante 2 dias (com troca diária). A solução foi filtrada e o filtrado foi submetido à destilação por coluna em pressão normal para eliminar o benzeno. Foi obtido um líquido oleoso com odor muito forte e irritante, característico das isonitrilas. O produto foi mantido vedado dentro de recipiente com vedação contendo sílica gel, em congelador, para ser destilado novamente após o preparo do aduto.

Então, o produto foi purificado por destilação fracionada com coluna Vigraux a vácuo, em meio previamente anidro por passagem de $N_{2\text{seco}}$, envolvida em papel alumínio ou manta protetora, destilado em balão coletor em temperatura de $0-5^{\circ}\text{C}$ durante a destilação já que o produto é muito volátil. Foi coletada a fração com ponto de ebulição $40-49^{\circ}\text{C}$ em 60 a 64 mmHg. Rendimento teórico de 24 %. O produto incolor foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando como solvente o acetato de etila.

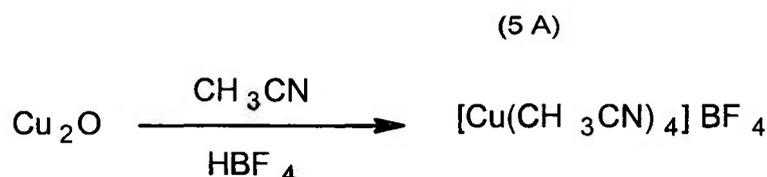
Obs: o composto [4] deve ser muito puro de forma a promover a formação do quelato cuproso. Ocasionalmente, ele pode estar contaminado com piridina, se as etapas de purificação, durante o procedimento, não forem bem conduzidas. Neste caso, uma segunda destilação fracionada do composto é recomendada.

Cuidados: o produto, 2-metoxi isobutil isonitrila, é extremamente volátil, tóxico e com um odor muito desagradável. As reações devem ser conduzidas em capela bem ventilada, com máscara adequada, óculos e luvas.

Etapa V - Preparação de tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)

A) Aduto: Tetrafluorborato de cobre (I) tetra acetonitrila [5A] ^(14,19,36,40,41,62)

Nesta etapa, ocorre a formação do aduto sob forma de um complexo de coordenação tendo como ligante a acetonitrila ao cobre (I).



PROCEDIMENTO:

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de 250 mL e funil de adição acoplado, foram adicionados 3,5 g de óxido de cobre (I), algumas limalhas de cobre elementar, 11,5 mL de acetonitrila e 82 mL de água destilada, com agitação magnética por 15 minutos em temperatura ambiente. À mistura da reação foi acrescentado, por gotejamento e com agitação contínua, 10 mL de

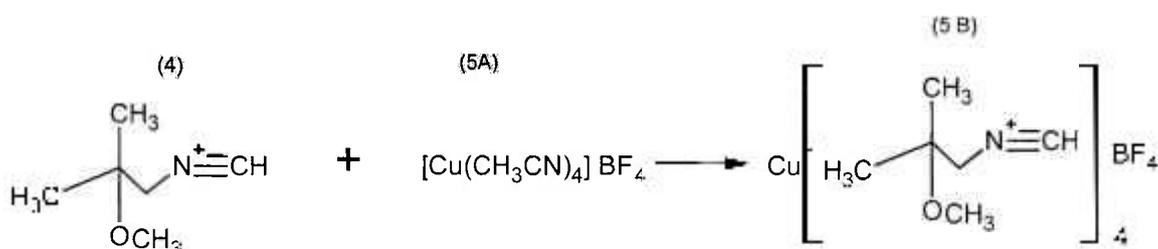
ácido fluorobórico à 50 % através do funil, em temperatura ambiente. A reação foi aquecida com agitação contínua em vapor de água fervente (sem introduzir o balão na água).

Após dissolução de todo o sólido, a solução foi filtrada, rapidamente, à quente e coletada em balão em banho de gelo. O precipitado branco formado foi filtrado e fervido com 100 mL de acetonitrila e filtrado novamente. Foi colocado 100 mL de éter dietílico (anidro) gelado e resfriada a mistura para formar um sólido branco. Em seguida, foi filtrado rapidamente o precipitado branco à pressão reduzida sob atmosfera de $N_2(g)$ seco. O produto foi colocado imediatamente com o funil dentro do dessecador com vácuo e pentóxido de fósforo (P_2O_5) para secagem e mantido nestas condições até seu uso.

Nota: o tetrafluorborato de cobre (I) tetracetoneitrila é altamente sensível a umidade tomando uma coloração verde. Todo o procedimento deve ser rápido para evitar contato dos produtos com atmosfera ambiente.

B) Preparação do de Tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila) [5B]

Nesta etapa foi executada a reação de complexação do aduto de cobre solúvel e tendo como ligante uma isonitrila (MIBI) para um complexo de coordenação, em substituição à acetonitrila.



PROCEDIMENTO:

Toda vidraria utilizada nesta etapa foi previamente seca a 120 ° C durante 1 hora.

Os solventes utilizados para esta etapa foram antes purificados conforme os procedimentos citados no item 3.2.3.

Em um balão de 2 bocas de fundo redondo de 50 mL acoplado com tubo de cloreto de cálcio, foram colocados 1,09 g (0,01 mol) de MIBI (recém sintetizado) e 3,2 mL de diclorometano anidro, em agitação magnética e banho de água a 0° C, sob atmosfera de nitrogênio seco. Foi adicionado aos poucos, com a ponta de espátula, 617 mg de tetrafluoroborato [produto 5A] durante 10 minutos. À mistura foi acrescentado 6,5 mL de diclorometano purificado. Durante a adição pode ser observado, ocasionalmente, o aparecimento de uma coloração, amarela ou azul muito tênue, porém a reação pode continuar. Após a adição, o balão foi tampado rapidamente mantendo-se a atmosfera inerte e selado com parafilme. Então foi retirado do banho frio e a mistura (incolor e transparente) ficou em agitação por 12 horas em temperatura ambiente.

O diclorometano foi extraído por meio de rotoevaporador até se obter um concentrado denso de cor caramelo claro, que foi mantido vedado em freezer até o aparecimento dos cristais brancos. O precipitado branco foi dissolvido em etanol anidro (colocado aos poucos para diluição no menor volume possível, aproximadamente 2-3 mL). Foi recristalizado com éter dietílico anidro, que foi colocado lentamente (aproximadamente 10 mL, com agitação manual) até aparecer o precipitado branco, que foi filtrado.

Foi obtido um sólido branco muito fino, que foi mantido em dessecador a vácuo sobre pentóxido de fósforo e atmosfera de N_{2(g)} e avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD), espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância nuclear magnética-¹H (RMN-¹H), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ponto de fusão.

3.2.5 Caracterização dos compostos

Os produtos obtidos foram analisados pelas técnicas abaixo relacionadas, conforme descrito por diversos autores ^(9,16,17,18,19,20,21,23,24,29).

- Infravermelho (IV) - Produtos 1,2, 3 e 5B
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Produto 4 e 5B
- Cromatografia em Camada Delgada (CCD): Produtos 1,2,3,4 e 5B
- Ressonância Nuclear Magnética-¹H (RMN-¹H) : Produto 5B
- Ponto de fusão: para produto 1 e 5B (sólidos)

A) Ponto de Fusão (PF)

As faixas de fusão dos produtos [1] e [5B] foram determinadas em aparelho da marca Mettler.

B) Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV das amostras (produtos 1, 2, 3 e 5) foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu IR-470 (amostras no estado sólido utilizando dispersão KBr) no Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e analisada na região de IV no intervalo de frequência de 500 – 4000 cm^{-1} .

C) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ^1H)

Os espectros de RMN- ^1H do produto [5] e amostra do produto, sintetizado e cedido pelo Centro de Isótopos – Havana, Cuba foram obtidos no Laboratório de Análise Instrumental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), utilizando-se como solvente clorofórmio deuterado como padrão de referência interno.

D) Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi utilizada para análise para todos os produtos (exceto produto 4 e 5A) utilizando-se como suporte placas de silicagel com indicador de fluorescência (SG 60-F254) e os solventes abaixo relacionados:

- Produto [1]: N-butanol: ácido acético: água (4:1:1)
- Produto [2]: acetato de etila
- Produto [3]: acetato de etila
- Produto [5B]: metanol :acetonitrila : tetrahidrofurano : acetato de sódio 0,5 M (3:3:2:2)

E) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando-se como solvente acetato de etila para analisar o produto [4] e a amostra deste produto, obtida comercialmente da empresa ABX-Alemanha. A CLAE também foi utilizada para analisar o produto [5B] e amostra do produto sintetizado e cedido por Cuba(usado como padrão comparativo) utilizando-se como fase móvel a mistura de solventes metanol :sulfato de amônia 0,025 M (95:5); nas seguintes condições para ambos os produtos:

- Coluna: RP C₁₈-Whatman, 250 x 4,6 mm, 10 µm;
- Comprimento de onda: 254 nm;
- Fluxo: 1 mL/minuto;
- Detetor de UV (254 nm)

3.2.6 Formulação do reagente liofilizado de tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) para marcação com tecnécio-99m.

O reagente tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) para marcação com tecnécio-99m foi formulado com a seguinte composição por frasco ^(19,62,67):

- 1,00 mg do produto [Cu(MIBI)₄]BF₄
- 0,10 mg de cloreto estano** (SnCl₂.2H₂O)
- 1,00 mg de cloridrato de L-cisteína monohidratada;
- 5,00 mg de citrato de sódio
- 20,00 mg de manitol

O processo de liofilização foi executado em um tempo total de 23 horas e os reagentes liofilizados foram armazenados sob refrigeração (7-10°C).

O reagente de MIBI para marcação com tecnécio-99m foi preparado de acordo com procedimento previamente descrito ^(19,62).

a) Preparo da solução de cloreto estanoso**

Foram pesados 500 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolvidos em 2 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) e diluído em 10 mL de água destilada, previamente nitrogenada por meio de borbulhamento com nitrogênio gasoso.

b) Para preparo de 25 frascos do reagente foram utilizados:

- 25,0mg do produto $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$
- 50,0 μL da solução de cloreto estanoso** (item a)
- 27,75 mg de cloridrato de L-cisteína monohidratada;
- 125,0 mg de citrato de sódio
- 500,0 mg de manitol

Em um béquer de 100 mL, sob nitrogenação constante, agitação magnética e monitoramento de pH, foram adicionados 12,5 mL de água, o citrato de sódio e medido o pH (deve ser mantido em 7 a 8,0). Em seguida, foi adicionado o manitol e medido o pH (deve ser mantido por volta de 8,0).

Posteriormente, foi adicionado o sal de MIBI até dissolução completa e novamente medido o pH (7,5 a 8,00). Adicionou-se a cisteína. O ajuste do pH (6-6,5) foi feito com a solução de NaOH 2N e HCl 2N. Por último foi adicionado o cloreto estanoso, gota a gota, e com controle de pH (não deve ser inferior a 5,0) e agitação forte. Então foi ajustado o pH em 5,7 a 5,9, completada a diluição com água até 25 mL e medido o pH final (5,7 a 5,9) ⁽⁶⁸⁾.

A solução resultante foi filtrada em membrana filtrante de poro 0,22 μm e dispensada em frascos de penicilina (1 mL). Os frascos assim preparados podem ser armazenados congelados ou podem ser submetidos à liofilização, fechados sob vácuo e armazenados sob refrigeração (7-10°C).

3.2.7 Produção do reagente liofilizado de MIBI

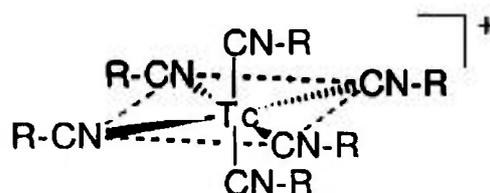
Os frascos preparados conforme descrito no item 3.2.6 foram liofilizados adotando-se as seguintes condições:

- tempo total de liofilização de 23 horas
- 1 hora para congelar as prateleiras (-10°C);
- 4 horas de congelamento do produto/amostra (-45°C)
- 19 horas de aquecimento gradual para secagem do produto até atingir 20°C.

Os reagentes liofilizados foram armazenados sob refrigeração (7-10°C) para avaliação da estabilidade do produto.

3.2.8 Marcação do reagente de $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$ com tecnécio-99m

O reagente liofilizado de MIBI foi reconstituído pela adição de 1-3 mL de solução de pertecnetato de sódio, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (atividade de 185 – 3700 MBq/mL) eluída do gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A mistura foi aquecida por 10 minutos em banho-maria fervente e então resfriada ⁽⁶⁷⁾.



3.2.9 Avaliação da pureza radioquímica do composto marcado

Foram adotados os seguintes métodos analíticos para determinação de pureza radioquímica do SESTAMIBI ou MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^(19,20,34,36,40,41,62).

a) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A mistura reagente foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se:

- Mistura de solventes para a fase móvel metanol: sulfato de amônia 0,025 M (95:5);
- Coluna: RP C₁₈-Whatman, 250 x 4,6 mm, 10 μm;
- Comprimento de onda: 254 nm
- Fluxo: 1 mL/minuto;
- Detetor de UV (254 nm) e detetor de radiação.

b) Cromatografia em Papel Wathman 3 MM

A pureza radioquímica foi determinada utilizando-se cromatografia em papel Wathman n° 3, fitas de 2,0 x 12 cm, utilizando-se como solvente a mistura metanol: acetato de etila (2:8) e metanol: água (8:2) para determinação das espécies radioquímicas envolvidas na marcação (Tabela 1).

A amostra do produto foi aplicada a 1,5 cm de distância da margem inferior da fita, percorrendo o solvente uma distância de 10 cm no papel Whatman 3 MM. Todas as análises foram feitas em triplicatas. Após o término dos processos cromatográficos, as fitas foram secadas em temperatura ambiente, cortadas a cada centímetro e cada segmento foi colocado em tubos apropriados para avaliação da radioatividade.

Foram realizados os testes de estabilidade do produto liofilizado, repetindo-se a marcação com tecnécio-99m, em diferentes períodos, com baixa atividade (185 - 296 MBq /2-3 mL) e alta atividade (3663 – 4070 MBq/2-3 mL) para avaliação da pureza radioquímica das marcações.

Tabela 1: Comportamento cromatográfico do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{TcO}_2$, e SESTAMIBI- ^{99m}Tc na Cromatografia em papel

SUPORTE	SOLVENTE	VALOR DO Rf		
		$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_2$	SESTAMIBI- ^{99m}Tc
Papel Wathman 3 MM	MeOH:Ac.Étila (2 : 8)	0,6 - 0,7	0,0	0,8 - 1,0
	MeOH:H ₂ O (8 : 2)	0,0 - 0,4	0,0	0,8 - 1,0

c) Extração por Solventes ^(34, 69)

Foram realizados alguns ensaios de determinação de pureza radioquímica pela técnica de extração por solventes utilizando-se a mistura clorofórmio: NaCl 0,9 % (1:1).

Uma amostra do produto marcado foi adicionada à mistura de solventes (3 mL de cada) e agitada em aparelho vórtex por 15 segundos. Após 1 minuto de repouso para separação das fases, foi retirado 1 mL de cada fase de solvente (solução fisiológica na parte superior do frasco e clorofórmio na parte inferior) e colocadas no calibrador de doses para leitura.

A porcentagem de marcação foi obtida pela soma da atividade de cada fase como atividade total comparada com a atividade apresentada pela fase orgânica:

$$\text{SESTAMIBI-}^{99\text{m}}\text{Tc \%} = \frac{\text{Atividade da fase orgânica}}{\text{Atividade da f.orgânica + fase salina}} \times 100$$

3.2.10 Estudo de distribuição biológica do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc

A) Estudos invasivos

Foram realizados estudos de biodistribuição do composto marcado para determinar a porcentagem de acúmulo em órgãos com relação a atividade injetada, considerando-se que a radioatividade medida pode estar associada ao composto injetado ou a um produto de sua degradação.

Realizou-se a distribuição biológica em camundongos machos adultos da raça *Swiss*, pesando entre 22-28 g. O radiofármaco foi injetado (3,7 MBq /0,1 mL) pela veia caudal e nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração, foram sacrificados por decapitação. Para cada tempo foi utilizado um número de 5 camundongos (n).

Antes do sacrifício dos animais, coletou-se amostra de 100 µL de sangue do plexo orbital em tubos previamente heparinizados (Liquemine) e foram retirados os seguintes órgãos: pulmão, tireóide, coração, baço, fígado com vesícula biliar, estômago vazio, intestinos (com conteúdo), rins, músculo (fração anterior da coxa esquerda) e cérebro. Os órgãos foram pesados e colocados em tubos para contagem em detetor de radiação tipo poço.

A porcentagem da dose administrada presente nos diferentes órgãos (% dose / órgão), bem como a % dose/ grama de órgão foram determinadas a partir de um padrão de dose administrada, de acordo com as equações 1 e 2, utilizando-se o programa de computador MS Excel-7.0 – Microsoft Office:

- **Determinação da % Dose/órgão:**

$$= \frac{\text{Cpm órgão}}{\text{Cpm padrão}} \times 100$$

(Equação 1)

- **Determinação da % Dose/grama de tecido:**

$$= \frac{\% \text{ dose / órgão}}{\text{peso órgão correspondente}} \quad \text{(Equação 2)}$$

Os cálculos da porcentagem da dose administrada presente no sangue total e da volemia foram determinados de acordo com Altman e col. ⁽⁷⁰⁾, segundo as equações 3 e 4 abaixo descritas:

- **Determinação da Volemia (mL) :**

$$= \text{Peso corpóreo do animal (g)} \times 0,07 \quad \text{(Equação 3)}$$

- **Determinação da % Dose sangue total:**

$$= \text{Cpm de 1 mL de sangue} \times \text{volemia} \quad \text{(Equação 4)}$$

Para a determinação da porcentagem da dose do músculo total, considerou-se o cálculo de Jones e col. ⁽⁷¹⁾, como demonstrado na equação 5:

- **Determinação da % Dose músculo total:**

$$= 40\% \text{ peso do animal (g)} \times \text{cpm de 1g de músculo} \quad \text{(Equação 5)}$$

Os estudos de distribuição biológica do radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc foram repetidos utilizando-se a mesma técnica em ratos da raça *Wistar*, adultos, machos, pesando entre 200-250 g.

B) Estudo de imagens cintilográficas do SESTAMIBI-^{99m}Tc em animal de médio porte

Foram realizados estudos cintilográficos do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc, em coelhos da raça *New Zeland*, no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (C.M.N.-FMUSP), com um estudo dinâmico (fluxo) do composto, adquirido em 30 imagens sequenciais e imagens estáticas.

As imagens foram adquiridas posicionado-se os animais em decúbito ventral (para aquisição de imagem frontal), após a injeção do radiofármaco na veia lateral da orelha direita. Manteve-se o coelho imobilizado durante todo o procedimento. As imagens foram adquiridas na câmara de cintilação de

experimentação animal do C.M.N. -FMUSP, com colimador de baixa energia e alta resolução, em dois coelhos

Animal 1 - idade 1 ano e seis meses, injetado 85,61 MBq/0,3 mL do radiofármaco para obtenção de imagens dinâmicas em 30 minutos (1 imagem/minuto) e estáticas em 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da dose.

Animal 2 - idade 5 anos, injetado 113,66 MBq/0,3 mL do radiofármaco para obtenção de imagens dinâmicas durante os primeiros 30 minutos (1 imagem/minuto) e estáticas em 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da dose.

As porcentagens de captações do fígado e coração foram estimadas selecionando-se os respectivos órgãos com a área de interesse e relacionando as contagens obtidas com a contagem do restante do corpo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO CLORIDRATO DE N-(2-METILALIL) AMINA- PRODUTO [1]

4.1.1 Características Organolépticas

O produto [1], Cloridrato de N-(2- metilalil) amina, com fórmula molecular $C_4H_{10}ClN$, altamente higroscópico, foi obtido com rendimento médio de 52% sob a forma de cristais brancos.

4.1.2 Ponto de Fusão (PF)

Nesta etapa de síntese foi obtido um produto intermediário, uma alquilftalimida, que foi analisada para confirmar a sua presença e dar prosseguimento à etapa I de obtenção da amina. O produto intermediário e a amina foram caracterizados por esta técnica, conforme demonstrado na tabela 2. Uma amostra do Cloridrato de N-(2- metilalil) amina, da marca Sigma Aldrich também foi submetida à análise de ponto de fusão.

Tabela 2 - Ponto de Fusão

PRODUTO	PONTO DE FUSÃO (°C)	
	EXPERIMENTAL IPEN	TEÓRICO LITERATURA ^(66,72)
Alquilftalimida (intermediário)	86,0 - 91,2	88,5 - 90,0
Cloridrato de N-(2- metilalil) amina- sintetizado	180,0 -186,8	184,0 -190
Cloridrato de N-(2- metilalil) amina- Sigma Aldrich	181,0 -185	184,0 -190

4.1.3 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

O produto [1], Cloridrato de N-(2-metilalil)amina também foi caracterizado por meio da espectrofotometria na região do infravermelho (IV), sendo que as bandas de absorção dos grupamentos característicos do produto foram identificadas, conforme demonstrado na figura 6:

– **Amina primária:**

- $\sim 3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ de freqüência (alongação N-H)
- $1570 - 1620 \text{ cm}^{-1}$ de freqüência (bandas de deformação)
- 1350 e 1250 cm^{-1} de freqüência (bandas de estiramento)

– **Alifático:** $\sim 1678 \text{ cm}^{-1}$ de freqüência

– **N-H cloridrato:** $3122 - 3394 \text{ cm}^{-1}$ de freqüência.

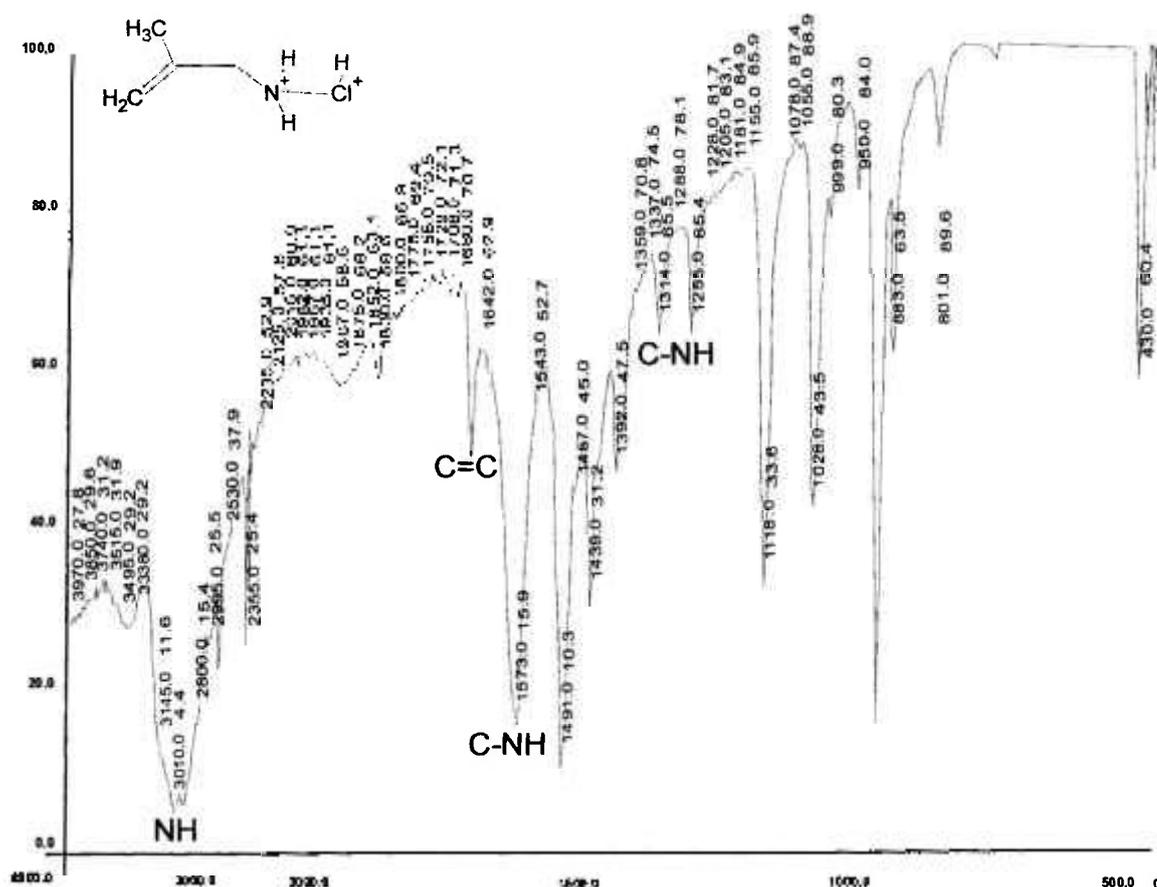


Figura 6 - Espectro no Infravermelho do cloridrato de N-(2- metilalil) amina (produto [1]) sintetizado.

Observando-se o espectro no IV do produto [1] sintetizado, constata-se a presença das principais bandas de absorção correspondentes à estrutura química do Cloridrato de N-(2- metilalil) amina ^(73,74, 75).

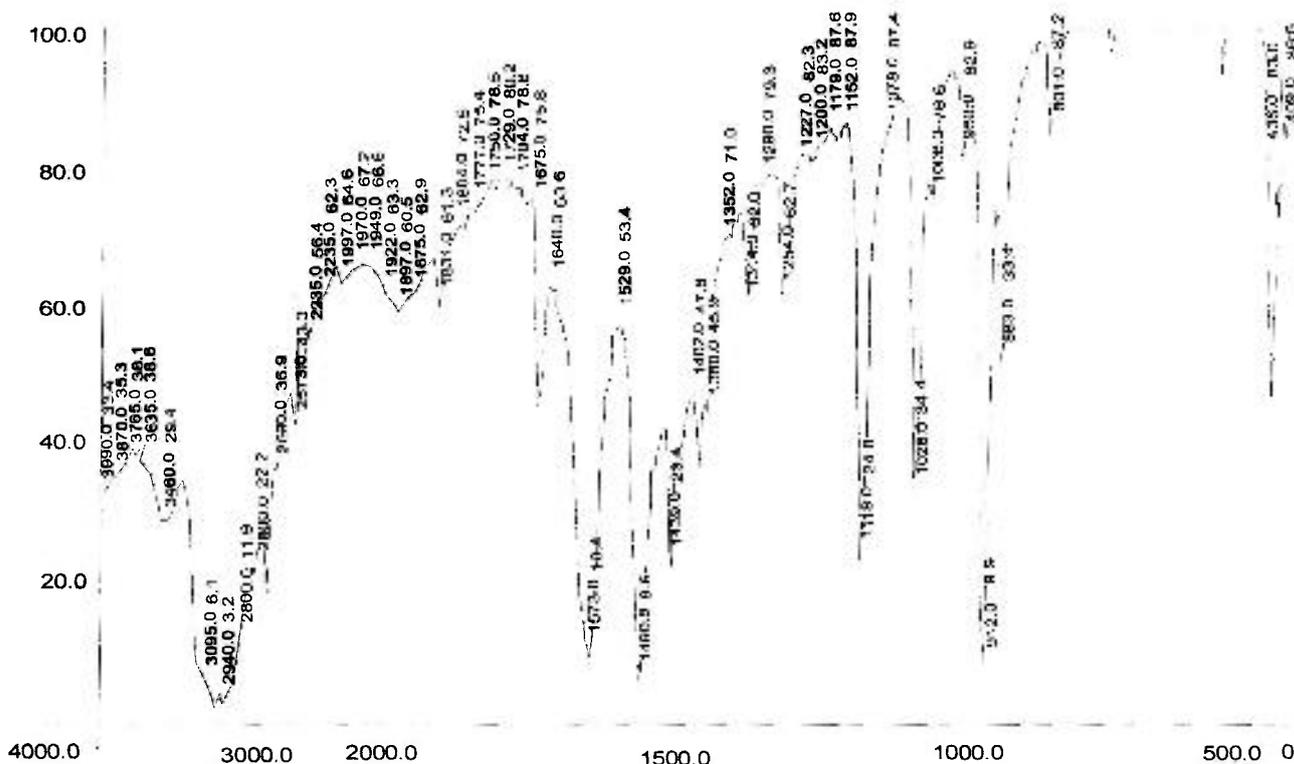


Figura 7- Espectro de Infravermelho do cloridrato de N-(2- metilalil) amina (produto [1]) amostra Sigma Aldrich.

A figura 7 também apresenta o espectro no infravermelho do cloridrato de N-(2- metilalil) amina, amostra Sigma Aldrich, onde identificaram-se as mesmas bandas de absorção correspondentes aos grupamentos, descritos para a figura 6.

4.1.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O Cloridrato de N-(2-metilalil)amina, analisado por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se como suporte placas de silicagel com indicador de fluorescência (SG 60-F254) e a mistura de solventes N-butanol: ácido acético: água (4 :1 :1), apresentou o fator de retenção (Rf) de 0,5 para as amostras do produto sintetizado e de referência da Sigma Aldrich.

4.2 - ANÁLISE DE N- (2-METILALIL) FORMAMIDA - PRODUTO [2]

4.2.1 Características Organolépticas

O produto [2], N-(2-metilalil) formamida, foi obtido com um rendimento médio de 60%, sob forma de um óleo viscoso incolor ou levemente amarelado (64,76).

4.2.2 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

O produto [2], N-(2-metilalil) formamida, foi caracterizado por meio de espectrofotometria na região do infravermelho (IV), sendo que as, bandas de absorção, correspondente aos grupamentos mais característicos do produto, foram identificadas, conforme demonstrado na figura 8:

- **N-H:** 3304 cm^{-1} de freqüência
- **AMIDA :** 3060 cm^{-1} de freqüência
- **OLEFINA:** 3040 cm^{-1} de freqüência
- **AMIDA II :** 1520 cm^{-1} de freqüência
- **NHC=O:** 1660 cm^{-1} de freqüência (formamida)

Observando-se o espectro no IV do produto [2] sintetizado, constata-se a presença das principais bandas de absorção correspondentes à estrutura química do N-(2-metilalil) formamida (73,74,75).

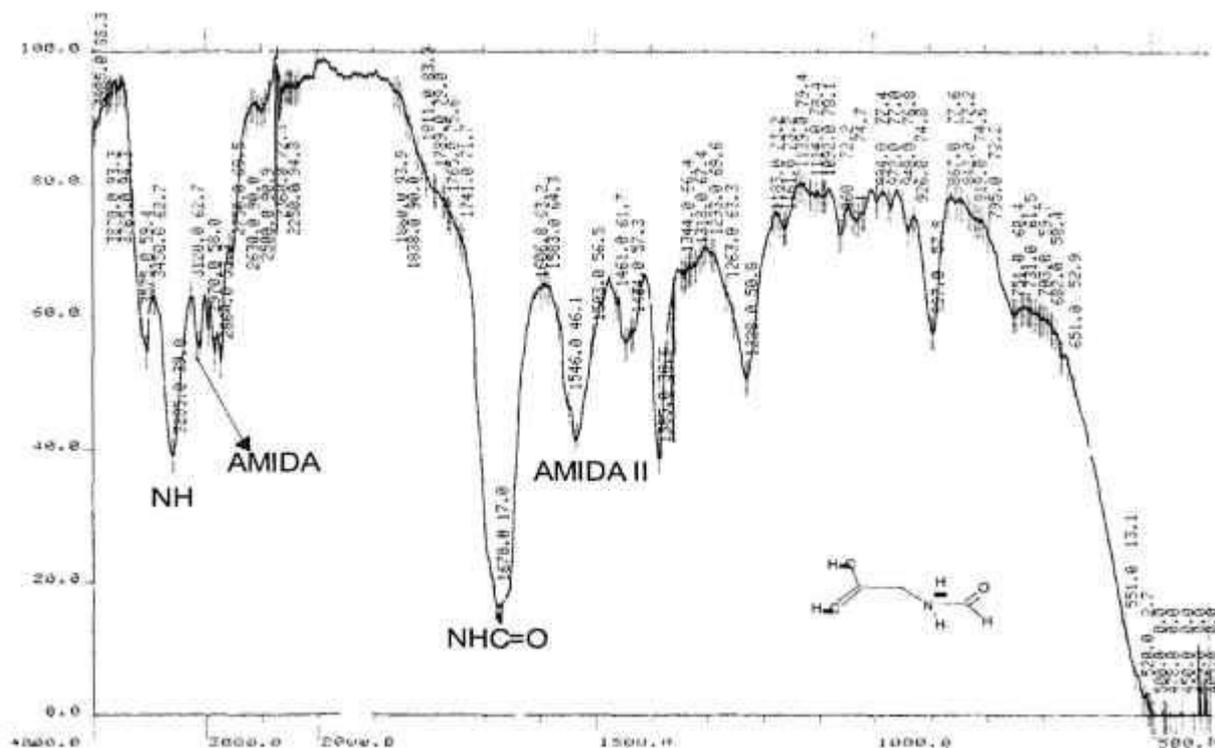


Figura 8 - Espectro de Infravermelho de N-(2-metilalil) formamida -produto [2]

4.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O produto [2], analisado por meio de CCD utilizando-se como suporte placas de silicagel com indicador de fluorescência (SG 60-F254) e como solvente acetato de etila, apresentou o fator de retenção (R_f) de 0,6.

4.3 ANÁLISE DE N-(2- METOXI ISOBUTIL) FORMAMIDA- PRODUTO [3]

4.3.1 Características Organolépticas

O produto [3], N-(2-metoxi isobutil) formamida, foi obtido com um rendimento médio de 48%, sob forma de um óleo viscoso incolor ^(64,76,77).

4.3.2 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

O produto [3], foi caracterizado por meio de espectrofotometria na região do infravermelho (IV), sendo que as bandas de absorção correspondentes aos grupamentos mais característicos do produto foram identificadas, conforme demonstrado na figura 9:

- **N-H:** 3200 - 3300 cm^{-1} de frequência
- **AMIDA :** 3060 cm^{-1} de frequência
- **NHC=O:** 1682 cm^{-1} de frequência
- **AMIDA II :** 1530 cm^{-1} de frequência
- **OCH₃ :** 1180, 1160, 1070 cm^{-1} de frequência

Observando-se o espectro do IV do produto [3], constata-se a presença das principais bandas de absorção correspondentes à estrutura química do N-(2-metoxi isobutil) formamida (64,75, 76,78).

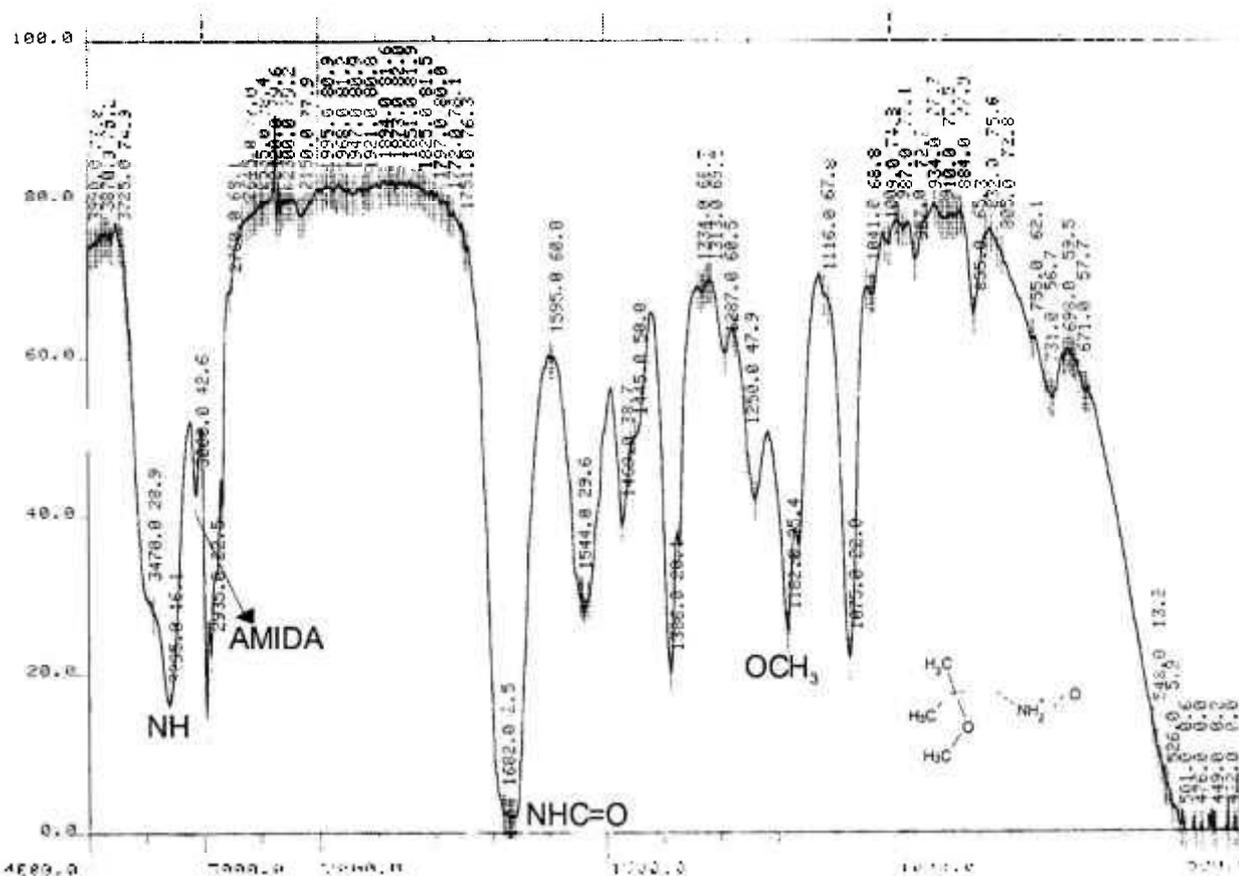


Figura 9 -Espectro de Infravermelho de N-(2-metoxi isobutil)formamida- produto [3]

4.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O produto [3] analisado por meio de CCD, utilizando-se como suporte placas de silicagel com indicador de fluorescência (SG 60-F254) e como solvente acetato de etila, apresentou fator retenção (Rf) de 0,6.

4.4 ANÁLISE DE 2- METOXI ISOBUTIL ISONITRILA- PRODUTO [4]

4.4.1 Características Organolépticas

O produto [4], 2- metoxi isobutil isonitrila (MIBI), foi obtido com um rendimento médio de 35%, sob forma de um óleo viscoso incolor, com odor característico das isonitrilas e extremamente volátil em temperatura ambiente ^(64,76,77,78).

4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O produto [4], 2-metoxi isobutil isonitrila foi analisado apenas pela técnica de CLAE (figura 10) por se tratar de um produto tóxico, altamente volátil e de odor extremamente forte, característico das isonitrilas, utilizando como padrão comparativo uma amostra do produto obtido comercialmente da empresa ABX (Alemanha) com teor de pureza de 97% (figura 11).



Figura 10- Perfil cromatográfico de CLAE-amostra do produto sintetizado no IPEN. Nas seguintes condições: fase móvel metanol:sulfato de amônia 0,025 M (95:5); Coluna: RP C₁₈-Whatman, 250 x 4,6 mm, 10 μm; Comprimento de onda: 230 nm; Fluxo: 1 mL /minuto; Detetor de UV (254 nm)

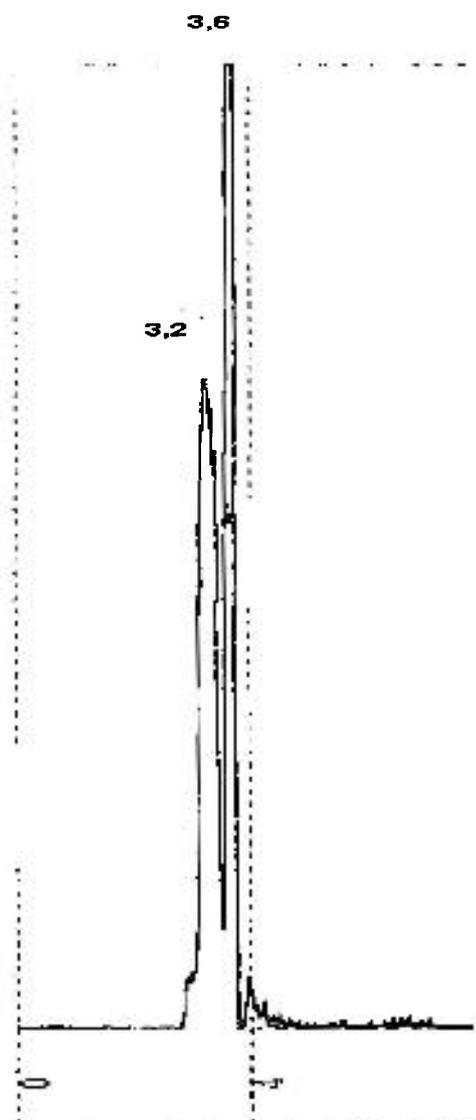


Figura 11- Perfil cromatográfico de CLAE-amostra do produto adquirido comercialmente da ABX (Alemanha). Nas seguintes condições: fase móvel metanol:sulfato de amônia 0,025 M (95:5); Coluna: RP C₁₈-Whatman, 250 x 4,6 mm, 10 μm; Comprimento de onda: 230 nm; Fluxo: 1 mL /minuto; Detetor de UV (254 nm)

4.5 ANÁLISE DO TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I) TETRA (ACETONITRILA) - (Cu[CH₃CN]₄BF₄) - PRODUTO [5A]

4.5.1 Características Organolépticas

O produto [5A], tetrafluorborato de cobre (I) tetra (acetonitrila)-(Cu[CH₃CN]₄BF₄), foi obtido com um rendimento médio de 3 g, sob forma de cristais finos branco, altamente higroscópico.

4.6 ANÁLISE DO TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I) TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL ISONITRILA)- (Cu[MIBI]₄BF₄) - PRODUTO [5 B].

4.6.1 Características Organolépticas

O produto [5 B], sal quelato de MIBI, tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila) -(Cu[MIBI]₄BF₄), foi obtido com um rendimento médio de 45%, sob forma de cristais brancos, com odor característicos das isonitrilas.

4.6.2 Ponto de Fusão (PF)

O do sal quelato de MIBI, (Cu[MIBI]₄BF₄), foi obtido na faixa de 100 - 101°C. O PF do sal foi comparado à faixa de PF de uma amostra do produto cedido por Cuba e com uma amostra adquirida comercialmente da ABX (Alemanha), que apresentaram a mesma faixa de fusão, embora sejam relatados em literatura ^(64,76,77,78) faixas diferentes variando de 77-91°C.

4.6.3 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

O produto [5 B], Cu[MIBI]₄BF₄, também foi caracterizado por meio da espectrofotometria na região do infravermelho (IV), sendo que as bandas de absorção, abaixo citadas, dos grupamentos característicos ao produto, foram identificadas, conforme demonstrado na figura 12, que representa o produto sintetizado. A figura 13 representa o espectro de IV para o Cu[MIBI]₄BF₄ cedido por Cuba.

- 2190-2195 cm^{-1} de frequência (-N≡C)
- 1180, 1160, 1070 cm^{-1} de frequência (OCH₃)

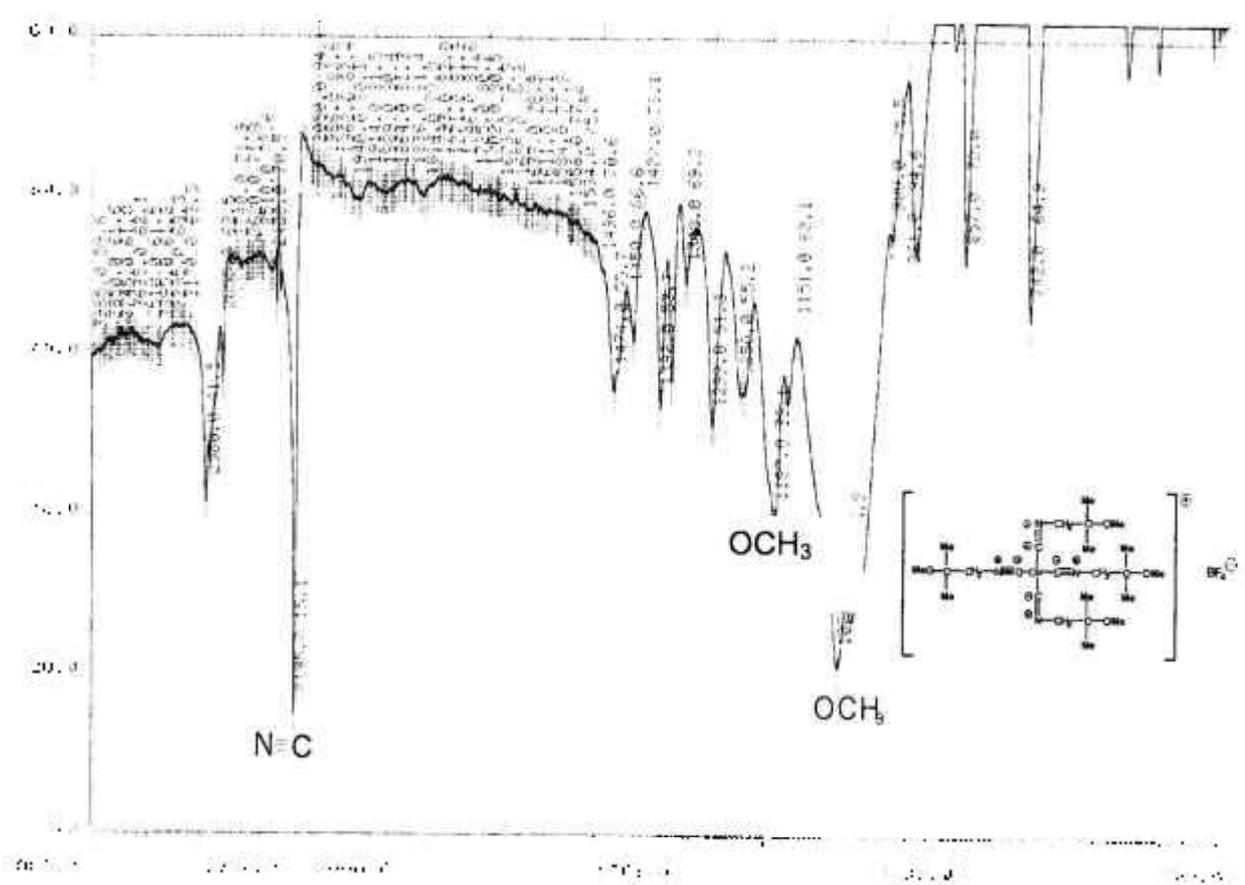


Figura 12- Análise de infravermelho (IV) do sal Cu[MIBI]₄BF₄ sintetizado IPEN

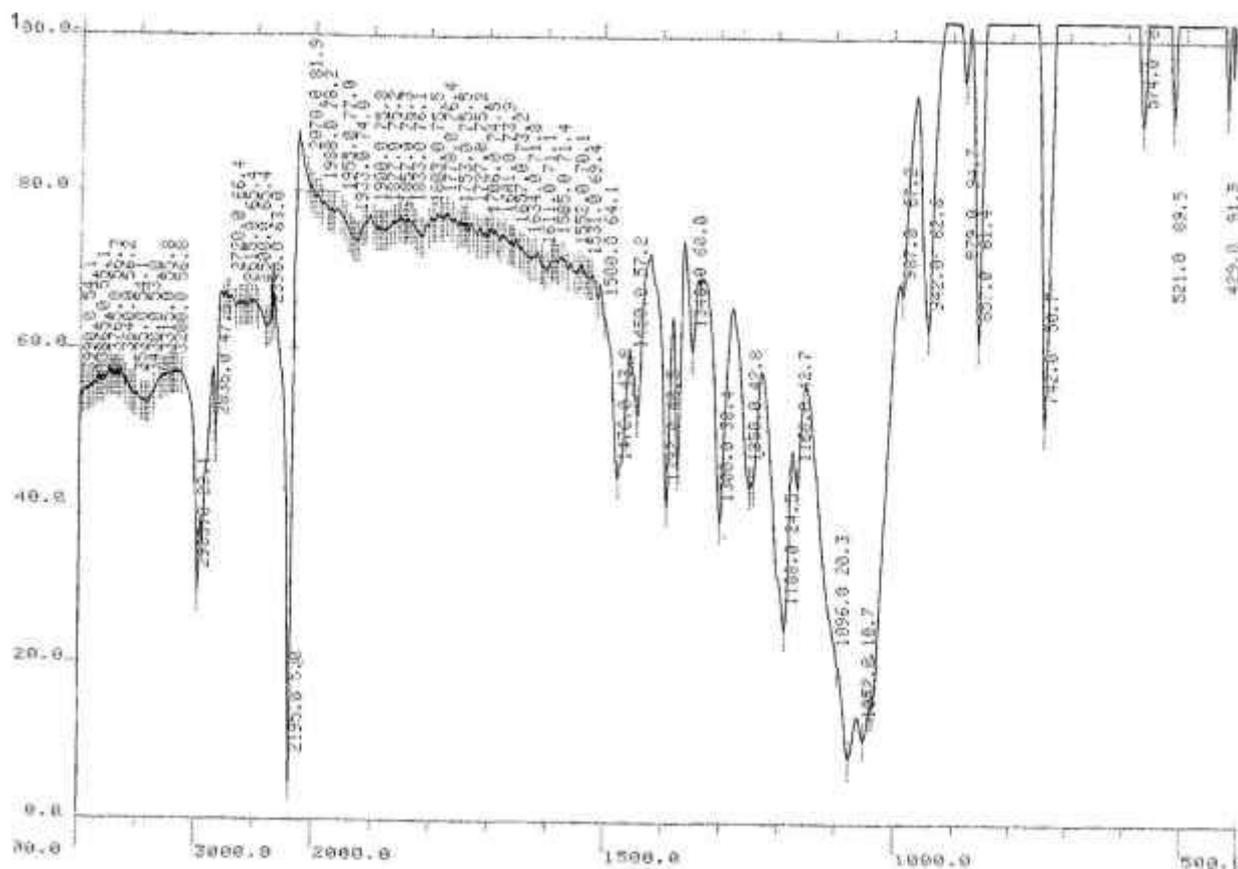


Figura 13 - Análise de infravermelho (IV) do sal $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ cedido por Cuba

Foram analisados os espectros de IV para o produto sob esta forma de sal, tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila), produzido no IPEN e uma amostra produzida e cedida por Cuba, e ambas demonstraram possuir os grupamentos ^(62,76,77) que caracterizam o MIBI. O espectro de absorção do infravermelho das isonitrilas é caracterizado pela banda 2190-2195 cm^{-1} ^(62,76,77,79,80).

4.6.4 Cromatografia em Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O produto final, $(\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4)$, também foi analisado por CLAE e os perfis dos cromatogramas obtidos nas figuras 14 (amostra IPEN) e 15 (amostra Cuba), apresentaram picos de tempo de retenção (R_t) bastante próximos.

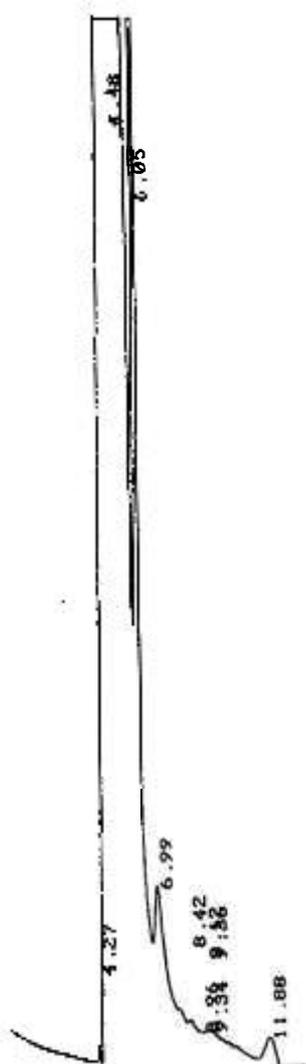


Figura 14- Perfil cromatográfico de CLAE do sal $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ – IPEN

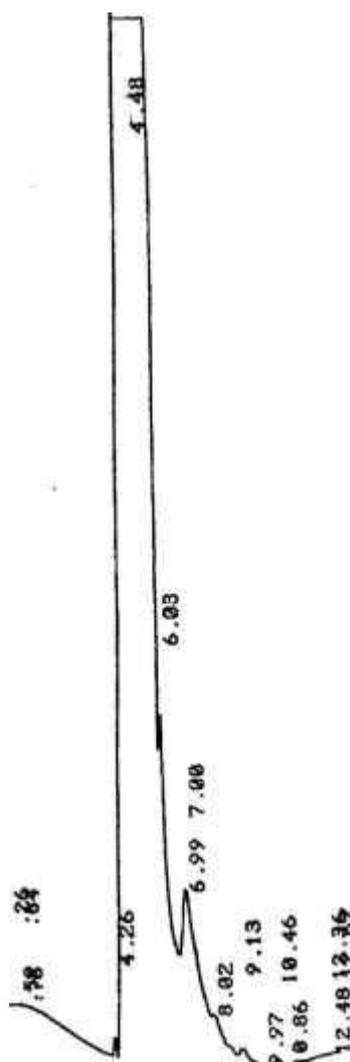


Figura 15- Perfil cromatográfico de CLAE do sal $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ - CUBA

Condições: Mistura de solventes para a fase móvel metanol:sulfato de amônia 0,025 M (95:5); Coluna: RP C_{18} -Whatman, 250 x 4,6 mm, 10 μm ; Comprimento de onda: 254 nm; Fluxo: 1 mL/minuto; Detetor de UV (254 nm) e detetor de radiação.

4.6.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) - ($\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$), analisado por meio de CCD utilizando-se como suporte placas de silicagel com indicador de fluorescência (SG 60-F254) e a mistura de solventes metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano:acetato de sódio (3:3:2:2), apresentou o fator de retenção (R_f) de 0,7 para as amostras (Cuba e IPEN) do produto.

4.6.6 Ressonância Magnética Nuclear ($\text{RMN-}^1\text{H}$)

A análise de $\text{RMN-}^1\text{H}$ em CDCl_3 do composto revelou os espectros com picos em 1,2 (6H,s,2x CH_3); 3,25 (3H,s, OCH_3); 3,65(2H,s, CH_2), que caracterizam o produto conforme descrito na literatura^(62,76,77,79).

Foram analisadas as amostras do produto $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ produzido no IPEN (figura 16), produzido e cedido por Cuba (figura 17) e amostra obtida comercialmente da empresa ABX-Alemanha (figura 18) que se mostraram semelhantes na comparação dos espectros.

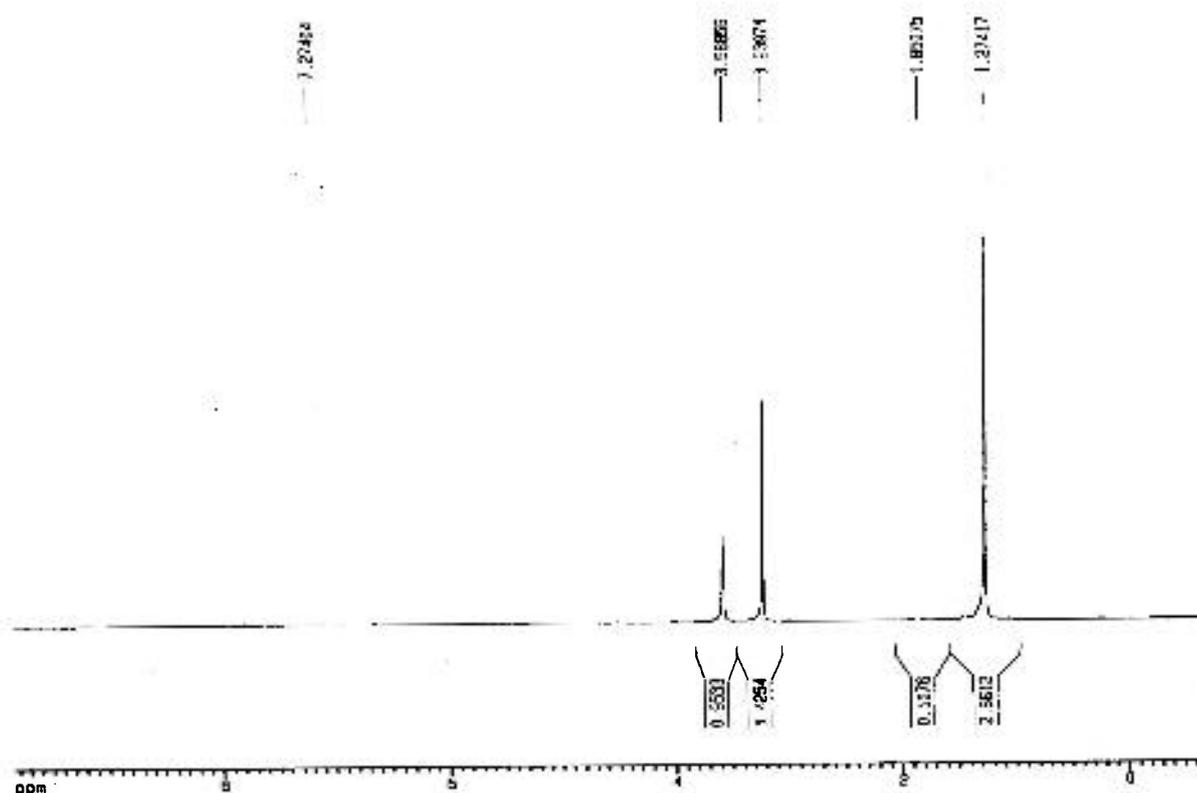


Figura 16- $\text{RMN-}^1\text{H}$ em CDCl_3 do $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ produzido no IPEN

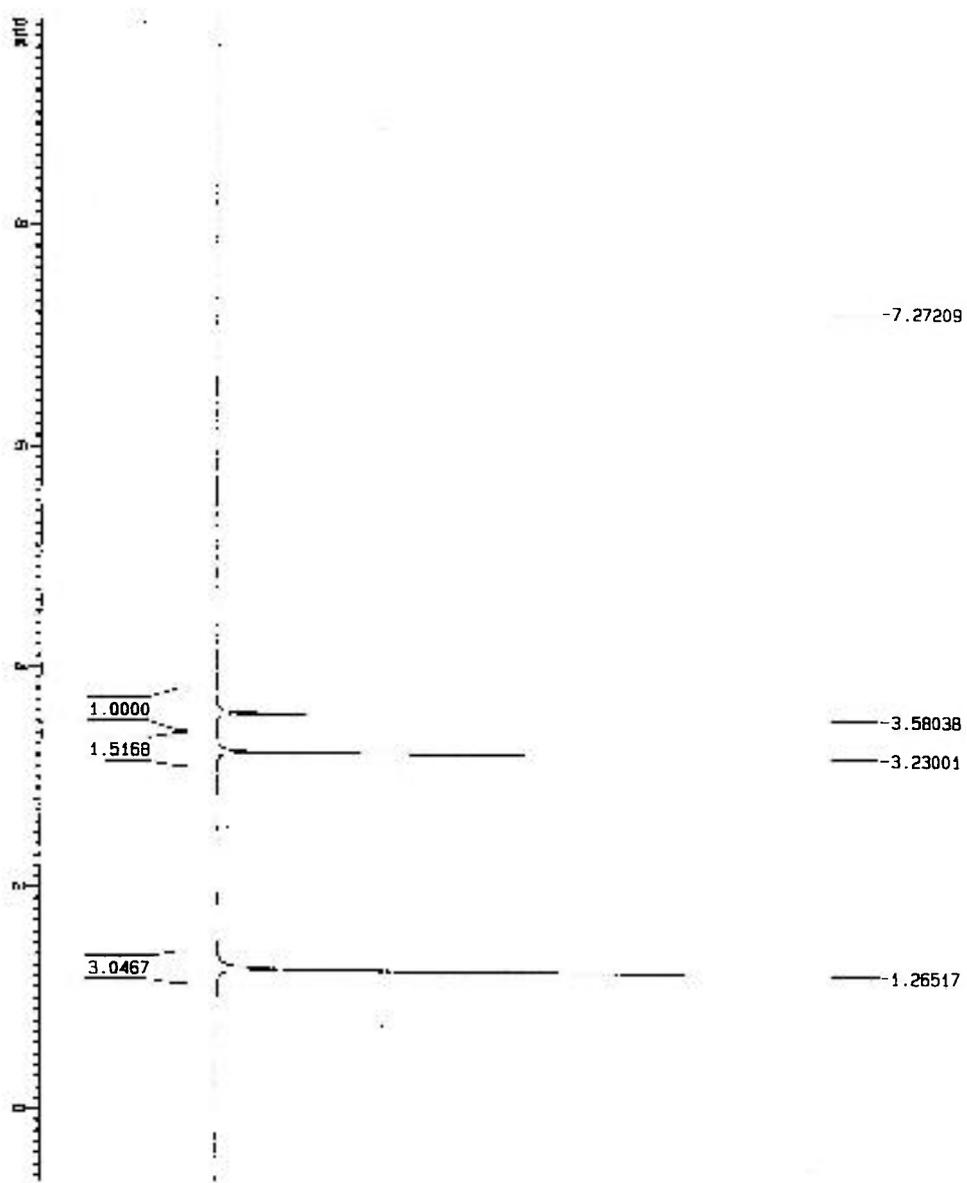


Figura 17 - RMN- ^1H em CDCl_3 do $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$ produzido em Cuba

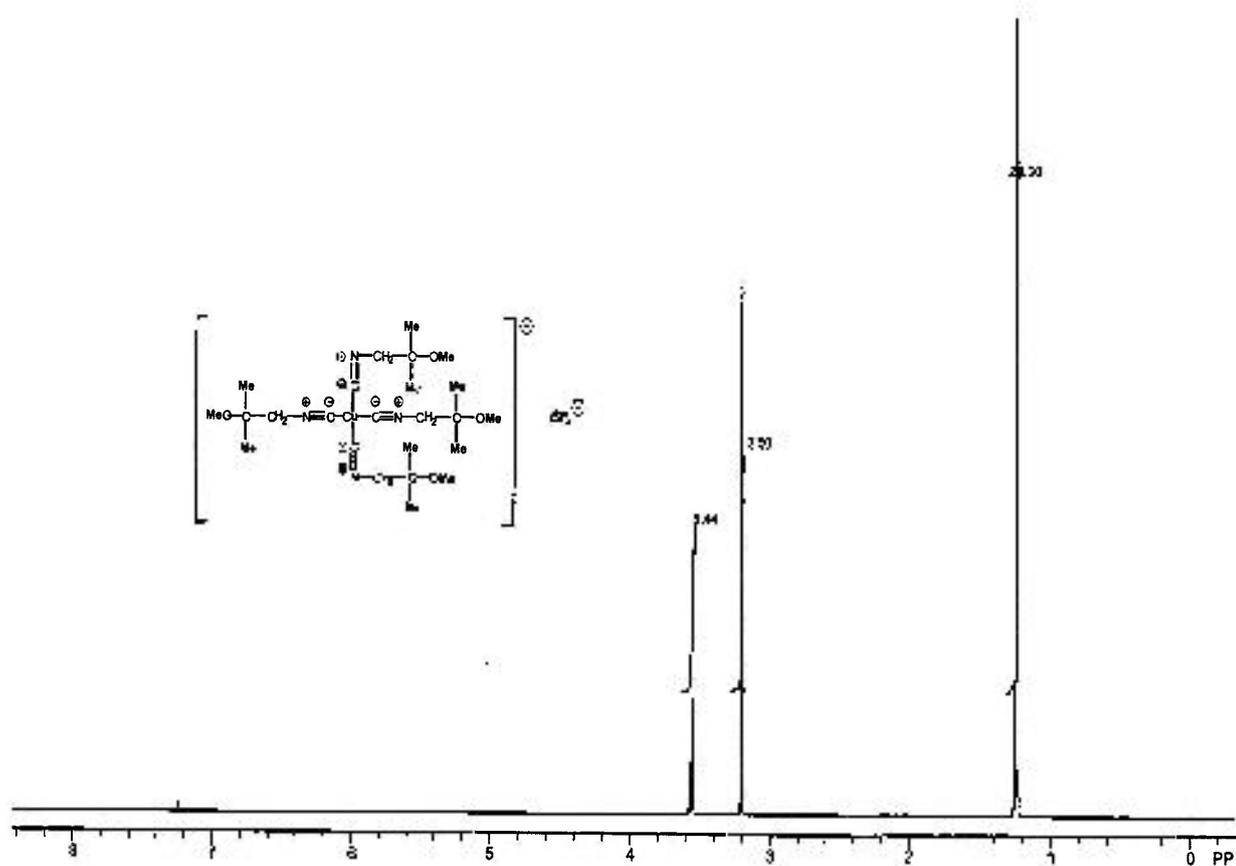


Figura 18- RMN- ^1H em CDCl_3 do $\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$, amostra ABX-Alemanha

4.7 FORMULAÇÃO E MARCAÇÃO DE REAGENTES LIOFILIZADOS [“KITS”] DE TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I) TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL ISONITRILA) - (Cu[MIBI]₄BF₄)

Após a caracterização do sal quelato de MIBI- Tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila) -(Cu[MIBI]₄BF₄) por meio de CLAE e RMN –H¹ e constatada a sua pureza, com os resultados comparados com amostras do produto cedido por Cuba e com a amostra obtida comercialmente da ABX (Alemanha), foi formulado o reagente liofilizado, de acordo com literatura ^(80, 81,82). A liofilização, realizada para propiciar a estabilidade no armazenamento ⁽⁸¹⁾ e posterior marcação com Tc-99m.

A formulação do reagente liofilizado contém o sal quelato de MIBI e uma quantidade de um agente redutor pré-determinada (cloreto estanoso) para reduzir o radionuclídeo selecionado (Tc-99m) ^(80,81). Um excesso do complexo de isonitrila foi misturado ao agente redutor em meio aquoso, conforme descrito no item 3.2.6. O citrato de sódio foi utilizado como agente neutralizador e estabilizador, e o cloridrato de L-cisteína e o manitol como agente transferidor e estabilizador dos íons de estanho ^(80,81,82).

Uma fração do produto foi utilizada na elaboração do reagente liofilizado (1º lote) sob as condições relatadas no item 3.2.6. e, posteriormente armazenado sob refrigeração. O rendimento deste lote foi de 85% de obtenção em frascos, utilizando 50 mg de sal de MIBI para a produção de 42 frascos do conjunto liofilizado. O restante do produto, foi mantido em dessecador sem refrigeração, devidamente armazenado em frasco hermeticamente fechado.

Após seis meses de armazenamento, outra fração do produto (2º lote), mantido no dessecador, foi novamente formulado e liofilizado nas mesmas condições do 1º lote, para verificar sua estabilidade. O rendimento manteve-se na mesma porcentagem do primeiro lote para produção de 20 frascos.

4.8 MARCAÇÃO COM Tc-99m E AVALIAÇÃO DE PUREZA RADIOQUÍMICA DOS REAGENTES LIOFILIZADOS [“KITS”] DE TETRAFLUORBORATO DE COBRE (I) TETRACIS (2-METOXI ISOBUTIL ISONITRILA)- (Cu[MIBI]₄BF₄)

A marcação do complexo liofilizado de MIBI com Tc-99m foi feita de acordo com as condições descritas no item 3.2.8.

Durante o preparo dos reagentes liofilizados foi feita uma marcação pré-liofilização para avaliação do produto final e avaliação da pureza radioquímica, antes da liofilização da fórmula.

A pureza radioquímica da marcação com tecnécio-99m do 1º lote de liofilizado foi avaliada utilizando-se cromatografia em papel Whatman 3MM, conforme procedimento relatado no item 3.2.9, obtendo-se $98,34 \pm 0,08\%$.

Após a liofilização, os reagentes de MIBI foram avaliados em sua pureza radioquímica e estabilidade, tanto para os conjuntos liofilizados logo após a síntese de sal de MIBI (lote 1) como para os conjuntos liofilizados após decorrido seis meses de armazenamento do sal em dessecador em condições anidras e atmosfera de nitrogênio (lote 2).

A tabela 3 mostra os dados da determinação da pureza radioquímica dos reagentes liofilizados do lote 1 marcado com tecnécio- 99m após diferentes tempos de estocagem, utilizando-se baixa atividade de marcação (< 366 MBq), indicando boa estabilidade do produto liofilizado.

Tabela 3- Pureza radioquímica dos reagentes liofilizados marcados com tecnécio-^{99m} x tempo de armazenamento.

Tempo de armazenamento	% PUREZA RADIOQUÍMICA (% DE MIBI- ^{99m} Tc)		
	Imediato após marcação	Após 4 horas marcação	
Pré liofilizado	98,34 ± 0,08	98,52 ± 0,23	
Liofilizado	Imediato	98,05 ± 1,45	-----
	7 dias	98,76 ± 0,01	97,68 ± 0,40
	1 mês	96,02 ± 0,07	98,28 ± 0,25
	4 meses	98,53 ± 0,08	99,17 ± 0,67
	9 meses	98,92 ± 0,05	99,11 ± 0,20
	10 meses	98,75 ± 0,05	-----
	11 meses	95,93 ± 4,07	-----

N= 2 para cada tempo

A tabela 4 expressa os resultados de pureza radioquímica, comparando as marcações realizadas com baixa e alta atividade para os lotes 1 e 2 . A tabela também permite avaliar os métodos empregados na determinação de pureza radioquímica.

Tabela 4. Pureza radioquímica do reagente liofilizado de MIBI marcado com tecnécio 99m x atividade de marcação

Método	% DE SESTAMIBI- 99m Tc			
	Marcação Baixa ¹ atividade lote 1	Marcação Alta ² atividade lote 1	Marcação Baixa ¹ atividade lote 2	Marcação Alta ² Atividade lote 2
W3 Ac.Etila/ Metanol	95,93 ± 4,07	98,38 ± 1,70	98,26 ± 1,74	98,49 ± 1,56
W3 Ac.Etila	95,65 ± 4,25	97,74 ± 2,36	98,31 ± 1,39	97,96 ± 2,04
Extração solvente CHCl₃/ salina	98,93 ± 1,07	94,70 ± 5,30	97,51 ± 2,59	98,26 ± 1,74

N= 2 para cada método

¹ 185-296 MBq/2-3 mL

² 3663-4070 MBq/2-3 mL

4.9 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

4.9.1 Estudos Invasivos

Os estudos da distribuição biológica do reagente liofilizado e marcado com tecnécio- 99m , para diferentes tempos e animais, demonstraram indicação de boa captação cardíaca, similares à literatura ^(36,62), assim como a distribuição e clareamento em órgãos.

A tabela 5 expressa, em porcentagem, os resultados dos estudos de biodistribuição em lotes de camundongos *Swiss*, em relação à dose média de captação nos órgãos selecionados, nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos, após a administração do radiofármaco SESTAMIBI- 99m Tc.

Tabela 5 - % dose/órgão em camundongos Swiss para o SESTAMIBI-^{99m}Tc

Órgão	% dose/ órgão			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos
<i>Cérebro</i>	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,02
<i>Tireóide</i>	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
<i>Pulmão</i>	0,42 ± 0,11	0,26 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,03
<i>Coração</i>	1,38 ± 0,51	1,12 ± 0,13	1,05 ± 0,13	1,05 ± 0,19
<i>Baço</i>	0,23 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,09	0,05 ± 0,01
<i>Fígado</i>	10,95 ± 2,29	10,24 ± 0,53	10,12 ± 1,87	8,86 ± 1,08
<i>Estômago</i>	1,21 ± 0,42	0,78 ± 0,22	0,67 ± 0,12	0,59 ± 0,17
<i>Rins</i>	11,49 ± 3,14	9,64 ± 2,09	9,89 ± 2,00	5,03 ± 0,76
<i>l. Delgado</i>	13,48 ± 7,02	13,88 ± 1,98	11,91 ± 0,42	12,43 ± 1,13
<i>l. Grosso</i>	2,09 ± 0,73	2,94 ± 0,98	4,89 ± 1,22	8,56 ± 1,66
<i>Sangue total</i>	0,44 ± 0,28	0,23 ± 0,08	0,10 ± 0,03	0,01 ± 0,00
<i>Músculo total</i>	23,03 ± 9,05	22,25 ± 4,53	20,68 ± 3,97	20,96 ± 3,32

Os mesmos resultados da tabela 5 podem ser visualizados na figura 21

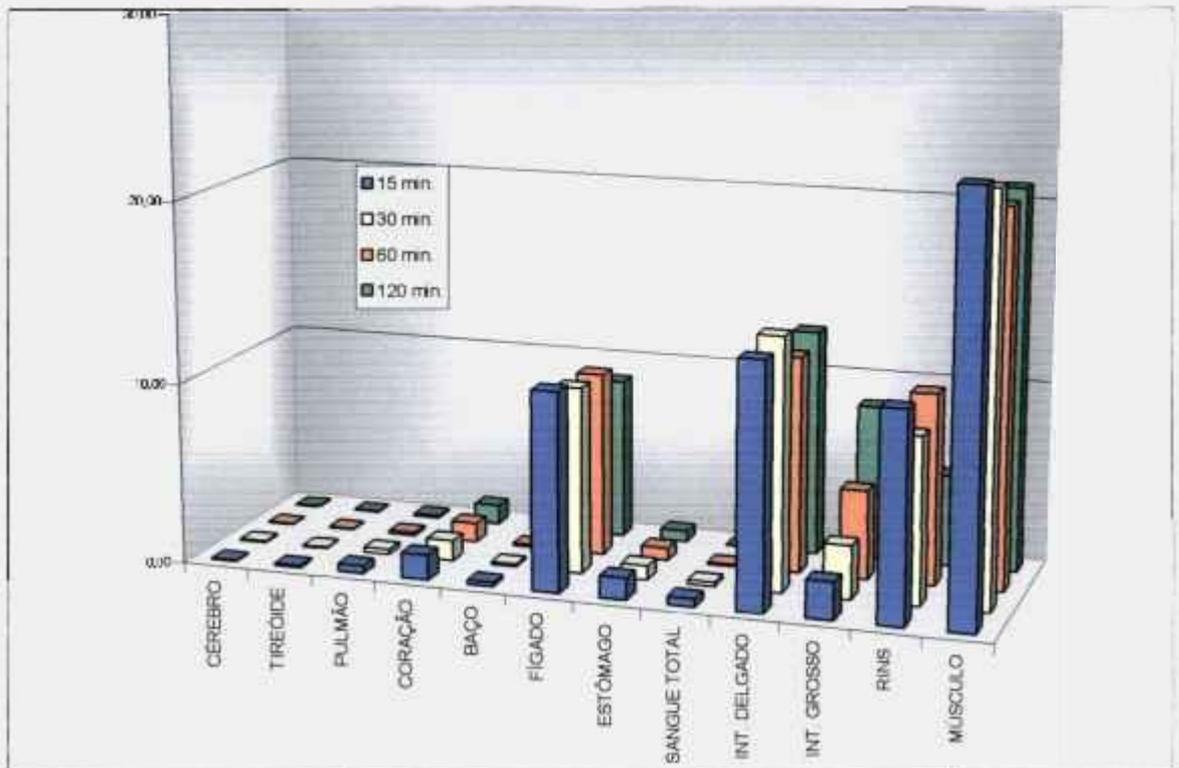


Figura 21- % dose /órgãos em camundongos Swiss para o SESTAMIBI-^{99m}Tc.

A tabela 6 e figura 22 expressam, em porcentagem dose/grama de tecido, os resultados dos estudos de biodistribuição em lotes de camundongos Swiss nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos, para o estudo do radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc.

Tabela 6- % Dose /grama em camundongos Swiss para o SESTAMIBI-^{99m}Tc

Órgão	% Dose / grama			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos
<i>Cérebro</i>	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,05
<i>Pulmão</i>	1,70 ± 0,28	0,99 ± 0,23	0,72 ± 0,25	0,48 ± 0,08
<i>Coração</i>	9,70 ± 3,42	8,96 ± 1,25	8,14 ± 0,77	8,32 ± 1,74
<i>Baço</i>	2,85 ± 0,59	1,74 ± 0,44	1,43 ± 0,81	0,63 ± 0,15
<i>Fígado</i>	7,43 ± 1,57	6,89 ± 0,72	7,81 ± 1,32	6,49 ± 0,38
<i>Estômago</i>	3,87 ± 0,82	2,74 ± 0,64	2,67 ± 0,46	2,04 ± 0,70
<i>Rins</i>	24,25 ± 7,90	26,22 ± 4,94	28,56 ± 7,65	13,79 ± 2,07
<i>I. Delgado</i>	6,34 ± 2,05	7,46 ± 1,13	6,32 ± 0,81	7,20 ± 1,36
<i>I. Grosso</i>	2,57 ± 0,52	3,67 ± 1,03	6,14 ± 1,39	11,26 ± 2,24
<i>Sangue total</i>	0,22 ± 0,13	0,12 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02
<i>Músculo total</i>	2,06 ± 0,76	2,08 ± 0,42	2,06 ± 0,47	3,00 ± 0,64

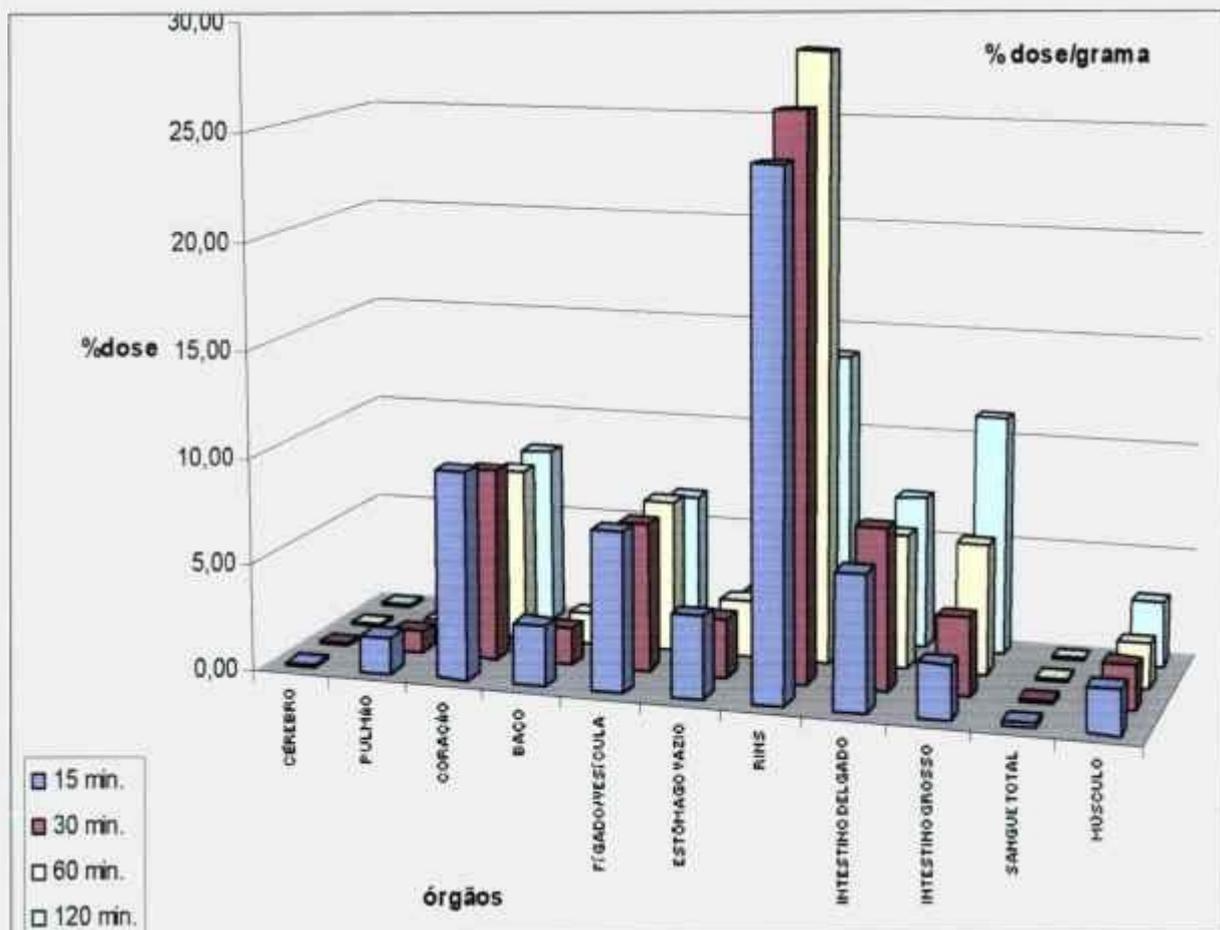


Figura 22- % dose/grama em camundongos Swiss para o SESTAMIBI-^{99m}Tc.

Para comparar a distribuição biológica (particularmente hepática) em diferentes animais, como no caso dos ratos que são desprovidos, ao contrário dos camundongos e coelhos, de vesícula biliar, foi executado um estudo de biodistribuição em ratos *Wistar* (figura 23-A). O valor da captação hepática para esta classe de animais, após 60 minutos da administração do radiofármaco, mostrou-se bastante reduzido, conforme demonstrado no gráfico exposto na figura 23.

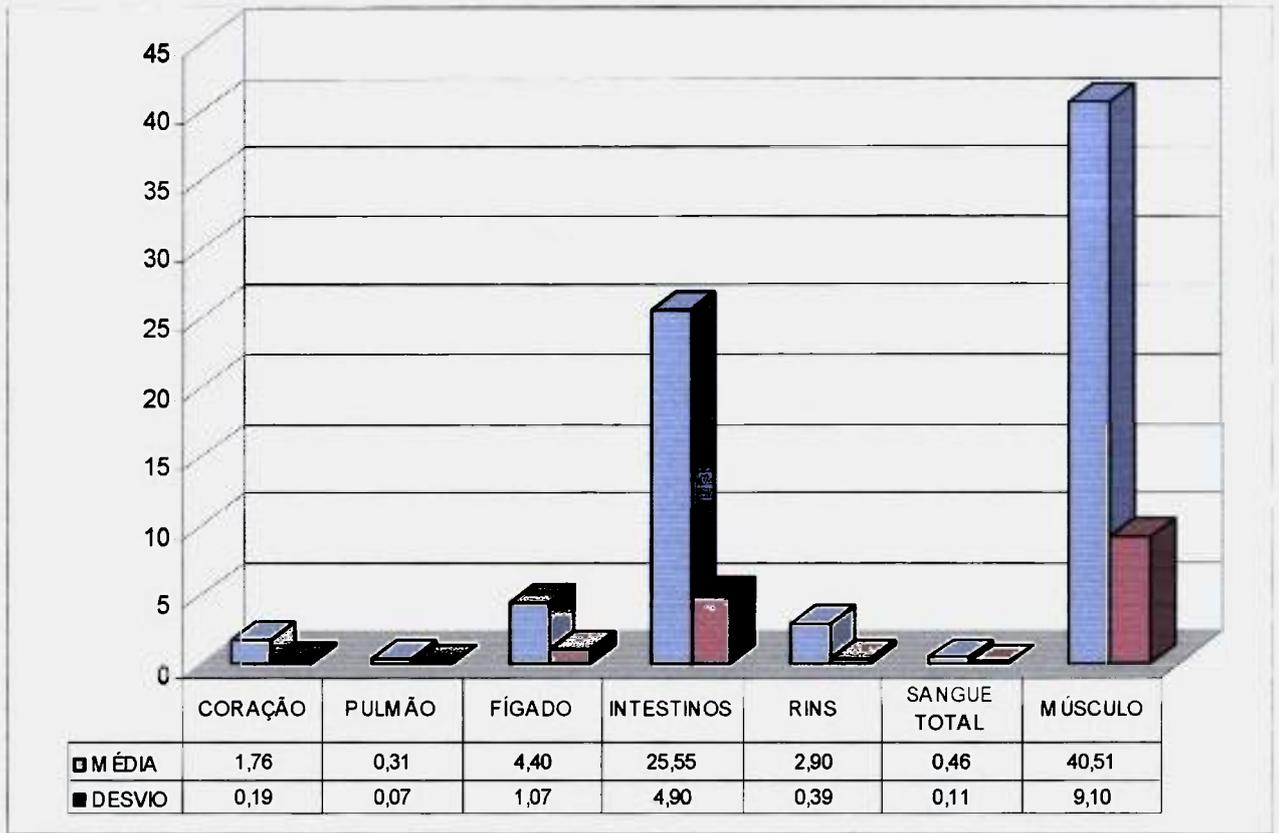


Figura 23- % dose/órgãos em ratos *Wistar* para o SESTAMIBI-^{99m}Tc

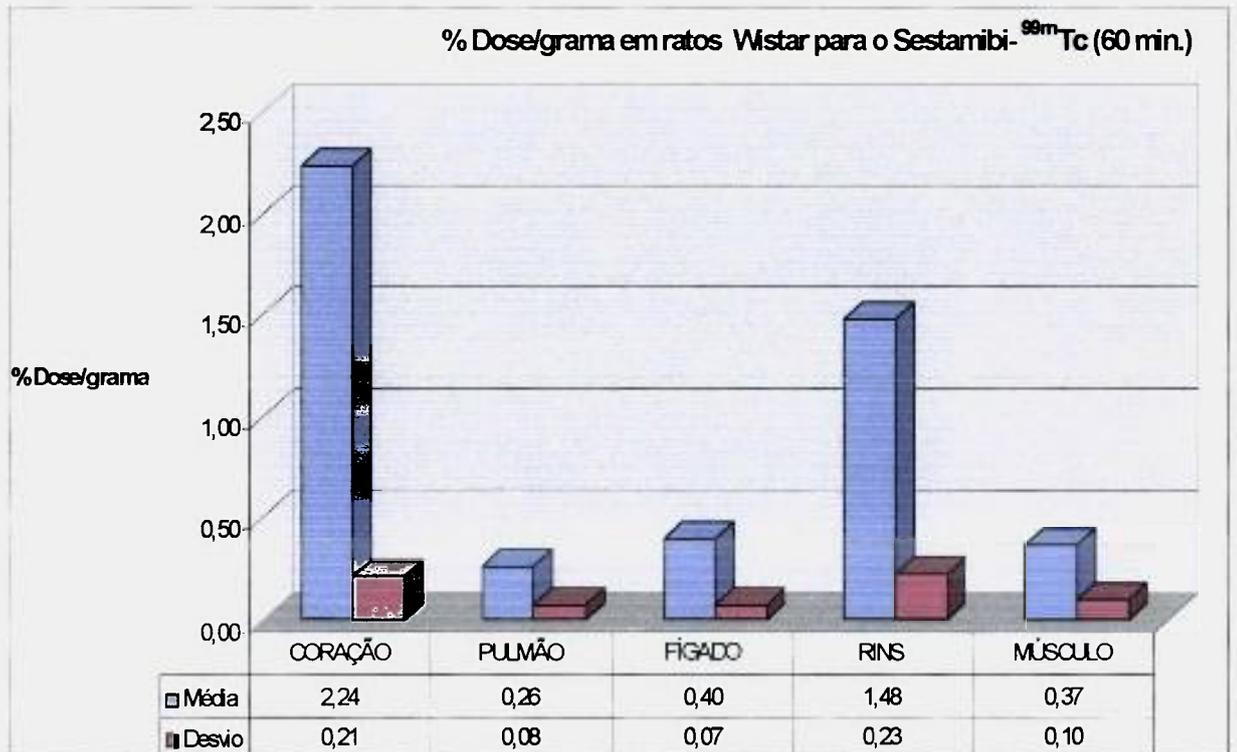


Figura 23-A- % dose/grama em ratos *Wistar* para o SESTAMIBI-^{99m}Tc.

As razões coração/fígado determinadas a partir dos valores expressos em % dose/grama de tecido dos ratos (figura 23-A) e camundongos para o tempo de 60 minutos e coelhos para o tempo de 30 minutos foram respectivamente de 5,6; 1,3 e 1,4 como demonstrado na figura 24 .

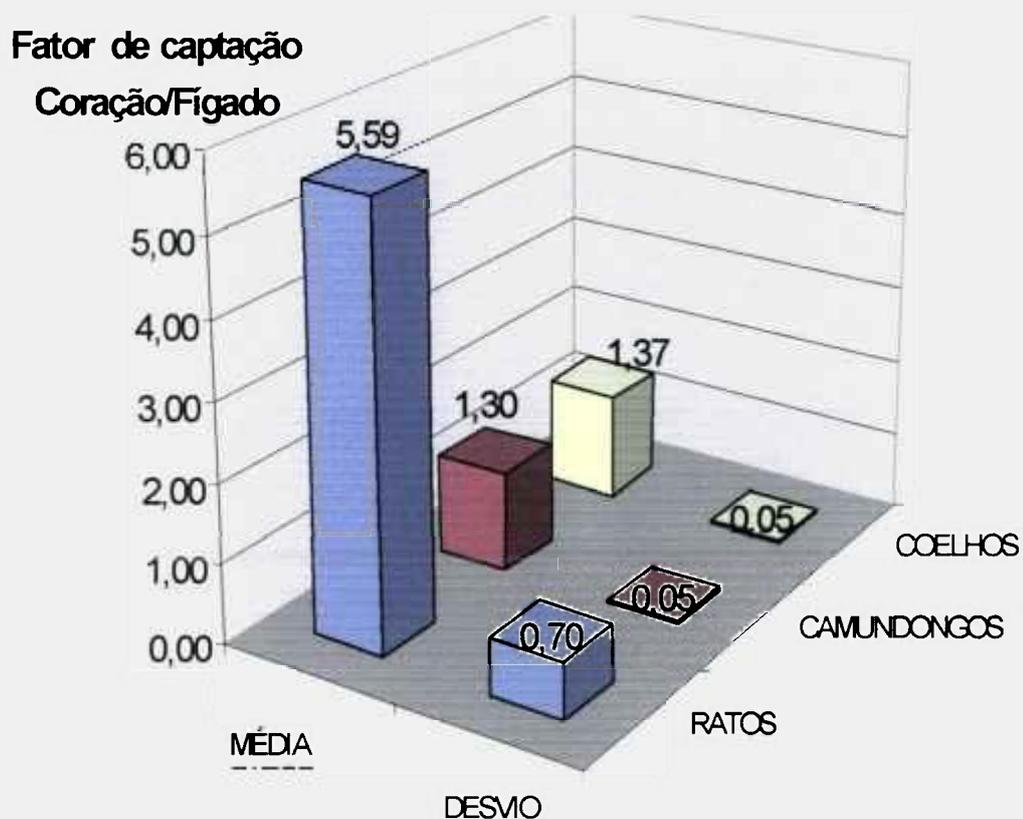


Figura 24- Análise comparativa da razão coração /fígado dos valore expressos em % dose/grama de tecido após administração do SESTAMIBI-^{99m}Tc, em diferentes animais.

Os valores obtidos na razão coração/pulmão para camundongos e ratos, em %dose/grama de tecido, após 60 minutos da administração de SESTAMIBI-^{99m}Tc foram de 11,3 e 8,6 respectivamente, conforme demonstrado pelo gráfico na figura 25.

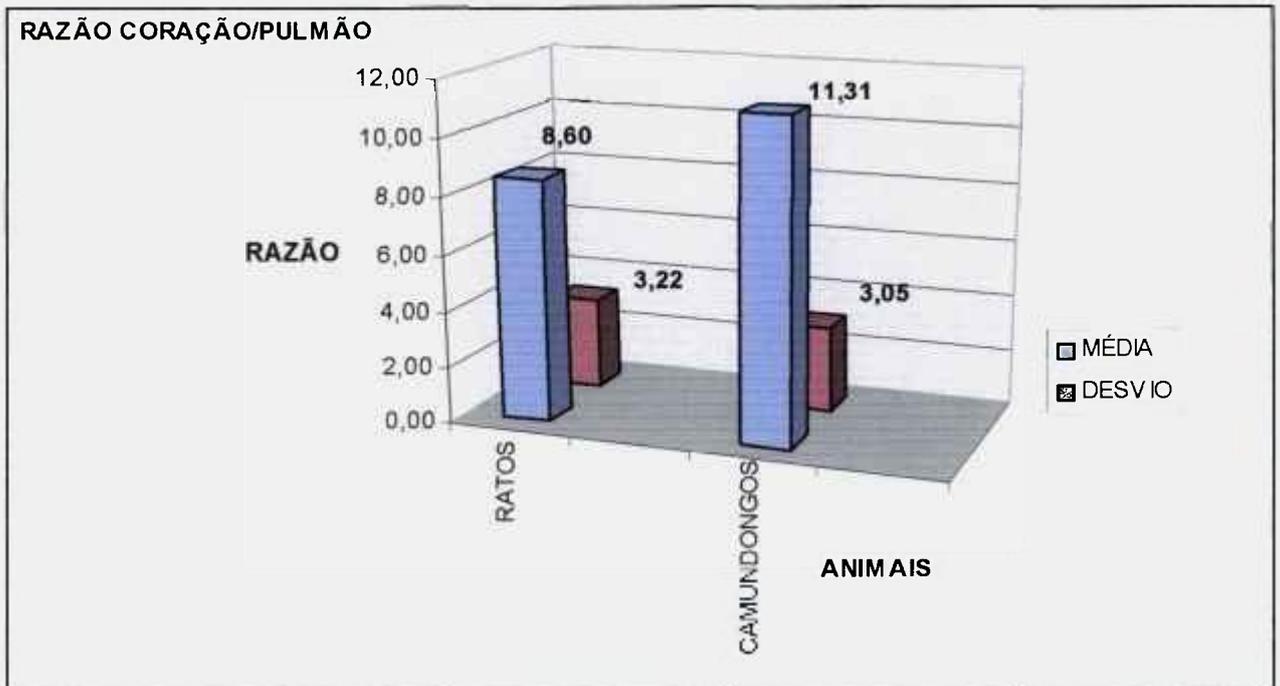


Figura 25- Análise comparativa da razão coração /pulmão dos dados de camundongos e ratos expressos em % dose/grama de tecido após 60 minutos de administração do SESTAMIBI-^{99m}Tc.

4.9.2 Estudos cintilográficos

Os estudos cintilográficos foram feitos em dois coelhos de idades diferentes, para obtenção de imagens cintilográficas e avaliação da biodistribuição do radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc.

A figura 26 e 27 representam o estudo dinâmico (fluxo) do radiofármaco, sequencial de 30 imagens cintilográficas obtidas a cada minuto sucessivo à administração intravenosa do complexo para cada coelho.

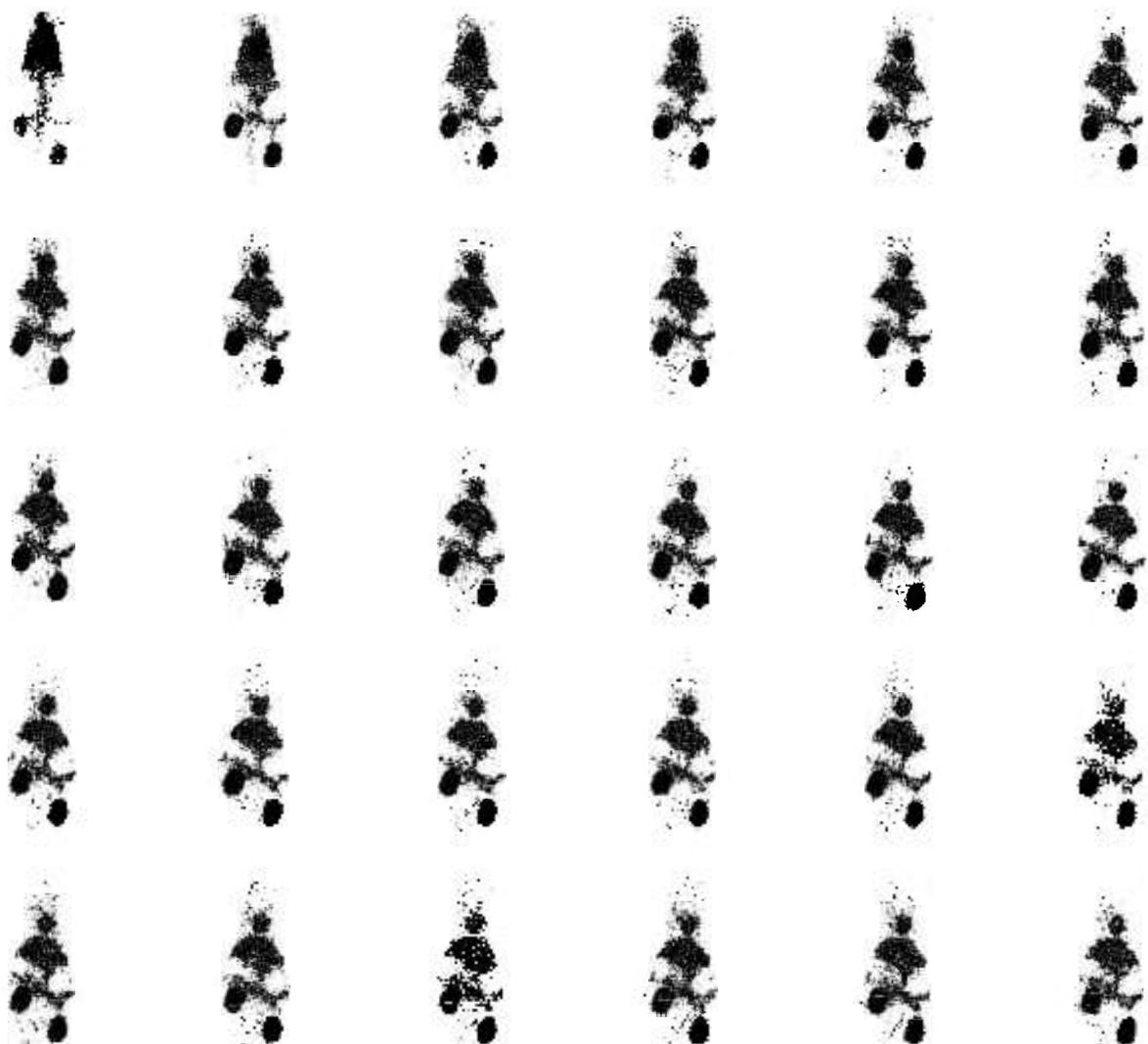


Figura 26- Estudo dinâmico : distribuição do complexo Sestamibi-^{99m}Tc em coelho de 1 ano e seis meses de idade , durante 30 minutos, em intervalos de 1 minuto por imagem.

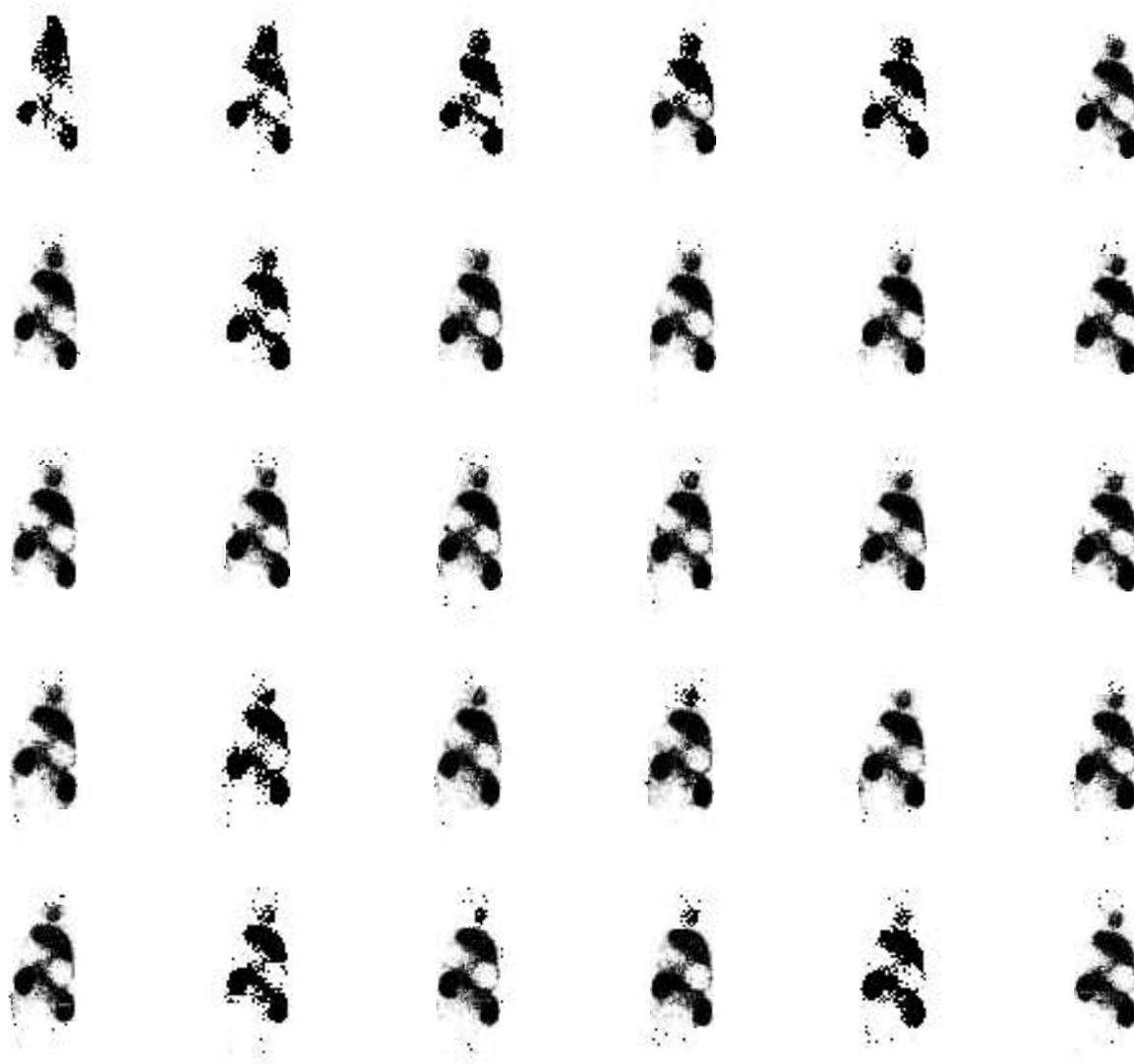


Figura 27- Estudo dinâmico : distribuição do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc em coelho de 5 anos de idade , durante 30 minutos, em intervalos de 1 minuto por imagem.

As figuras 28 e 29 representam as imagens cintilográficas estáticas adquiridas após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração da dose.

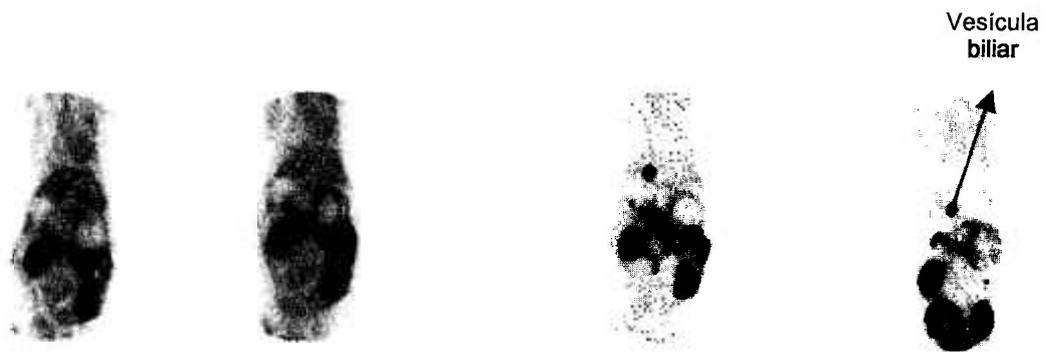


Figura 28- Estudo estático: distribuição do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc em coelho após 15, 30, 60 e 120 minutos (da esquerda para direita respectivamente) da administração da dose, para o coelho com a idade de 1 ano e seis meses.

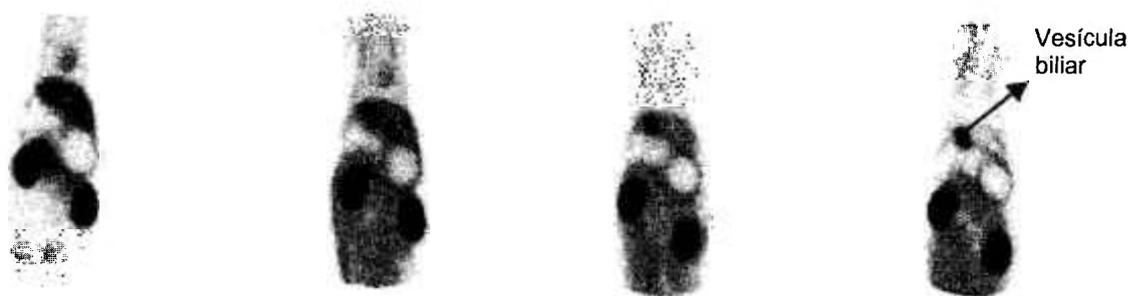


Figura 29- Estudo estático: distribuição do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc em coelho após 15, 30, 60 e 120 minutos (da esquerda para direita respectivamente) da administração da dose, para o coelho com a idade de 5 anos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

O radiofármaco SESTAMIBI-^{99m}Tc apresenta interesse e aplicação na rotina clínica em Medicina Nuclear, especialmente para avaliação da função do miocárdio, além de aplicação no diagnóstico diferencial de alguns tipos de tumores ^(44,46,45,81).

O Centro de Radiofarmácia do IPEN possui interesse no desenvolvimento deste radiofármaco para atendimento das necessidades da classe médica nuclear.

O objetivo deste trabalho foi promover a síntese e caracterização do composto ativo Tetrafluorborato de Cobre (I) Tetracis (2-Metoxi isobutil isonitrila)-(Cu[MIBI]₄BF₄), realizada de acordo com procedimento descrito por diversos autores em 5 etapas, visando o preparo de reativos liofilizados para marcação com tecnécio-99m e a realização de estudos de marcação, estabilidade e distribuição biológica do composto.

5.2 Etapas da síntese do Tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila) -(Cu[MIBI]₄BF₄)

O produto de partida para a síntese do composto Tetrafluorborato de cobre (I) tetracis (2-metoxi isobutil isonitrila) -(Cu[MIBI]₄BF₄) é uma amina que foi obtida, na etapa I, utilizando a síntese de aminas mediante métodos não redutivos ^(29,31).

A síntese de Gabriel de aminas primárias foi uma metodologia empregada no preparo da amina primária sem nenhuma contaminação de aminas secundárias ou terciárias, fenômeno este que não ocorre com alquilação do amoníaco ^(29,31,32).

Este método usa o ânion ftalimida potássica para reagir com o haleto de alquila (3-cloro-2-metil-1-propeno) em uma reação que envolve o ataque do tipo S_N² ao carbono ligado ao halogênio. O produto da reação é uma N-alquifftalimida. A reação pára no processo de monoalquilação, porque a N-

O Ipen mantinha em seu estoque uma amostra do produto, que foi submetido à análise de ponto de fusão e I.V. para verificar sua integridade. Isto feito, os resultados obtidos com a amostra do produto da marca Sigma Aldrich foram utilizados para formar um padrão comparativo com o produto sintetizado.

O produto [1], cloridrato de N-(2- metilalil) amina, foi sintetizado em duplicata para obter-se a quantidade necessária para a segunda etapa. Foi feita uma tentativa de obtenção de um rendimento maior do produto com a duplicação da quantidade de reagentes/solventes e adequando os procedimentos e técnicas de laboratório, mas o resultado final foi de apenas 17% de rendimento, sendo mais vantajoso seguir o procedimento com as quantidades relatadas em literatura, uma vez que os rendimentos da síntese do produto [1], executada em duplicidade, foram satisfatórios para o prosseguimento da síntese do sal de MIBI.

Na etapa II, a formação da amida foi obtida por meio de uma reação de formilação utilizando-se o etilformiato em excesso como agente formilante, para produzir a formamida ^(85, 86).

As funções amidas caracterizam-se por possuírem o grupo carbonila diretamente ligado ao nitrogênio. As amidas podem ser sintetizadas a partir de aminas, neste caso amina primária com etilformiato em temperaturas abaixo de 100° C, em meio anidro ^(85,86).



Os compostos N-formilas são usados em síntese orgânica como um grupo protetor de aminas, precursor para preparação de isonitrilas como intermediários de produtos a partir de aminas primárias catalisador para alilação ou redução. Inúmeros métodos de formilação têm sido relatados ^(14,40,78).

O anidrido fórmico acético continua a ser o reagente de formilação mais usado. De acordo com Jung e col., a reação de aminas com ácido fórmico apareceu em 1955, quando Fieser relatou que aminas reagem com ácido fórmico na obtenção N-metil formamida. Ainda de acordo com o mesmo autor, o uso em excesso do etilformiato sob refluxo propicia pequenas quantidades do produto desejado, devido racemização do produto ⁽⁸⁷⁾.

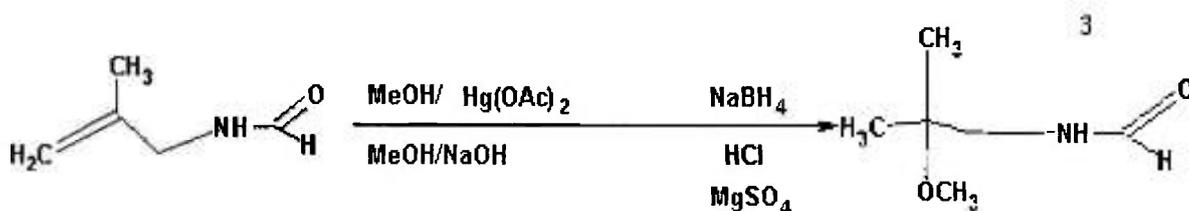
De acordo com protocolo, utilizado nesta etapa e baseado no documento técnico emitido pela IAEA ⁽⁶²⁾, a síntese foi reproduzida 8 vezes com rendimento inicial baixo (em torno de 40%) porém, após adequação de técnicas, equipamentos e vidrarias obteve-se maior rendimento (60- 70%) nas sínteses posteriores do produto [2]. Em literatura ^(14, 40 62, 78), são citadas diferentes variações de técnicas e reagentes para obtenção desta fase intermediária do MIBI relatando-se rendimentos de 69 % ⁽⁸⁵⁾ até 90%, algumas com adição de uma etapa para formar a N-(2-metilalil) amina livre e então prosseguir a reação de formilação da amina ⁽⁸⁸⁾.

A opção pela rota de síntese clássica ⁽⁶²⁾, embora não reproduzindo o rendimento teórico relatado, possibilitou a obtenção do produto [2] com boa pureza química e em quantidades adequadas para o prosseguimento da etapa III, produção de N-(2-metoxi isobutil) formamida, conforme demonstrado pela identificação das bandas dos grupamentos característicos ao produto II, similares aos indicados em literatura ^(40, 78, 85, 86).

Na terceira etapa da síntese, a entrada do grupamento metóxi (OCH_3) em olefinas é obtida por meio de reação de adição do tipo eletrofílica, tendo como base o método Markovnikov, que é regioseletiva por meio da síntese de éteres por alcoximercuriação- desmercuriação ^(89, 90, 91).

Esta reação permite a hidratação de alcenos com o reagente $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, em presença de um álcool, com a formação de um íon mercúrio cíclico (intermediário), que é aberto com o ataque do álcool para completar a alcoximercuriação. O acetato de mercúrio, ao se ligar à amida, rompe a dupla ligação, promovendo carga positiva no carbono 2, possibilitando a entrada do grupo metoxi (OCH_3) ⁽¹⁴⁾.

Na desmercuriação ocorre a redução deste composto com NaBH_4 , permitindo a obtenção de éteres. Nesta etapa, ocorrem reações fortemente exotérmicas que tiveram a temperatura controlada por meio de banho de gelo e adição lenta dos reagentes. O grupo alila produz um boa quantidade de produto hidratado resultando em diól, dependendo da base utilizada para a reação. O grupamento metóxi introduzido em alcenos tem efeito I⁻ ^(89, 90).

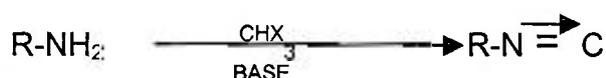


O mercúrio recupera-se sob a forma de uma bola de Hg elementar ⁽⁹²⁾ que é separada por celite®, que é um polímero sob forma de pó que tem afinidade por mercúrio. Para diminuir a contaminação com o produto a operação de filtragem foi repetidas diversas vezes e, embora o mercúrio seja altamente contaminante, o seu ponto de ebulição é muito alto (357°C) para contaminar o produto que tem temperatura para destilação inferior (purificação por destilação do produto 3 em temperatura de 100-110°C em pressão reduzida) do ponto de ebulição do mercúrio.

Nesta etapa, o produto N-(2-Metoxi isobutil) formamida foi obtido com um rendimento médio de 48%, de acordo com a literatura ^(40,94), que relata rendimentos entre 32 - 47%. Como na etapa II, a adequação na vidraria e equipamentos, na repetição das etapas, melhorou o rendimento que foi adequado para prosseguimento da síntese do MIBI.

A caracterização de N-(2-Metoxi isobutil) formamida no infravermelho mostrou as bandas de absorção dos grupamentos característicos ao produto conforme relatado em literatura ^(40, 93).

Na quarta etapa da síntese o produto resultante MIBI teve como base o método modificado de Hofmann-Gautier, que emprega uma amina primária para a obtenção de uma isonitrila com baixo ponto de ebulição ^(93, 94)



O produto [4], 2- metoxi isobutil isonitrila, de formula molecular C₆H₁₂NO e peso molecular de 113,16 g sob forma de um óleo viscoso incolor, com odor característico das isonitrilas é altamente volátil ^(62,94)

A síntese de carbilaminas de Hoffmann é um dos dois métodos clássicos para a preparação de isonitrilas⁽⁹⁴⁾, dificilmente empregada por causa dos baixos rendimentos e dificuldades experimentais.

Alguns métodos propostos com alto rendimento e menor dificuldade experimental não são reprodutíveis⁽⁹⁴⁾.

A síntese de isonitrilas a partir de formamidas N-monosubstituídas usando oxiclreto de fósforo como um agente desidratante é trabalhosa, segura (algumas utilizam reagentes mais críticos) e a mais utilizada para obtenção de maiores quantidades de isonitrilas⁽⁹⁵⁾.



O método pode produzir rendimentos de 58-95% em isonitrilas alifáticas em geral⁽⁹⁵⁾.

As isonitrilas são especialmente importantes devido à sua reatividade bifuncional, nucleofílica e eletrofílica durante a reação. São relatados numerosos métodos para a síntese de isonitrilas, com diferentes rendimentos e teor de pureza^(94, 96,97,98).

Uma das dificuldades nesta etapa de síntese do MIBI é a reação com oxiclreto de fósforo porque forma-se HCl e o ácido excedente livre pode dificultar a formação do complexo, pois os ácidos são incompatíveis com as isonitrilas convertendo-as em aminas em determinadas condições.

Nesta etapa, a fase mais crítica foi durante a última purificação, por destilação fracionada para separar o produto dos demais reagentes como piridina e benzeno pois, por ser extremamente volátil, o produto deve ser recolhido em meio anidro, gelado, em atmosfera de nitrogênio e pressão reduzida. A piridina é uma base mais fraca do que aminas alifáticas, tem um par de elétrons que pode compartilhar com ácidos e tem propriedades nucleofílicas^(99,100). O ponto de ebulição da piridina é bastante próximo do MIBI e com o benzeno forma uma mistura azeotrópica tornando a etapa final de purificação bastante crítica e decisiva para o sucesso da síntese⁽⁴⁰⁾.

Após alguns insucessos na purificação final do MIBI, foi feita uma destilação teste somente com a piridina para verificar as condições, adequando

os equipamentos e vidrarias disponíveis, para observar ponto de ebulição e vácuo corretos de modo a diferenciar das condições de destilação do produto MIBI. Da destilação final do produto MIBI, que foi recolhido em oito frações, apenas as 4 últimas foram aproveitadas, todas as amostras foram analisadas para constatar a sua pureza.

Esta separação do MIBI e da piridina é fundamental para a quelação do MIBI com o aduto de cobre, tetrafluorborato de cobre (I) tetra(acetonitrila), para a preparação de tetrafluoroborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) , pois a presença da piridina como contaminante, na etapa 5B, impede a formação do complexo desejado. Por estas condições delicadas e necessárias à obtenção do MIBI, a última purificação foi executada imediatamente após a obtenção do aduto tetrafluorborato de cobre (I) tetra(acetonitrila), etapa 5 A.

Existem vários relatos ^(40,85,101) sobre diversas modificações para esta etapa , com indicação de outros solventes de menor toxicidade em substituição à piridina e benzeno como o diclorometano e trietilamina, embora com citações de rendimentos próximos aos da rota da piridina/benzeno (em torno de 31-58%). Neste sentido foi feita uma tentativa de síntese, utilizando-se diclorometano e trietilamina, que foi sem sucesso pois não foi obtido qualquer produto final, embora a síntese tenha transcorrido de acordo com o descrito na rota **alternativa**^(40,76,77).

Outra condição bastante citada para obtenção de pequenas quantidades de isonitrilas é o tratamento de formamidas com cloreto de p-tolueno sulfonila e piridina que apresenta rendimento razoável e com boa pureza ^(93,94,95), mas os rendimentos experimentais apresentados em literatura indicam valores mais baixo (de 7-20%) do que a rota utilizando-se piridina/benzeno ^(76,78). A manipulação e purificação nesta reação é problemática devido à reatividade das isonitrilas.

No emprego desta rota, recentemente relatou-se o uso de polímeros filtrantes que permitem a passagem de p-tolueno sulfonila para remover a piridina, como um método mais eficiente de purificação demonstrando rendimentos superiores na obtenção da isonitrila ⁽¹⁰²⁾.

As diversas modificações e variações desta etapas descritas em literatura, indicam as dificuldades representadas na obtenção do produto [4], 2-

metoxi isobutil isonitrila (MIBI), substrato para produção do Tetrafluoroborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila). No nosso caso foi obtido com um rendimento médio de 35%, dentro dos valores informados em literatura, para a rota, utilizando os reagentes piridina, benzeno e oxicloreto de fósforo, que relata rendimentos entre 32 - 47%^(19, 62).

O MIBI foi analisado apenas pela técnica de CLAE por se tratar de um produto tóxico, altamente volátil e de odor extremamente forte característico das isonitrilas, utilizando como padrão comparativo uma amostra do produto obtido comercialmente da empresa ABX (Advanced Biochemical Compounds-Alemanha) com teor de pureza de 97%. Os resultados foram comparados revelando valores similares de tempos de retenção para ambos, tornando o produto adequado para prosseguimento da síntese.

Iqbal e col.⁽⁸¹⁾ descrevem o preparo do aduto de cobre e isonitrila usando o ânion BF_4^- , para obtenção de um sal estável para armazenamento. Adutos metálicos solúveis, que usam metais como o cobre, são obtidos pela mistura com um complexo de metal deslocável para formar um complexo de coordenação com um ligante que será posteriormente substituído pela isonitrila⁽⁸⁰⁾, em meio e temperatura adequados. Na primeira parte da quinta etapa foi preparado o aduto de cobre (I) solúvel utilizando como ligante a acetonitrila, conforme literatura^(85,103).



O complexo de MIBI com o sal tetrafluorborato de cobre (I) é a forma mais estável e adequada para a formulação de reagentes liofilizados de MIBI para uso médico⁽⁷⁷⁾.

Existem diversas literaturas^(40,62,104) sobre formação do complexo utilizando o cobre sob forma de cloreto, facilmente preparado em condições simples e rápidas, porém geralmente utilizado para pesquisas, porque sob esta forma o sal não é estável para armazenamento ou estoque.

O aduto de cobre é extremamente sensível ao ar, tomando uma coloração verde, resultado da oxidação do cobre I para II. Desta forma, imediatamente após obtenção foi colocado com o próprio filtro dentro de

dessecador em meio nitrogenado e mantido desta forma até o uso para quelação com o MIBI, dificultando a pesagem da massa obtida, que foi estimada em torno de 3 g. O rendimento obtido foi suficiente para a preparação do sal de MIBI, que consome 0,61 g para cada 1 g de MIBI.

Na segunda parte da quinta etapa, finalmente, foi executada reação de complexação do aduto de cobre solúvel e o MIBI recém preparados para formar um complexo de coordenação tendo como ligante a isonitrila ^(80,81). Ocorrendo a substituição da acetonitrila no aduto de cobre(I) pela isonitrila, formando o produto final, tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) - (Cu[MIBI]₄BF₄).

Em literatura, o rendimento médio, do produto final sob a forma do sal tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila) -(Cu[MIBI]₄BF₄) é variável abrangendo valores de 50% à 97% ^(76,77,78,80,81). Embora o rendimento tenha sido um pouco abaixo dos valores citados em literatura, foi considerado satisfatório em função da pureza, demonstrada por outras análises como IV,CLAE, RMN-H⁻¹. Foram analisados os espectros de IV para o produto sob forma de sal, tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila), produzido no IPEN e uma amostra produzida e cedida por Cuba, e ambas demonstraram possuir os grupamentos ^(76,77, 78,80, 81, 105,106) que caracterizam o MIBI. O espectro de absorção do infravermelho das isonitrilas é caracterizado pela banda 2190-2195 cm⁻¹ ^(62, 76, 78).

A dificuldade desta etapa está na obtenção do MIBI livre de qualquer resíduo de piridina, caso contrário forma-se um complexo azul de difícil separação do produto principal, Cu[MIBI]₄BF₄ e o meio em que ocorre a reação que deve ser em atmosfera de nitrogênio, anidro e com procedimentos rápido, porque a o MIBI (como algumas isonitrilas) é extremamente volátil em temperatura ambiente ^(62, 79). Com o MIBI puro e a execução da reação em condições apropriadas descritas, a reação de substituição com a acetonitrila do aduto transcorre de forma adequada com obtenção do produto com um rendimento razoável.

Para a formulação de um conjunto liofilizado, é necessário que o ligante, que é um líquido extremamente volátil, esteja em forma estável preservado em forma de um complexo não volátil, que possa liberar a isonitrila sob determinadas condições de reação para a complexação com TcO₄⁻ (pertechnetato) ^(107,108,109).

A literatura ^(80,81,105, 106) descreve o complexo de coordenação de uma isontrila com um metal radioativo (radionuclídeo) selecionado a partir de uma classe de isótopos radioativos como de Tc e métodos que usam para tais complexos. Preferencialmente, os complexos de isonitrilas contêm um metal não radioativo em que o local de coordenação é ocupado com um ligante isontrila. O ligante isontrila pode ser tanto monodentado como polidentado. O conjunto liofilizado contém um ligante isontrila e um agente redutor capaz de reduzir o metal radioativo para formar o complexo coordenado⁽⁸¹⁾.

Por causa da disponibilidade de suprimento de Tc-99m em laboratórios clínicos na forma de pertecnetato, que pode ser obtido do gerador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc produzido pelo IPEN, assim como a meia-vida desejável e energia de raios gama deste radionuclídeo, os complexos com este radionuclídeo são os preferidos para o uso em "kits".

Os composto de isonitrilas são ligantes σ doador e π acceptor que podem ser utilizados no desenvolvimento de complexos metálicos estáveis, por sua alteração no comportamento químico, especialmente nas propriedades lipofílicas em complexos formados com Tc-99m ⁽⁷⁹⁾.

Os adutos metais-isonitrilas quando combinados em meios adequados com o metal radioativo escolhido, neste caso o Tc-99m, induzem o deslocamento do metal pelo metal radioativo em uma temperatura apropriada para produzir rapidamente o radiofármaco para uso clínico ^(81,106).

O aduto de cobre (I) complexado com o ligante isontrila MIBI e o ânion BF_4^- , ligante é uma forma estável, preservada sob forma de um complexo não volátil, para que possa liberar a isontrila sob determinadas condições de reação para a complexação com TcO_4^- (pertecnetato) ⁽¹⁰⁷⁾.

5.3 Formulação e marcação

Os compostos marcados com Tc-99m preparados a partir de "kits" não radioativos e pertecnetato (TcO_4^-) geralmente dependem da eficiência e concentração do agente redutor em quantidade adequada para reduzir o radionuclídeo. A forma reduzida de Tc-99m é ligada ao agente quelante e quando a redução é incompleta pode surgir as impureza radioquímicas como TcO_4^- ou Tc-99m não reduzido ^(79,108, 110).

A disponibilidade de SESTAMIBI-^{99m}Tc é limitada, principalmente em emergências devido ao tempo de preparo de reconstituição do Kit, que requer 10 min de tempo de ebulição em banho de água e 30 min. de análise de pureza radioquímica, em literatura é citado o uso de microondas para aquecimento do produto marcado e uso de um sistema de mini-papéis cromatográficos para minimizar este tempo de procedimento de preparo ⁽¹⁰⁹⁾.

A porcentagem média de marcação para o estudo da estabilidade do produto (tabela 1 e 2, item 5.2) utilizando-se o método cromatográfico com papel W3MM indicou que a pureza radioquímica em relação ao tempo de armazenamento e liofilização e atividade de marcação, durante o período de 11 meses, permaneceu na média de 98%, considerado dentro dos relatos em literatura ^(20, 79,108,109, 110,111).

A porcentagem média de marcação para o método por extração com solventes CHCl₃/salina mostrou-se baixa, nas primeiras marcações do produto do lote 1 com o Tc-99m em baixa atividade para o método, que após adequação da técnica, mostrou o rendimento disposto na tabela 2, indicando uma pureza radioquímica adequada à literatura ^(20,67,110) e o relatado pelo fabricante do produto comercial Cardiolite® que recomenda a pureza mínima aceitável de 90% ⁽⁶⁷⁾.

Os resultados demonstrados nas tabelas 3 e 4 são indicativos de um radiofármaco qualificado com alto teor de pureza e de real estabilidade e que a concentração radioativa de tecnécio 99m não interferiu na pureza radioquímica de SESTAMIBI-^{99m}Tc.

5.4 Estudos de biodistribuição

Estudos preliminares da distribuição biológica do reagente recém liofilizado e marcado com tecnécio- 99m, administrado intravenosamente em camundongos normais da raça Swiss, demonstraram resultados bastante encorajadores com resposta indicativa de boa captação cardíaca, similares à literatura ^(15,62,79), assim como a distribuição e clareamento em órgãos, que poderia interferir na qualidade de imagens.

A distribuição biológica do complexo SESTAMIBI-^{99m}Tc após a administração intravenosa em camundongos Swiss apresentou depuração

sangüínea extremamente rápida com captação pelo tecido do miocárdio persistente, mantendo-se, praticamente estável durante o período experimental, de acordo com os resultados observados na figura 21 e 22 e tabela 5 e 6 no item 4.9. Tais dados corroboram com os estudos citados por diferentes autores (79, 77, 79, 111, 112)

Os sistema de excreção do complexo demonstrou ser pela duas rotas, urinária e intestinal, entretanto, devido a sua alta lipofilicidade, a predominância mostrou ser a rota hepato-intestinal, conforme evidenciado pelo acúmulo gradativo da radioatividade no decorrer do tempo experimental, na região do intestino.

Sabe-se que, a alta concentração encontrada no fígado é um fator indesejável. Particularmente em camundongos, devido a sua estrutura anatômica, na qual, a vesícula biliar encontra-se inserida na parte medial do fígado, conseqüentemente torna-se uma rota obrigatória da transferência do radiofármaco para o intestino.

No estudos em ratos, o valor da captação hepática mostrou-se bastante reduzido porque essa classe de animais é desprovida desse mecanismo por causa da ausência da vesícula biliar (figura 23).

A razão coração/fígado determinada a partir dos valores expressos em % dose/órgão de tecido dos ratos e camundongos para o tempo de 60 minutos e coelhos para o tempo de 30 minutos foram respectivamente de 5,6; 1,3 e 1,4 como demonstrado na figura 24 e comparando os fatores para os diferentes animais observa-se a concentração na vesícula biliar já citados em literatura também para outros animais como coelhos gatos e cães^(112, 113)

A particularidade essencial do radiofármaco foi atestada com a baixa captação pulmonar que, associados à razão coração/pulmão de 11,7 e 8,4, respectivamente para camundongos e ratos (figura 25), sugere a possibilidade de aquisição de imagens cintilográficas de boa resolução.

As imagens confirmaram o padrão de rápido clareamento sanguíneo e hepático. Nas imagens mais tardias identificou-se a persistente captação na região da vesícula biliar.

Os resultados dos estudos invasivos são indicativos da aplicabilidade do composto na obtenção de imagens cardíacas. Para confirmar tal indicação as

imagens cintilográficas foram realizadas em coelhos, inclusive com idades diferentes, para comparar a biodistribuição e foi observado que o clareamento sanguíneo foi mais rápido, mas com maior concentração e mais persistente na vesícula biliar para o coelho mais velho (figuras 26, 27, 28, 29), embora dentro do informado em literatura para tal retenção ^(112,113,114)

Além da eliminação hepatobiliar, o composto também é excretado na urina através dos rins. A captação na glândula tireóide, indicativa de presença de pertecnetato livre, foi desprezível nos estudos invasivos e não foi detectado nas imagens cintilográficas.

Os estudos de distribuição biológica realizados nas diferentes espécies animais demonstraram a aplicabilidade do reagente liofilizado preparado, na obtenção de imagens cintilográficas cardíacas.

Nas imagens cintilográficas, em humano, não deve existir o reflexo de superposição do conjunto fígado:vesícula. O efeito somatório da radioatividade interagindo com o da classe do músculo cardíaco estaria, sabidamente minimizado, portanto, não foi considerado preocupante a captação hepática elevada em camundongos, dados com os quais foram esquematizados a distribuição biológica.

5.5 Estudo de custo

Foi feito um levantamento do custo em termos de reagentes e solventes utilizados na síntese do composto Tetrafluorborato de cobre (I) tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila), considerando-se o consumo de cada reagente em porcentagem para cada síntese completa do composto, que conforme literatura cita um rendimento final médio de 1,0 g do composto, tendo o lpen obtido o rendimento de 0,744 g . Após liofilização, cada frasco contém 1 mg do reagente liofilizado. O valor de 1,0 g do composto fornecido pela ABX (Alemanha) é de 17.800 Euros . O produto liofilizado comercializado sob o nome de Cardiolite® para uso clínico em Medicina nuclear tem um custo de R\$1.048,00 reais (em 2004) por frasco contendo 1 mg do composto.

Em relação aos valores apresentados, observa-se que é elevado o custo comercial deste composto, inclusive como produto final para uso clínico e,

embora o rendimento médio também seja baixo é viável para pequenas produções do composto, que pode ser adequado e otimizado nas suas etapas para maior produção.

As quantidades de reagentes e solventes utilizados em uma síntese completa em valores monetários fica em torno de R\$ 2.500,00, portanto de custo relativamente baixo, sendo maior o tempo gasto nas etapas (média de 40 dias), algumas críticas como já citado no texto, mas com boa possibilidade de produção.

Apesar de ser uma síntese trabalhosa, a produção do reagente de MIBI pode representar uma economia para o Centro de Radiofarmácia do IPEN, já que o produto importado é bastante caro.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

1. O produto final ($\text{Cu}[\text{MIBI}]_4\text{BF}_4$) foi obtido com todas as propriedades físico- químicas exigidas e com alto grau de pureza compatível com a elaboração de reagentes liofilizados para marcação com tecnécio-99m;
2. A formulação liofilizada do reagente para marcação com tecnécio-99m indicou bons resultados de rendimento de marcação e estabilidade, de acordo com a literatura;
3. Os estudos de biodistribuição mostraram a viabilidade do complexo para aplicação em estudos cardíacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KEREIAKES J.G. Biophysical aspects: medical use of Technetium-99m. **American Institute of Physics**, New York, p.60-109,1992.
2. EARLY, P.J.; SODEE, D.B. **Principles and Practice of Nuclear Medicine**, 2ª ed., Missouri: Mosby-Year Book Inc., p. 877-900, 1995.
3. BERNARDO FILHO, M. **Parâmetros físicos, químicos e biológicos associados à marcação de radiotraçadores com tecnécio-99m**. Tese para doutorado, Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1999.
4. SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**, 3ª ed.,p. 9, Ed.Springer Verlag, p.9, 1992.
5. BARRET, L.Z.; BELLER G.A. State of the art and future directions. **Nuclear Cardiology**, Ed. Mooby, 2ªed.,p.7, 1999.
6. SRIVASTANA, S.C. Is there life after technetium: what is the potential for developing new broad-based radionuclides? **Semin. Nucl. Med.**, v.2, p.119-31, 1996.
7. OWUNWANNE,A. ;PATEL, M.; SADEK, S. Basis aspects of radiopharmaceuticals, **The Handbook of radiopharmaceuticals**, Chapman &Hall, p. 57-99, 1995.
8. JONES, A.G.; DAVISON, A. A new class of water soluble low valent technetium unipositive cations hexakis isonitrile technetium (I) salts. **J. Label. Compd. Radiopharm.** 19: 1594-1595, 1982.
9. MERLINO D. Nuclear medicine facility survey: SNM 2003 survey reporting on 2002 cost and utilization. **J. Nucl. Med. Techn.**, v. 32, n. 4, 2004.
10. DEUTSCH, E.; GLAVAN, K.A.; FERGUSON. D.L.; LUKES, S.J.;NISHIYAMA H.; SODD, V.J. Development of a Tc-99m myocardial imaging agent, **J. Nucl. Medicine** 21: p.56, 1980.
11. MAZZI U.; NICOLINI, M. Technetium coordinação chemistry: development of new backbones for ^{99m}Tc **radiopharmaceuticals. Technetium and Renium in Nuclear Medicine**, p. 39-50, 1998
12. SURESH C.S.; POWELL R. In. Tecnetium –Labelled Compounds, Garimellce Rayudu- **Radiotracers for Medical Aplications**, vol.I, CRC Press, p.107-183, 1995.

13. D'HARDEMARE M.; PASQUALINI,R.;RICHE,F.;VIDAL,M. Chimie du Technétium- ^{99m}Tc . In: Comet M.& Vidal M. Radiopharmaceutiques- ***Chimie des radiotraceurs et applications biologiques***, Ed.Press Univ.Grenoble, p. 153-80,467-80, 1998.
14. WYK, A. J.; ASWEGEN, V.; KNOESEN, O. Synthesis and ^{99m}Tc labelling of MMI (MIBI) and its ethyl analogue EMI ***Appl. Radiat. Isot.*** 42(7): 687-689, 1991.
15. JONES, A.G.; DAVISON, A. A new class of water soluble low valent technetium unipositive cations hexakis isonitrile technetium (I) salts. ***J. Label. Compd. Radiopharm.*** 19: 1594-1595, 1982.
16. JONES, A. G.; ABRAMS, M.J.; DAVISON, A. Biological studies of a new class of technetium complexes: the hexakis (alkylisonitrile) technetium (I) cations ***J. Nucl. Med. Biol.*** 11: 225-234, 1984.
17. LEVER, J.R Technetium and Rhenium compounds In: Wagner, H.N.; Szabo, Z. and Buchanan, J.W. ***Principles of Nuclear Medicine***, 2 ed. W.B.Saunders Company, p. 213-220, 1995.
18. WACKERS, F.J.; BERMAN, D.S.; MADDAHI,J.; WATSON, D.D.; BELLER, G.A.; STRAUSS, W.; BOUCHER, C.A.; PICARD, M.; HOLMAN, B.L.; FRIDRICH, R.; INGLESE, E.; DELALOYE, B.; CAMIN, L.; MCKUSICK, K. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium- ^{201}Tl for myocardial perfusion imaging ***J. Nucl. Med.*** 30: 301-311, 1989.
19. PAPADOPOULOS, M.; PASCHALI, E.; CHIOTELLIS, E. Synthesis, kit formulation analysis and biological studies of ^{99m}Tc -MIBI for myocardial perfusion imaging, DEMO 94/17, ***Demokritos National Center for Scientific Research, Athens***, Greece,1994
20. HUNG, J.C.; WILSON, M.E. BROWN, M.L.; GIBBONS, R.J. Rapid preparation and quality control method for technetium-99m-2-methoxy isobutyl isonitrile (Technetium-99m-Sestamibi) ***J.Nucl.Med.*** 32: 2162-2168, 1991.
21. PINKERTON, T.C.; KENNEDY, C.M. Technetium carboxylate complexes-III – A new synthetic route to hexakis-(Isonitrile) Technetium (I) salts ***Appl. Radiat. Isot.*** 39(11):1179-1186, 1988.
22. DEUSTCH, E.;HIRTH, W. In vivo inorganic chemistry of technetium cations. ***J. Nucl. Med.***, v.28, 1491-1500, 1987.
23. GERSON, M.C.; DEUTSCH, E.A.;NISHIYAMA, H.; LIBSON, K.F.; ADOLPH, R.J.; SODD, V.J.; SAENGER, E.L. Myocardial perfusion imaging with ^{99m}Tc DMPE in man. ***Eur.J.Nucl.Med.***, v.8, p.371-374, 1983.

24. ABRAMS M.J., DAVISON A. BRODACK J.W., JONES A.G., COSTELLO C. E. AND PANG H. Synthesis and characterization of hexakis (alkylisocyanide) and hexakis (arylisocyanide) complexes of technetium (I). *J. Inorg.Chem.* n. 22, p.2798, 1983
25. KENNEDY, C.M.; PINKERTON, T.C. Technetium carboxylate complexes-III – A new synthetic route to hexakis-(Isonitrile) Technetium (I) salts *Appl. Radiat. Isot.* vol.39, n.11, p. 1179-1186, Great Britain, 1988
26. HOLMAN, B.L.; JONES, A.G.; LISTER-JAMES, J.; DAVISON, A.; ABRAMS, M.J.; KIRXHENBAUM, J.M.; TUMESH, S.S.; English, R.J. A new Tc-99m labelled myocardial imaging agent hexakis (t-butyl isonitrile) technetium (I) (Tc-99m TBI: initial experience in the human. *J.Nucl.Med.*, v.25, p.1350-1355, 1984.
27. HOLMAN B.L.; SPORN, V.; JONES, A.G.; SAI, S.T.; BALINO, N.P.; DAVISON, A.; LISTER-JAMES, J.; KRONAUGE, J.F.; MITTA, A.E.; CAMIN, L.L.; CAMPBELL, S.; WILLIAMS, S.J.; CARPENTER, A.T. Myocardial imaging with technetium 99m-CPI: initial experience in the human. *J.Nucl.Med.*, v.28, p.13-18, 1987.
28. FIESER F.L. AND FIESER M., *Advanced Organic Chemistry*, p. 57, Ed. Reverte, México, 1964.
29. CRAM, D.J.; HAMMOND G.S., *Organic Chemistry*, v. 1, p.124, N. York, 1959
30. MORRISON, ROBERT T.- *Química Orgânica*, vol.1, Ed.Cardoso, p.176-202, 1961.
31. FIESER F.L. AND FIESER M., *Advanced Organic Chemistry*, p 503-1027, Ed. Reverte, México, 1964.
32. CAMPOS M.M., *Fundamentos de química orgânica*, Ed.Edgard Blucher, p 237, 419-431/, 1980.
33. RAYMOND E.; OTHMER.D.F.- *Enciclopédia de tecnologia química*, vol.XI. ed. Hispano-Americano, p .264-282, 1971.
34. PROULX, A; BALLINGER, J.R.; GULENCHYN, K.Y. Routine determination of radiochemical purity of ^{99m}Tc-MIBI. *Appl.Radiat. Isot.* 40(1): 95-97, 1989.
35. DEUTSCH, E; GLAVAN, K.^a; FERGUSON, D.L.; LUKES, S.J.; NISHYIANA H.; SODD, V.J. Development of a Tc-99m myocardial imaging agent replace TI-201.- *J. Nuclear Medicine* 21: p.95-97, 1980.

36. BOUQUILLON, S.; COULAIS, Y.; DARTIGUENAVE, M.; TAFANI, J.A.M.; GUIRAUD, R. Synthesis, characterization and biodistribution of a new technetium-99m complex with trimethylsilylmethylisonitrile. Comparison with ^{99m}Tc -TBI and ^{99m}Tc -MIBI. *J. Nucl. Med. Biol.* 22(5): 585-588, 1995
37. SAHA, G.B.; GO, R.T.; MACINTYRE, W.J. MACINTYRE, W.J. Radiopharmaceuticals for cardiovascular imaging *J. Nucl. Med. Biol.* 19(1): 1-20, 1992.
38. PIWNICA-WORMS, D.; KRONAUGE, J.F.; HOLMAN, B.L.; LISTER-JAMES, J.; DAVIDSON, A.; JONES, A.G. Hexakis (carbomethoxyisopropylisonitrile) technetium (I), a new myocardial perfusion imaging agent: binding characteristics in cultured chick heart cells. *J. Nucl. Med.*, v.29, p.55-61, 1988.
39. WACKERS, F.J.; BERMAN, D.S.; MADDAHI, J.; WATSON, D.D.; BELLER, G.A.; STRAUSS, W.; BOUCHER, C.A.; PICARD, M.; HOLMAN, B.L.; FRIDRICH, R.; INGLESE, E.; DELALOYE, B.; CAMIN, L.; MCKUSICK, K. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium- ^{201}Tl for myocardial perfusion imaging *J. Nucl. Med.* 30: 301-311, 1989.
40. MURADIAN, J.; MARQUES, F.L.N. Síntese da 2-metoxi isobutil isonitrila (MIBI) para uso médico *Radiol. Bras.* 25: 171-172, 1992.
41. DEICAS, B.; GAMBINO, D. Synthesis, characterization and spectroscopic properties of $[\text{Cu}(\text{alkylisocyanide})_4]\text{BF}_4$ complexes. X-ray crystal structures of $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$ and $[\text{Cu}(\text{CPI})_4]\text{BF}_4$ *Polyhedron* 16(14): 2397-2403, 1997.
42. LEVER, J.R. Technetium and Rhenium compounds In: Wagner, H.N.; Szabo, Z. and Buchanan, J.W. *Principles of Nuclear Medicine*, 2 ed. W.B.Saunders Company, p. 213-220, 1995.
43. JACOBSSON, H.; WALLIN, G.; WERNER, S.; LARSSON, S.A. Technetium-99m methoxyisobutylisonitrile localizes in an ectopic ACTH-producing tumor: case report and review of the literature. *Eur. J. Nucl. Med.* 21: 582-586, 1994.
44. PACKARD, A. B.; KRONAUGE, J.F. Uptake of Tc-99m-Sestamibi by stereotactically implanted 9L gliosarcoma tumor in the rat *J. Label. Compd. Radiopharm.* 35: 17-18, 1994.
45. ZIEGELS, P.; NOCAUDIE, M. Comparison of technetium-99m methoxyisobutylisonitrile and gallium-67 citrate scanning in the assessment of lymphomas. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 126-131, 1995.
46. AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; CELASUN, B.; KIN, M.K. Assessment of tumor necrosis and detection of mediastinal lymph node metastasis in bronchial carcinoma with technetium-99m sestamibi imaging: comparison with CT scan *Eur. J. Nucl. Med.* 21: 973-979, 1994.

47. HAUGEN B.R; LIN E.C. Endocrine and Metabolism Clinics of North America; Isotope imaging for metastatic thyroid cancer. *J. Nucl. Med.*; 30: 469-492, 2001
48. BURAK, Z. ^{99m}Tc-MIBI imaging as a predictor of therapy response in osteosarcoma compared with multidrug resistance-associated protein and p-glycoprotein expression, *J. Nucl. Med.*; 44: 1394-1401, 2003
49. RODRIGUES M. Uptake of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin into malignant versus nonmalignant breast cell lines, *J. Nucl. Med.*, 41: 1495-1499, 2000.
50. PINKAS, L. ^{99m}Tc-MIBI scintigraphy in musculoskeletal tumors, *J. Nucl. Med.*, 42: 33-37, 2001.
51. POLAN, R. L. Scintimammography in patients with minimal mammographic or clinical findings, *Radiographics*, 21: 641-655, 2001.
52. KHALKHALI, I. ^{99m}Tc Sestamibi breast imaging for the examination of patients with dense and fatty breasts: multicenter study. *Radiology*, 222: 149-155, 2001
53. MASSARDO T. Diagnostic value of ^{99m}Tc-methylene diphosphonate and ^{99m}Tc-pentavalent DMSA compared with ^{99m}Tc-sestamibi for palpable breast lesions, *J. Nucl. Med.*, 43: 882-888, 2002.
54. BUSCOMBE J.R. Prediction of the usefulness of combined mammography and scintimammography in suspected primary breast cancer using ROC curves, *J. Nucl. Med.* , 42: 3-8, 2001.
55. ALONSO, O. ^{99m}Tc-sestamibi scintimammography complementary to conventional mammography for detecting breast cancer in patients with palpable masses? *J. Nucl. Med.*, 42: 1614-1621, 2001.
56. IMBRIACO M. Scintimammography with ^{99m}Tc-MIBI versus dynamic MRI for non-invasive characterization of breast masses, *Eur. J. Nucl. Med.*, 28: 56-63, 2001.
57. KHALKHALI I. Diagnostic accuracy of ^{99m}Tc-Sestamibi breast imaging: Multicenter trial results, *J. Nucl. Med.*, 41: 1973-1979, 2000.
58. HAUGEN B.R.; LIN, E.C. Isotope imaging for metastatic thyroid cancer, Endocrine and Metabolism Clinics of North America, *J. Nucl. Med.*, 30: 469-492, 2001.
59. SEABOLD, J.E. Comparison of ^{99m}Tc-Methoxyisobutyl Isonitrile and ²⁰¹Tl scintigraphy for the detection of residual thyroid cancer after ¹³¹I ablative therapy, *J. Nucl. Med.*, 40: 1434-1440, 1999.

60. MIYAMOTO, S. Evaluation of technetium-99m-MIBI scintigraphy in metastatic differentiated thyroid carcinoma, *J. Nucl. Med.*, 38: 352-356, 1998.
61. JACOBSSON, H.; WALLIN, G. Technetium-99m methoxyisobutylisonitrile localizes na ectopic ACTH-producing tumor: case report and review of the literature. *Eur.J.Nucl.Med.* 21: 582-586, 1994
62. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Development of new radiopharmaceuticals: final report of a research co-ordination meeting organized by the IAEA and held in Athens, 1988, Preparation of 2-methoxyisobutylisocyanide and its cuprous chelate (MIBI)., *IAEA TECDOC 532*, 1989
63. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M. *Manual de soluções, reagentes e solventes*, Ed. Edgard Blucher, 2ªed., p.05-09; 74-77; 421-476, 1987.
64. MERCK AG, *Tabelas auxiliares para laboratorio químico*, E.Merck AG-Darmstadt-Alemanha, 1980.
65. RIDDICK, J.A.; BUNGER, W.B.; SAKANO, T.K. *Organic solvents*, 4ª ed., John Wiley & Sons, N.York, 1986
66. WESTON A. W., RUDDY A.W., SUTER C.M. The preparation of β -substituted phenethylamines - J. Am. Chem. Soc. vol 65, pp. 674-676, 1943.
67. CARDIOLITE® package insert. Billerica, MA; *DuPont Merck Pharmaceutical Co.*, 1998
68. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Iqbal T., Cain Jr. J.H., Slosky J.J., *Tris(isonitrile)copper(I) copper for preparing radionuclide complexes*, United States Patent n.4885100, 1989
69. SAUREZ A. H. F., TROPAREVSKY, M. L. P., Manual de controle de Radiofarmacos (anexo1), p 12, *ALASBIM*, Buenos Aires, 1992
70. ALTMAN, P. & DITTMER, D. Blood and Other Body Fluids. *Biological Hand Books*. Federation of American Society for Experimental Biology, Washington, D.C., p. 1-19 apud ARAUJO, E.B. de *Conjuntos de Reativos Liofilizados de Compostos Diaminoditiólicos para Marcação com Tecnécio-99m. Estudo Farmacocinético e Elaboração de Modelos Compartimentalizados dos Respetivos Complexos*. São Paulo: 1995. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
71. JONES, A.G.; ABRAMS, M.J. and DAVISON, A.. Biological studies of a new class of technetium (I) cations. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, v. 11, p. 225-235, 1984 apud ARAUJO, E.B. de *Conjuntos de Reativos Liofilizados de Compostos Diaminoditiólicos para Marcação com Tecnécio-99m. Estudo Farmacocinético e Elaboração de Modelos Compartimentalizados dos Respetivos Complexos*. São Paulo: 1995. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

72. ADAMS R., CAIRNS T. L., Attempts to prepare optically active ethyleneimines- **J. Am.Chem.Soc.** vol. 61, p. 2464-2466, 1939.
73. COLLTHUP B.N., DALY H.L., WIBERLEY E.S. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**, Academic Press, 2^a ed., p 220-253;311-319;321-334;365-374, EUA, 1975
74. NAKAMOTO K., **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**, Wiley Interscience Publications, John Wiley, 3^aed., p 197-230, N.Y. EUA, 1981.
75. BAQUERIZO J. *; LÓPEZ J.; ROBLES A.; RAMOS B.; CASTRO M
Synthesis of 2-methylallylamine hydrochloride, precursor of tetra (2-methoxyisobutylisociano) Copper (I) tetrafluoroborate. **Alasbimn Journal** 5(21): July 2003.
76. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY Synthesis and preparation of technetium-99m radiopharmaceuticals based isonitrile derivatives. In: IAEA research contract **TECDOC 6619/RB** from International Atomic Energy Agency,1995.
77. TONGYOI C., SANGSURYAN J., PORAMATIKUL N., TIPPAYAPONG K., KULLAPRAWITHAYA U., Preparation of ^{99m}Tc- methoxyisobutyl Isonitrila, Research and development section, **Isotope Production Division**, Office of Atomic Energy for Peace, Thailand, 1992.
78. Production of Tc-99m radiopharmaceuticals from brain, heart and kidney imaging. In: final report of a research co-ordinated programme 1991- 1994, **IAEA TECDOC 805**, 1995.
79. BOUQUILLON, S.; COULAIS, Y.; DARTIGUENAVE, M.; TAFANIJ.A.M.; GUIRAUD,R. Synthesis, characterization and biodistribution of a new technetium-99m complex with trimethylsilylmethylisonitrile. Comparison with ^{99m}Tc-TBI and ^{99m}Tc-MIBI. **J. Nucl. Med. Biol.** 22(5): 585-588, 1995
80. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Carpenter, Jr.; Alan P. ; Maheu; Leo J. r, MA); Patz; Michael A. ; Tulip; Thomas H.; Linder; Karen E.; Subramanyam; Vinayakam,; Thompson; Jeffery S., Metal-isonitrile adducts for preparing radionuclide complexes, **United States Patent N.4894445**, 1990
81. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Iqbal T., Cain Jr. J.H., Slosky J.J, Tris(isonitrile)copper(i) copper for preparing radionuclide complexes, **United States Patent n.4885100**, 1989
82. DU PONT MERCK PHARMACEUTICALS COMPANY, Edwards D.S., Tris(isonitrile)copper(i) for preparing radionuclide complexes, **United States Patent n.5693324**, 1997

83. ALLINGER, N.;CAVA, M.P.; JUOCH, C.R.;STEVENS, C.H. **Química Orgânica**, 2ªEd., Edgard Guanabara-Koogan, p.520-521, 1976.
84. FIESER F.L. AND FIESER M., **Advanced Organic Chemistry**, p 503-1027, Ed. Reverte, México, 1964
85. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Bergstein; Paul L. (Norwood, MA); Subramanyam; Vinayakam (Wilmington, DE), Ether-substituted isonitriles, Tc99m complexes thereof, and processes for myocardial tissue radioimaging using the Tc99m complexes . **United States Patent 4,988,827**, 1991.
86. CAMPOS M.M., **Fundamentos de química orgânica**, Ed.Edgard Blucher, vol.1, p.237 - 419, São Paulo,1992
87. JUNG S. H., AHN J. H., PARK S. K., CHOI J. K. Practical and Convenient Procedure for the N- Formylation of Amines Using Formic Acid, **Korean Chem. Soc.**, Vol. 23, No. 1 149 A , 2002
88. ANGELBERGER P., ZBIRAL E., Synthesis, radiocromatography and biodistribution of Tc -99m Hexakis- (methoxyisonitrile) Technetium (I) complexes, **Inst.fur Chemie**, OEFZS 4411- CH378/87, Seibedorf, 1987
89. BROWN C.H., JR GEOGHEGEM P.J. Solvomercuration-Demercuration. 1.Oxymercuration- Demercuration of representative olefins in an aqueous system, **J.Org. Chem.** 35 (6), pp. 1844-1850, 1970
90. BROWN C.H., LYNCH G.J. Solvomercuration - Demercuration. Oxymercuration - Demercuration of methoxy, hidroxy, and acetoxy-substituted alkenes, **J.Org. Chem.** 46, pp. 531-538, 1981
91. http://www.tamug.tamu.edu/mars/chem_227/electr.htm- Eleltrophilic addition reaction to alkenes RCH=CH₂ -20/04/2004
92. MORRISON T.R., BOYD R.N. **Química Orgânica**, Ed. Fund. Calouste Gulbekian, Lisboa, 7ª Ed., p. 617-618, 1980
93. HERTLER W.R., COREY E.J. A novel preparation of isonitriles, **J. Org. Chem**, vl.23, p.1221-1222, 1958.
94. WEBER P.W., GOKEL G.W., UGI K., Phase transfer in the Hofmann carbylamine reaction, **Angew. Chem Intern.** Edit, vol.11, n.6 , 1972.
95. UGI I., FETZER U., KNUPFER H., OFFERMANN K., Isonitrile synthesis, **Angew Chem Intern.**Edit, vol.4, n.6, p.472-484, 1965.
96. KIM M., EULER W.B. ROSEN W., **J. Org. Chem.** 62, 3766-3769, 1997.

97. OBRECHT R., HERRMANN R., UGI I., **Synthesis**, p. 400-402, 1985.
Kercher T. Livinghouse T., *J.Org. Chem.*, 62, p. 805-812, 1997
98. KERCHER T. LIVINGHOUSE T., **J.Org. Chem.**, 62, p. 805-812, 1997
99. MORRISON T.R., BOYD R.N. **Química Orgânica**, Ed. Fund. Calouste Gulbekian, Lisboa, 7ª Ed., p. 942-3, 1980
100. UGI I., MEYR R., LIPINSKI M., BODESHEIM F., Rosendhal F., **Organic synthesis Coll.**, v.5, p. 300, 1960
101. INSTITUTE OF NUCLEAR ENERGY RESEARCH, Method for synthesis and ^{99m}Tc labelling of 2-alkoxyisobutylisonitrile **United States Patent n. 5210270**, appl.n.797066/91, class U.S.:558/302- (TW), 1995
102. LAUNAY D., BOOTH S., CLEMENS I., MERRIT A., BRADLEY M., Solid phase-mediated synthesis of isonitriles, **Tetrahedron Letters**, vol.43, p. 7201-7203, 2002.
103. INSTITUTE OF NUCLEAR ENERGY RESEARCH, TW Te-Wei; Lee; Gann; Ting; Chang-Shinn, Method for synthesis and ^{99m}Tc labelling of 2-alkoxyisobutyl isonitrile, Appl. No797066, Current U.S. Class: 558/302; 534/14 **United States Patent 5.210.270**, 1993
104. FLORES G.F, GARCIA L.R., LEZAMA J., GARCIA P.G., TENDILLA J.I., **J. Radioanal. Nucl. Chem. Lettres** 188(6) p. 409-415, 1994.
105. THE DU PONT MERCK PHARMACEUTICAL, Edwards; David S. Tris(isonitrile)copper(i) sulfates for preparing radionuclide complexes, Company **United States Patent 5420321**, 1995
106. SACHDEV S.S., RAMAMOORTHY N., NAYAK U.N., PATEL R.B., RAMANATHAN S.V., SHAH K.B., DESAI C.N., Preparation and Evaluation of ^{99m}Tc-t-butylisonitrile (^{99m}Tc-TBI) for myocardial imaging: a Kit for hospital radiopharmacy, **Nucl. Med. Biol.**, vol.17(6), p.543-552, 1990
107. WILSON M.E., GIBBONS R.J., An alternative method for rapid preparation of ^{99m}Tc-Sestamibi, **Nucl. Med Commum**, 14(7): 544-9, 1993
108. PANDEY P.M., SACHDEV S.S., RAMAMOORTHY N., LAL R., RANGANATHA D.K., NARASHIMHAN S., OOMEN R., Formulation and evaluation of a two-components lyophilized kit for Tc-Sestamibi: trachelation preparation of Tc-99m –sestamibi, **Technical notes** p.697-670, **27th Annual conference of the society of Nuclear Medicine**, India, 1995
109. HIRSCH, J.I.; WATSON, M.W. Rapid quality control of technetium-99m-2-methoxy isobutyl isonitrile (technetium-99m-sestamibi). **J Nucl Med Technol** 1996;24:114–118

110. BARBOZA M.R.F., PEREIRA N.P.S., SILVA C.P.G., Radiochemical quality control of kits labelled with Tc-99m produced at **IPEN-CNEN/SP**, publicação IEN 324, ISSN 0101-3084, 1990.
111. SACHDEV S.S., RAMAMOORTHY N., NAYAK U.N., PATEL R.B., RAMANATHAN S.V., SHAH K.B., DESAI C.N., Preparation and Evaluation of ^{99m}Tc -t-butylisonitrile (^{99m}Tc -TBI) for myocardial imaging: a Kit for hospital radiopharmacy, **Nucl. Med. Biol.**, vol.17(6), p.543-552, 1990
112. MOUSA, S.A.; WILLIAMS, S.J.; SANDS, H. Characterization of in vivo chemistry of cations in the heart. **J. Nucl. Med.**, v.28, p.1351-57, 1987
113. MARSHALL, R.C.; LEIDHOLDT JR, L.M.; ZHANG, D.Y.; BARNETT, C.A. Technetium-99m Hexakis 2-Methoxy-2-Isobutyl Isonitrile And Thallium-201 Extraction, Washout, And Retention At Varying Coronary Flow Rates In Rabbit Heart, **Circulation**, Vol 82, 998-1007, 1990
114. SANDS, H.; DELANO, M.L.; GALLAGHER, B.M. Uptake of hexakis (t-butylisonitrile)technetium (I) and (isopropylisonitrile)technetium (I) by neonatal rat . **J. Nucl. Med.**, v. 27, p. 404-408, 1986